



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014029107-1 B1



(22) Data do Depósito: 21/05/2013

(45) Data de Concessão: 13/07/2021

(54) Título: MÉTODO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE UMA ESPÉCIE DE POLISSORBATO EM UMA MISTURA.

(51) Int.Cl.: G01N 21/55; G01N 21/35.

(30) Prioridade Unionista: 23/05/2012 US 61/650735.

(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A..

(72) Inventor(es): BENEDICTE GBAGUIDI; OLIVIER C. GERMAY; SONIA LARDAU.

(86) Pedido PCT: PCT IB2013001590 de 21/05/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/175312 de 28/11/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/11/2014

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE UMA ESPÉCIE DE POLISSORBATO EM UMA MISTURA. Um método para determinar uma espécie de polissorbato, como polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60 ou polissorbato 80, em uma mistura, compreende obter uma amostra de teste de referida mistura, adicionando um padrão interno, preferivelmente azida, para a referida amostra de teste, obtendo, com um espectrômetro, um espectro de refletância total atenuada no meio-infravermelho (ATR) da amostra de teste, por exemplo, usando um aparelho ATR-FTIR, identificando, a partir do espectro de refletância, um número de onda correspondendo ao pico de C=O (por exemplo, 1735 cm⁻¹), identificando, a partir do espectro de refletância, um número de onda correspondendo ao padrão interno, calculando a área sob a curva para o referido número de onda C=O, normalizado pelo padrão interno, e comparando a referida área com uma curva de calibração para determinar a concentração de polissorbato na referida amostra de teste.

“MÉTODO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE UMA ESPÉCIE DE POLISSORBATO EM UMA MISTURA”

DECLARAÇÃO COM RELAÇÃO À PESQUISA PATROCINADA PELO GOVERNO FEDERAL

[0001] Aspectos desta invenção foram realizados com o apoio do governo dos Estados Unidos em conformidade com o Contrato # HHSO100200600011C, do Department of Health and Human Services; o governo dos Estados Unidos pode ter determinados direitos sobre a invenção.

CAMPO TÉCNICO

[0002] A presente invenção refere-se a um método de medição de polissorbatos, tais como polissorbato 80, usando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier usando refletância total atenuada (ATR-FTIR).

ANTECEDENTES

[0003] Técnicas existem na arte para a quantificação de polissorbatos, incluindo métodos à base de colorimetria, separação por HPLC, cromatografia gasosa (GC), e GC com detecção por espectroscopia de massa (MS). No entanto, interferência pode ocorrer com tais métodos de teste devido aos constituintes ou condições presentes nas amostras de teste (interferência de matriz). Isto pode exigir preparação específica, por vezes, complexa e demorada, da amostra de teste.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0004] Um aspecto da invenção é um método para determinar a concentração de uma espécie de polissorbato em uma mistura, por obtenção de uma amostra de teste da mistura, adicionando um padrão interno à amostra de teste, obtendo um espectro de refletância total atenuada meio-infravermelho (ATR) da amostra de teste, identificando a partir de espectros de refletância um número de onda correspondendo ao pico de C=O e um número de onda correspondendo ao padrão interno, calculando a área sob a

curva para o número de onda C=O (normalizado pelo padrão interno), e comparando a referida área a uma curva de calibração para determinar a concentração de polissorbato na amostra de teste.

[0005] Em um aspecto da invenção, a amostra de teste compreende um antígeno, como um antígeno de proteína ou um antígeno de polissacarídeo.

[0006] Em um aspecto da invenção, a amostra de teste não é quimicamente pretratada antes de obter os espectros de refletância total atenuada no meio infravermelho da amostra de teste.

[0007] Em um aspecto da invenção, o padrão interno é azida.

[0008] Em um aspecto da invenção, a amostra de teste compreende uma única espécie de polissorbato.

[0009] Em um aspecto da invenção, a amostra de teste é de um componente de vacina a granel.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00010] Figura 1 é um exemplo de um cromatograma GC-MS em modo de monitoração de íons selecionados (SIM) (o pico rotulado TIC: 25.D\data.ms 10,686 é Polissorbato 80).

[00011] Figura 2 mostra os modos vibracionais de ligações químicas. A localização dos modos vibracionais é dada em termos de comprimento de onda e frequência.

[00012] Figura 3 mostra espectros de ATR-FTIR obtidos a partir de concentrações conhecidas de polissorbato 80 em solução (água), normalizados usando o padrão interno (região II), em que o eixo X é número de onda (cm^{-1}) e o eixo Y é a absorbância (absorbância normalizada em unidades arbitrárias). Região do espectro (I) $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ = cadeia alifática de polissorbato 80; região (II), $2200\text{-}1980\text{ cm}^{-1}$ = padrão interno adicionado à amostra; pico de região (III) a 1735 cm^{-1} = polissorbato 80 (C = O); pico de região (IR) a 1100 cm^{-1} = polissorbato 80 (C-O). Áreas de pico (I), (III) e (IR) aumentam como uma função da concentração de polissorbato 80. Cada linha

no gráfico representa um resultado médio para uma amostra, a partir de 32 varreduras.

[00013] Figura 4 mostra as curvas de calibração obtidas a partir de Regiões (I), (III) e (IR) da Figura 3, normalizadas usando a Região II padrão de azida. A área (eixo Y) é expressa como unidades arbitrárias; o eixo X é a concentração de polissorbato 80 ($\mu\text{g/ml}$).

[00014] Figura 5: Exemplo de um espectro de ATR-FTIR de uma amostra a granel de Flu-CC, normalizada usando o padrão interno (região II). Devido à complexidade da matriz, somente o pico (III) da Figura 3 pode ser usado para identificar e quantificar o polissorbato 80 em amostras de Flu-CC.

[00015] Figura 6: representa graficamente a área versus concentração de polissorbato 80 a partir da Região (I) e (III) da Figura 5.

[00016] Figura 7A: mostra espectros de polissorbato 80 usando ATR-FTIR.

[00017] Figura 7B: mostra a quantificação de polissorbato 80 usando ATR-FTIR, em que as correlações de resposta de pico não são normalizadas.

[00018] Figura 8A: mostra espectros de polissorbato 80 usando ATR-FTIR.

[00019] Figura 8B: mostra a quantificação de polissorbato 80 usando ATR-FTIR, em que os picos são normalizados usando azida como um padrão interno.

[00020] Figura 9: mostra espectros de polissorbato 80 a partir de duas amostras obtidas durante a purificação de Flu-CC, onde a linha de topo é uma amostra tomada antes da adição de polissorbato, e a linha de fundo é uma amostra tomada após a adição de polissorbato durante o processamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00021] Excipientes são frequentemente adicionados às formulações farmacêuticas, incluindo formulações de vacinas. Os tensoativos, incluindo polissorbatos, são comumente usados em excipientes farmacêuticos e

preparações de vacina. Os tensoativos (tais como polissorbatos) podem, por exemplo, ajudar a reter a atividade biológica de proteínas através da manutenção de uma estrutura específica da proteína durante o armazenamento, transporte e distribuição. Os tensoativos podem também ajudar a diminuir a adsorção de proteínas nas superfícies (por exemplo, frascos e seringas), reduzir a tensão interfacial de superfície, e diminuir a taxa de desnaturação da proteína (o que pode levar à agregação de proteínas). Ver, por exemplo, Khosravi et al., *Pharma Research*, 19(5):634 (2002); Loughheed et al., *Diabetes*, Vol. 32 (1983) 424–432.

[00022] Polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60 e polissorbato 80 são excipientes de polissorbato comuns usados na formulação de produtos biofarmacêuticos, incluindo vacinas. A quantificação de tensoativos, bem como de outros ingredientes, em produtos médicos, biofarmacêuticos, e biológicos pode ser exigida pelas agências reguladoras.

[00023] Um método de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier usando refletância total atenuada (FTIR-ATR) é aqui descrito, o qual quantifica o polissorbato em formulações líquidas, incluindo formulações farmacêuticas que compreendem excipientes diferentes de polissorbato.

Métodos de quantificação de polissorbatos

[00024] Vários métodos analíticos foram descritos para a quantificação de polissorbatos. Tais métodos podem incluir a preparação de amostras em múltiplas etapas, interferência potencial dentro de uma matriz complexa, e uma falta de sensibilidade e especificidade.

[00025] Polissorbato 20 e/ou 80 pode ser quantificado com base na coloração azul das espécies de polissorbato complexadas com reagente de cobalto-tiocianato em um solvente orgânico; a concentração de polissorbato 20 e/ou 80 é determinada por absorção óptica. Zsolt e Gabor, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 715-720; Hu et al., *J. Chromatogr. A*, 984 (2003)

233-236; Adamo et al., J. Chromatogr. B, 878 (2010) 1865-1870; Tani et al., J. Chromatogr. A, 786 (1997) 99-106.

[00026] Fekete et al. descrevem um método de LC-CAD para a determinação quantitativa de polissorbato 80, com base em sua interação com a 5 (p-dimetilaminobenzilideno) rodanina (PDR), em meio alcalino (Fekete et al., J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 52 (2010) 672-679). O método usa separação por cromatografia a líquido de alto desempenho (HPLC) e detecção de aerossol carregado (CAD). Fekete et al. afirmam que o método LC-CAD é apropriado para quantificar Polissorbato 80 na faixa de 10-60 µg/ml em soluções de proteínas.

[00027] Cromatografia a líquido de alto desempenho por exclusão de tamanho (SEC-HPLC) com detecção de absorbância ultravioleta (UV) emprega uma fase móvel contendo o tensoativo a ser determinado com uma concentração acima de sua concentração micelar crítica (CMC).

[00028] Cromatografia a líquido de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) com detecção por absorbância UV após a preparação da amostra pode ser baseada na hidrólise ácida do éster laurato de sorbitano seguido por uma separação de RP-HPLC com detecção por absorbância UV do ácido láurico livre (razão molar 1:1). Zsolt et al., J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 18 (1998) 715-720. Alternativamente, a hidrólise básica do éster oleato de sorbitano pode ser usada seguido por separação de RP-HPLC com detecção por absorbância UV do ácido oleico livre. Hu et al., J. Chromatogr. A, 984 (2003) 233-236; Adamo et al., J. Chromatogr. B, 878 (2010) 1865-1870; Tracy et al., AAPS J., 10 (S1) (2008) 647.

[00029] Cromatografia a líquido de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC) com detecção por dispersão de luz evaporativa (ELSD) pode alcançar eluição de polissorbato 80 como um único pico (co-eluição de todos os componentes de polissorbato). Nair et al., J. Chromatogr. A, 1012 (2003) 81-86; Hewitt et al., J. Chromatogr. A, 1215 (2008) 156-160; Adamo et al., J.

Chromatogr. B, 878 (2010) 1865-1870; Hewitt et al., J. Chromatogr. A, 15:2138-45 (2011).

[00030] A detecção de cromatografia a gás (GC) com espectrometria de massa (MS) usa hidrólise ácida do éster oleato de sorbitano, seguido por separação do oleato de éster metílico por GC com detecção por espectrometria de massa (MS). A preparação da amostra envolve um procedimento de hidrólise e, então, uma fase de extração. Polissorbato 80 é quantificado contra ácido pentadecanóico como o padrão interno (Oliveira et al., Talanta Vol. 69 (2006) 1278–1284).

[00031] Outros métodos analíticos para a quantificação dos polissorbatos pode incluir cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia de fluido supercrítica (SFC), análise de fluorescência com corantes fluorescentes N-fenil-1-naftilamina por divisão no núcleo hidrofóbico das micelas formadas por polissorbato, quantificação dos componentes ácidos do polissorbato por RP-HPLC, após uma reação de derivatização com 2-nitrofenil hidrazona, caracterização de polissorbatos usando espectrometria de massa de tempo de voo com dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS), e cromatografia a líquido com detecção por espectrometria de massa (MS).

Espectroscopia IR

[00032] Espectroscopia vibracional infravermelho (IR) identifica moléculas, analisando as suas ligações químicas, que vibram a uma frequência característica. A radiação de luz de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, meio infravermelho, é comumente usada como a região de infravermelho do espectro, engloba as frequências fundamentais da maioria das vibrações moleculares. Em uma molécula, os movimentos de alongamento e flexão de um componente (por exemplo, CH_2) resulta em modos múltiplos de oscilação. As oscilações que causam uma mudança em dipolo na molécula resultam em absorção de um fóton com a mesma frequência. Um espectro das frequências de absorção de

uma amostra podem ser gravados e usados para detectar e quantificar grupos químicos presentes na amostra.

Refletância total atenuada (ATR)

[00033] Refletância total atenuada (ATR) é uma técnica de amostragem usada com espectroscopia no infravermelho. Uma amostra de teste é colocada em contato com um cristal de ATR (alternativamente referido como um elemento de reflexão interna (IRE)). Quando as amostras de líquidos são testadas, uma camada rasa (fina) é espalhada sobre o cristal de ATR. Um feixe incidente de radiação (luz infravermelho) é dirigido sobre o cristal de ATR em um ângulo predeterminado. O feixe passa através do cristal de ATR de tal modo que ele é totalmente internamente refletido no limite entre o IRE e a amostra de teste. A refletância interna cria uma onda evanescente se estendendo apenas alguns microns além da superfície do cristal de ATR na amostra, e alguma da energia da radiação incidente é absorvida pela amostra de teste. A onda evanescente é, assim, atenuada ou alterada em regiões do espectro de infravermelho em que a amostra absorve energia. A intensidade da radiação internamente refletida é diminuída para estes comprimentos de onda onde a amostra absorve energia, e a quantidade de absorção em pontos específicos pode ser usada para quantificar a quantidade de moléculas específicas na amostra de teste. A radiação refletida, assim, inclui informação a partir da qual um espectro de absorção para a amostra de teste pode ser adquirido. A energia atenuada sai do cristal de ATR, para um detector do espectrômetro de IR. O sistema gera um espectro de infravermelho (espectros de reflexão interna ou espectros de reflexão total atenuada (ATR)).

[00034] Devido à profundidade limitada de penetração da onda evanescente na amostra, amostras de teste são colocadas em contato íntimo com o cristal de ATR; isto pode ser conseguido usando amostras líquidas. O tipo de cristal de ATR usado define o seu índice refrativo, a faixa de transmissão de infravermelho, e as propriedades químicas do IRE. A

profundidade de penetração pode ser controlada através da alteração do ângulo de incidência do feixe IR entrando com relação a IRE, ou mudando o índice refrativo do cristal de ATR.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

[00035] Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) baseia-se na absorção de luz infravermelho por moléculas. Moléculas somente absorvem luz infravermelho em frequências que afetem o momento dipolar da molécula; isso causa excitação de estados vibracionais maiores. As moléculas monatômicas (He, Ne, etc.) e diatômicas homopolares (H₂, O₂, etc.) não absorvem luz infravermelho.

[00036] Espectroscopia FTIR obtém um espectro de infravermelho de absorção por uma amostra de sólido, líquido, ou gás. Um algoritmo matemático (transformada de Fourier) é usado para converter os dados brutos em um espectro. Em espectroscopia FTIR, um feixe compreendendo diferentes frequências de luz é dirigido para a amostra, e são tomadas medições de absorção em diferentes comprimentos de onda. Todas as frequências ópticas são observadas simultaneamente, durante um período de tempo conhecido como um tempo de varredura. O feixe é mudado (por exemplo, usando um interferômetro de Michelson, como é conhecido na arte) para conter uma combinação diferente de frequências e as medições são novamente tomadas. Isto é repetido para dar muitos pontos de dados (dados brutos) que são usados para calcular a absorção em comprimentos de onda particulares.

[00037] Assim, em ATR-FTIR, mudanças que ocorrem em um feixe de infravermelho no limite de IRE e amostra de teste são determinadas. Quando lidando com os espectros de meio-IR, o número de onda (centímetro⁻¹) é comumente usado em vez de comprimento de onda, uma vez que o número de onda é proporcional à energia e frequência da radiação.

[00038] A profundidade de penetração da energia infravermelho na amostra é dependente do comprimento de onda. À medida que o comprimento de onda da radiação infravermelho aumenta, a profundidade de penetração aumenta. Em termos alternativos, a profundidade de penetração aumenta à medida que o número de onda diminui. Isto leva as intensidades de banda relativas no espectro de ATR a aumentar com diminuição do número de onda, quando comparado com um espectro de transmissão da mesma amostra. Este fenômeno pode ser matematicamente corrigido via *software*, inclusive pacotes de *software* FTIR comercialmente disponíveis.

[00039] Em ATR- FTIR, a assinatura de intensidade do espectro incidente de retorno, junto com a lei de Beer, é usada para identificar e quantificar compostos. A Lei de Beer está subjacente à análise de dados de FTIR. Ela afirma que, para um comprimento de trajeto constante, a intensidade da energia de luz incidente (direta) atravessando um meio absorvedor diminui exponencialmente com concentração. Operações matemáticas e estatísticas do presente método podem ser realizadas usando em qualquer equipamento computacional apropriado. O espectrômetro pode ter a capacidade de armazenar os espectros de IR coletados (dados) e realizar manipulação matemática dos dados. Um computador pessoal comercialmente disponível pode ser usado para executar o *software* para a aquisição de dados, o cálculo dos espectros de diferença, e as análises espectrais e outras. Os computadores ligados em rede com um instrumento FTIR podem ser empregados para adquirir dados em uma máquina, enquanto que as análises são conduzidas em outra. Pacotes de software de gerenciamento e de aquisição de dados apropriados podem ser escritos *de novo* ou podem ser comprados. Pacotes de *software* apropriados disponíveis comercialmente para serem usados na presente invenção que incluem *software* OPUS (Bruker Optics, Alemanha); e Matlab (Mathworks Inc., EUA) podem ser personalizados para uso neste método. Existem muitas técnicas de

classificação multivariada apropriadas para uso com dados espectrais de IR, incluindo, mas não limitados a, metodologias de quantificação, tais como a análise de componentes principais (PCA) ou regressão do componente principal (PCR), por mínimos quadrados parciais. Um espectro de IR processado pode ser formado a partir de vários espectros de IR em bruto (por exemplo, por múltiplas varreduras sobre uma faixa de comprimento de onda e usando técnicas de amostragem conhecidas na arte).

[00040] Oliveira et al. descrevem a avaliação do teor de éster em biodiesel usando FTIR com base na vibração de alongamento C=O de grupos éster (Oliveira et al., Talanta Vol. 69 (2006) 1278–1284). A patente US 7.255.835 descreve um método de passe único de ATR-FTIR para uso na determinação da estrutura secundária da proteína.

Aquisição do espectro de IR

[00041] Os detalhes específicos para a coleta e análise de um espectro de IR usando ATR-FTIR variam com o equipamento específico usado, mas geralmente compreendem irradiação de IRE, que está em contato com uma amostra de teste líquida, com a radiação de IR e a monitoração da radiação refletida a partir de IRE. Dados de reflexão podem ser armazenados em um meio apropriado e/ou exibido em uma tela de computador ou em papel de gráfico.

[00042] Um espectro adquirido usando o aparelho e os métodos da presente invenção pode compreender um sinal a partir do solvente da amostra; uma subtração de fundo (subtração matemática) pode ser realizada onde o solvente é conhecido. Componentes biológicos, como proteínas, glicoproteínas, ou polissacarídeos, podem estar em solventes que compreendem água ou um tampão aquoso. Um tampão aquoso pode compreender compostos além de água. Solução salina tamponada com fosfato (PBS), tris (hidroximetil) aminometano, HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico) e outros compostos são comumente usados para

tamponar soluções compreendendo moléculas biológicas, tais como antígenos de polipeptídeos. A subtração do componente tampão pode ser conseguida subtraindo matematicamente o espectro do tampão (obtido na ausência de uma amostra) a partir do espectro da amostra na presença de tampão.

[00043] Operações de subtração de fundo podem igualmente ser realizadas como necessário para remover outros sinais de fundo, tais como do cristal de ATR límpido.

[00044] Matematicamente, as operações de subtração espectral podem ser realizadas em um sistema de computador; a operação de subtração pode compreender um algoritmo que identifica (ou permite a um usuário identificar) regiões de um espectro compósito para subtração. Depois de identificar as regiões a ser subtraídas, a subtração é realizada para gerar um espectro de diferença resultante. O espectro de diferença pode ser apresentado graficamente ou tabulados como uma função da absorbância em um dado comprimento de onda e apresentado em forma tabular.

Método presente

[00045] O presente método de quantificação de polissorbato por ATR-FTIR baseia-se na detecção e quantificação da ligação carbonila (C=O) de polissorbato. Esta ligação está presente em cada um de polissorbato 80, polissorbato 60, polissorbato 40 e polissorbato 20. Assim, o presente método é utilizável na quantificação de qualquer um dentre polissorbato 80, polissorbato 60, polissorbato 40 e polissorbato 20. Em uma forma de realização, a amostra contém apenas uma única espécie de polissorbato (por exemplo, contém apenas polissorbato 80).

[00046] Mesmo onde a mesma quantidade de amostra é colocada sobre ATR, a quantidade exata de amostra retida sobre o elemento de ATR pode variar, assim, o presente método usa uma curva de calibração criada com um padrão interno, para normalizar a quantidade de amostra retida na ATR.

[00047] O presente método permite a determinação da concentração de

polissorbato em uma amostra de teste líquida por técnica espectroscópica ATR-FTIR sem pretratamento químico da amostra. Os presentes inventores utilizaram uma IRE de diamante para obter os espectros de FTIR de polissorbato 80. Para criar uma curva de calibração, e identificar os picos específicos de interesse, os presentes inventores usaram um conjunto de calibragem consistindo de polissorbato 80 em H₂O, em concentrações de 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, e 500 µg/ml. A área do pico (C=O) de cada espectro a 1735 cm⁻¹, quando normalizado usando um padrão interno (azida), foi verificada como sendo linearmente correlacionada com os teores de polissorbato 80 ($R^2 > 0,99$). Os resultados obtidos a partir do método ATR-FTIR foram confirmados por método de detecção de cromatografia a gás com espectrometria de massa (GC-MS).

[00048] Os exemplos aqui apresentados demonstram um método ATR-FTIR para a determinação da concentração de polissorbato nas amostras de teste de misturas complexas contendo componentes de polipeptídeos (exemplos fornecidos aqui usaram amostras vírus influenza purificado a granel, produzido em cultura de células (Flu-CC)). Será evidente para os versados na arte que a amostra usada para a quantificação deve ser representativa do lote a partir do qual ela é obtida.

[00049] O presente procedimento para quantificar polissorbato em uma formulação, incluindo formulações que compreendem componentes de antígeno, utiliza métodos que serão evidentes para os versados na técnica de espectroscopia tendo em consideração a presente descrição. Equipamento utilizável no presente método inclui, mas não está limitado a, um ATR IRE, e espectrômetro FTIR, e equipamento de processamento de dados e *software* apropriados. Os detalhes específicos do processo são regidos pelos parâmetros do equipamento e a natureza do experimento, mas uma metodologia geral é aqui descrita. Além disso, a metodologia descrita pode ser adaptada a várias propriedades da amostra sob estudo e outras considerações experimentais

pertinentes.

[00050] Uma forma de realização da invenção provê um método ATR-FTIR para quantificar polissorbato em uma amostra. Em uma forma de realização a amostra compreende um polipeptídeo e/ou uma proteína em um líquido (uma amostra de líquido), tais como polipeptídeos e/ou proteínas em água (uma amostra aquosa). Em uma forma de realização, o polipeptídeo é um antígeno de polipeptídeo.

[00051] Uma forma de realização da invenção provê um método ATR-FTIR para quantificar polissorbato em uma amostra, em que a amostra compreende um polissacarídeo, como um antígeno de polissacarídeo. Em uma forma de realização, a amostra compreende um polissacarídeo em um líquido (uma amostra de líquido), tais como polissacarídeos em água (uma amostra aquosa). Em uma forma de realização, o polissacarídeo é um antígeno de polissacarídeo.

[00052] Em uma forma de realização, a amostra de teste é de uma vacina (incluindo lotes a granel de vacina monovalente, bem como formulações de vacinas finais, incluindo formulações de vacinas polivalentes); em outra forma de realização, a amostra de teste é de uma vacina compreendendo um antígeno a partir de um organismo selecionado dentre vírus influenza, vírus de sarampo, vírus da caxumba, vírus da varicela (catapora), vírus da rubéola, vírus de herpes, o vírus da poliomielite, vírus da varíola, poxvírus, papilomavírus humano (HPV), vírus da encefalite japonesa, vírus da hepatite, tais como HepA ou HepB, rotavírus, vírus da dengue, vírus sincicial respiratório (RSV), citomegalovírus (CMV), *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitides*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella typhi*, uma espécie de *Streptococcus*, uma espécie de *Corynebacterium*, uma espécie de *Clostridium*, uma espécie de *Salmonella*, e uma espécie de *Bordetella*.

[00053] Em uma forma de realização, a amostra é conhecida como

compreendendo uma única espécie de polissorbato selecionada dentre polissorbato 80, polissorbato 60, polissorbato 40, e polissorbato 20. Quando uma única espécie de polissorbato se encontra presente na amostra, os resultados fornecem uma medição da concentração deste polissorbato. A quantidade de amostra deve ser suficiente para fornecer uma camada fina da amostra sobre o IRE.

[00054] Em uma forma de realização da presente invenção, o método emprega uma técnica de amostragem de ATR de passe único e espectroscopia de FTIR.

[00055] Em uma forma de realização, o método compreende: (a) prover uma amostra compreendendo polissorbato e um padrão interno; (b) prover um elemento de reflexão interna (IRE); (c) contatar a amostra com o IRE para formar uma interface de amostra-IRE; (d) usar um dispositivo FTIR, ou um dispositivo que contém óptica de focalização para permitir a utilização da radiação de FTIR, para dirigir um feixe de radiação infravermelho (IR) através do IRE sob condições tais que a radiação IR interage com a interface amostra-IRE ; (e) a gravar o perfil de refletância sobre a faixa de frequência de $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$; (f) compilar o perfil de absorbância da amostra em uma base de dados de computador, (g) gerar espectros de IR da amostra na faixa de frequência de $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$, e (h) calcular a área (área sob a curva) do pico a 1735 cm^{-1} ; determinar a concentração de polissorbato na referida amostra por referência a uma curva de calibração.

[00056] Em uma forma de realização, uma curva de calibração é estabelecida para cada experimento ou conjunto de amostras testado. Em uma forma de realização, uma única curva de calibração é estabelecida e usada para amostras múltiplas, em que as amostras são de misturas preparadas pelo mesmo processo. Em uma forma de realização, uma curva de calibração é estabelecida e usada para amostras múltiplas, em que as amostras são de misturas preparadas pelo mesmo processo, por um período definido de tempo.

[00057] Onde apenas a presença de uma espécie de polissorbato (e não a quantidade) deve ser detectada, uma curva de calibração não é requerida.

[00058] A especificidade do método para uma matriz particular (por exemplo, um componente de vacina particular) pode ser demonstrada usando amostras da matriz salpicadas com concentrações conhecidas de polissorbato.

[00059] Em uma forma de realização, o padrão interno é azida, e um espectro de IR da amostra na faixa de frequência de 2200-1980 cm^{-1} é gerado.

[00060] Em outra forma de realização, o padrão interno é azida, e um espectro de IR da amostra compreendendo a frequência de 1735 cm^{-1} é gerado.

[00061] Em uma forma de realização, a amostra de teste não é pretratada em um modo que altera a estrutura química de polissorbato ("pretratamento químico" ou "pretratado quimicamente"), por exemplo, o polissorbato não é complexado com cobalto-tiocianato, derivatizado, transesterificado, transbenzilado, tratado para produzir um derivado de éster, e/ou hidrolisado. Como aqui usado, a adição de um padrão interno que não altera a estrutura química do polissorbato não é considerada "pretratamento químico".

[00062] Em uma forma de realização, um padrão interno é adicionado à amostra de teste. Em uma forma de realização, o padrão interno é azida (ânion linear que é isoelétrico com CO_2).

[00063] Em uma forma de realização, o presente método de espectroscopia de ATR-FTIR para a quantificação de polissorbato pode ser usado para formulações líquidas que contêm (a) moléculas de proteína, e/ou (b) excipientes, além de um polissorbato (excipientes não polissorbato). Em uma forma de realização, o presente método de espectroscopia de ATR-FTIR para a quantificação de polissorbato pode ser usado para formulações líquidas que contêm (a) moléculas de polissacarídeos, e/ou (b) excipientes, além de um polissorbato (excipientes não polissorbato). Tais excipientes não polissorbato incluem detergentes diferentes de polissorbato, por exemplo,

TRITON™X-100 (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol, *t*-octilfenoxipolietóxi etanol, *terc*-octilfenil éter de polietileno glicol; disponível de Sigma Aldrich, St. Louis, MS) e succinato de vitamina E (VES).

[00064] Em uma forma de realização da presente invenção, o processo de aquisição de um espectro de uma amostra é automatizado usando pacotes de *software* comercialmente disponíveis apropriados para aquisição do espectro automatizada.

[00065] Em outra forma de realização, a presente invenção é totalmente automatizada e pode compreender um autoamostrador para injetar e remover amostras e um pacote de *software* de aquisição de espectro para fazer funcionar um espectrômetro de FTIR.

Termos

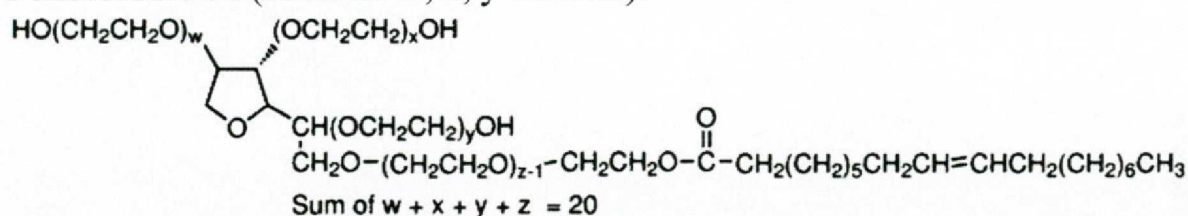
[00066] Salvo explicado em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como comumente entendido por um versado na arte à qual pertence esta descrição. As definições dos termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas em Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

[00067] Os polissorbato são derivados de sorbitano PEG-uilado (um derivado de sorbitol) esterificados com ácidos graxos. Espécies de polissorbato incluem Polissorbato 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), Polissorbato 40 (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitano), Polissorbato 60 (monoestearato de polioxietileno (20) sorbitano), e Polissorbato 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitano). A designação numérica seguinte "polissorbato" refere-se ao grupo lipofílico (monolaurato

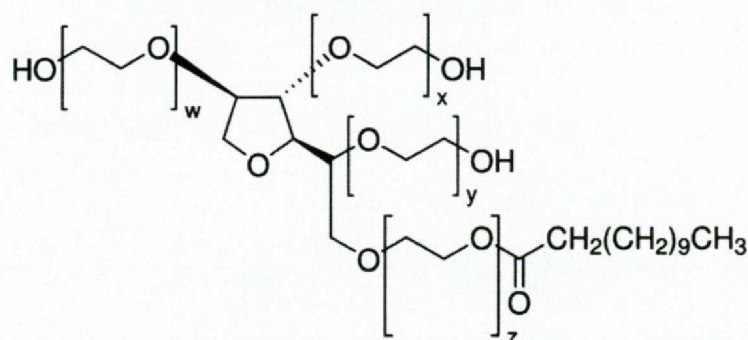
(20), monopalmitato (40), monoestearato (60) e monooleato (80)). O número vinte (20) após 'polioxietileno' refere-se ao número total de grupos oxietileno na molécula. Polissorbatos são classificados como tensoativos não iônicos. Nomes de marcas para polissorbatos incluem ALKEST™ e Tween™.

[00068] Polissorbato 80 é um tensoativo não iônico e emulsificador; nomes de marcas incluem Alkest TW 80, Canarcel e Tween 80™. Polissorbato 20 é um tensoativo não iônico e emulsificador; nomes de marcas incluem Alkest TW 20 e Tween 20™. Polissorbato 40 é um tensoativo não iônico e emulsificador; nomes de marcas incluem TWEEN™ 40. Polissorbato 60 é um tensoativo não iônico e emulsificador; nomes de marcas incluem TWEEN™ 60. As estruturas de polissorbato 80 e polissorbato 20 são mostradas abaixo.

Polissorbato 80 (soma de w, x, y e z é 20):



Polissorbato 20 (soma de w, x, y e z é 20):



[00069] Espécies de polissorbatos, incluindo polissorbato 80, polissorbato 60, polissorbato 40, polissorbato 20, e combinações dos mesmos, são usadas como excipientes em formulações médicas, incluindo vacinas, incluindo vacinas para proporcionar proteção contra influenza, infecção por papilomavírus humano (HPV), encefalite japonesa, doença pneumocócica, hepatite (HepB), e doença rotaviral; também vacinas de combinação, como a DTaP (difteria, tétano e coqueluche acelular), DTaP/Hib (DTaP mais

Haemophilus influenzae B). DTaP/IPV (DTaP mais poliovírus inativado) e DTaPHepB-IPV.

[00070] As vacinas de influenza são preparadas em vários substratos. Muitas vacinas comerciais são preparadas usando ovos de galinha. Mais recentemente, vacinas de influenza foram desenvolvidas usando linhagens de células tais como linhagens de células Madin-Darby de rim canino (MDCK), linhagem de células MRC-5 (pulmão fetal humano), linhagem de células Vero (células epiteliais do rim do macaco verde africano), linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO), linhagem de células EB66®, e linhagem de células PER.C6® (humana, Crucell (Holanda)). A linhagem de células EB66® é uma linhagem de células de pato comercialmente disponível derivada de células-tronco embriônicas (Vivalis, Nantes, França) e usada para o crescimento e produção de componentes de vacina, incluindo a produção de vírus usados na fabricação de vacinas virais, incluindo o vírus da influenza. As células EB66® são susceptíveis a infecção por diversos vírus, incluindo o vírus de influenza aviária. Métodos alternativos de produção de componentes de vacina incluem crescimento em ovos embrionados de galinha e fibroblastos de embrião de pintos primários (CEF).

[00071] Como aqui usado, uma formulação (ou solução) contendo (ou compreendendo) um componente de proteína (ou um polipeptídeo) pode ser uma composição médica, como uma composição biofarmacêutica, como uma vacina terapêutica ou uma vacina profilática, ou uma composição compreendendo um anticorpo, anticorpo monoclonal, ou porção de ligação ao antígeno dos mesmos.

[00072] Como aqui usado, uma formulação (ou solução) contendo (ou compreendendo) um componente de polissacarídeo pode ser uma composição médica, como uma composição biofarmacêutica, como uma vacina terapêutica ou uma vacina profilática.

[00073] Como aqui usado, uma vacina pode ser uma projetada e destinada a uma administração a um mamífero humano ou não humano. A vacina pode ser profilática, para proporcionar proteção contra uma doença (reduzir a possibilidade de contrair a doença), ou terapêutica (para tratar uma doença através da diminuição dos sintomas, severidade, duração ou risco de recorrência da doença). A vacina pode ser uma vacina anticâncer. A vacina pode ser monovalente ou polivalente.

[00074] Como aqui usado, uma vacina pode compreender antígenos obtidos a partir de um vírus, incluindo, mas não limitados a: o vírus da influenza, vírus do sarampo, vírus de herpes, vírus da poliomielite, vírus da varíola, poxvírus, papilomavírus humano (HPV), o vírus da encefalite japonesa, vírus da hepatite, como HepB, e rotavírus.

[00075] Como aqui usado, uma vacina pode compreender antígenos obtidos a partir de espécies bacterianas, incluindo, mas não se limitado a: *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis*, e *Haemophilus influenzae*.

[00076] Como aqui usado, cGMP significa boas práticas de fabricação correntes.

[00077] Como usado aqui, "componentes da vacina a granel" ou "lotes a granel" referem-se a um ingrediente ativo de vacina contido, ou armazenado em, um volume maior do que o volume da vacina acabada. A concentração do ingrediente ativo de vacina em um volume a granel é tipicamente maior do que a concentração do ingrediente ativo na vacina acabada. Um lote a granel é um produto intermédio na produção comercial de vacinas. Um lote a granel pode ser univalente (monovalente), isto é, contendo um antígeno purificado, bivalente ou multivalente. Um lote a granel pode conter o antígeno purificado em diferentes concentrações do que estará presente em uma formulação de vacina final (uma para uso clínico ou venda comercial). Em uma forma de realização, o lote a granel contém pelo menos um antígeno de proteína do

vírus de influenza, por exemplo, um antígeno da neuraminidase (NA) ou da hemaglutinina (HA). O lote a granel pode conter antígenos derivados de uma cepa de um patógeno, ou de múltiplas cepas de um patógeno. As formulações de vacina final podem compreender antígenos múltiplos (vacinas polivalentes), isto é, pode ser uma mistura de vários lotes a granel monovalentes, e pode compreender antígenos de vários patógenos ou de várias cepas de um patógeno. Os lotes a granel podem ser armazenados até ser necessário para a preparação final de doses de vacina. As vacinas podem estar na forma de um líquido, um adjuvante líquido ou liofilizadas.

[00078] Como aqui usado, uma amostra é uma porção representativa de um volume maior. A amostra pode ser de uma mistura, como um líquido compreendendo elementos não líquidos. A amostra pode ser uma amostra aquosa.

[00079] Como aqui usado, uma mistura compreende pelo menos dois elementos diferentes, por exemplo, uma mistura compreendendo moléculas de uma espécie de polipeptídeo e moléculas de uma espécie de polissorbato. A mistura pode estar em forma sólida ou na forma líquida.

[00080] Como aqui usado, os termos "peptídeo", "polipeptídeo" e "proteína" são usados permutáveis e significam um polímero de aminoácidos, independentemente do tamanho. Embora "proteína" seja muitas vezes usada em referência a polipeptídeos relativamente grandes e "peptídeo" seja muitas vezes usado em referência a polipeptídeos pequenos, o uso destes termos na técnica sobrepõe-se e varia. O termo "polipeptídeo" como aqui usado refere-se a peptídeos, polipeptídeos e proteínas, salvo indicação em contrário. Como aqui usada, os termos "proteína" "polipeptídeo" e "peptídeo" referem-se a ambos os produtos dos genes expressos e entidades quimicamente sintetizados, e englobam glicoproteínas e toxinas de proteínas inativadas (toxóides).

[00081] Como aqui usado, um antígeno refere-se a uma substância, incluindo peptídeos e proteínas (incluindo glicoproteínas), que induz uma resposta imune em um mamífero, incluindo um humano.

[00082] Como aqui usado, quantificação inclui a determinação de uma concentração de uma substância particular em uma amostra, por exemplo, em $\mu\text{g/ml}$, ou a determinação da quantidade total de uma substância em um volume particular.

[00083] Como aqui usado, o termo "aquoso" significa compreendendo um componente de água. Assim, uma "solução aquosa" é uma solução que compreende um componente de água. Os termos "aquosa" e "solução aquosa" especificamente englobam a inclusão de água, óxido de deutério ou ambos, como um componente de água.

[00084] Como aqui usado, o termo Elemento de Reflexão Interna (abreviado IRE) é usado de modo interpermutável com o termo cristal de ATR ou elemento de ATR, e significa um cristal, prisma ou outra estrutura que admite radiação incidente e reflete a radiação, pelo menos uma vez a partir de uma superfície (superfície refletora) sobre o interior do elemento. Em ATR-FTIR, refletância segue a interação da radiação com uma amostra em contato com a superfície refletora do IRE. Seguindo tal refletância, a radiação pode ser re-refletida ou emitida a partir do IRE. Numerosas marcas de espectrômetros podem ser usadas com ATR, por adição de um dispositivo de ATR ao espectrômetro. O espectrômetro FTIR preferivelmente tem a capacidade de fornecer energia IR para uma amostra em um ângulo de incidência predeterminado entre cerca de 30 a cerca de 60 graus, e coletar a luz refletida a partir da amostra através de uma ampla faixa de ângulos, incluindo o ângulo incidente.

[00085] IREs têm um índice de refração elevado (pelo menos maior do que o da amostra a ser testada, e normalmente entre 2,38 e 4,01 a 2000 cm^{-1}), e pode ser um cristal opticamente denso, como um cristal de germânio, um

cristal de seleneto de zinco, um cristal de diamante, ou outro material de elevado índice de refração capaz de transmitir a luz IR. A forma de um cristal de ATR depende do tipo de espectrômetro e a amostra é usada com, como é conhecido na arte.

[00086] O ângulo de incidência, como aqui usado, é o ângulo em que a luz incidente incide sobre um IRE. Na presente invenção, um elemento de ATR de diamante pode ser usado e um ângulo apropriado de incidência é de 45 graus a partir da superfície normal.

[00087] Como aqui usado, o termo “ATR de múltiplos passes” significa uma técnica de refletância total atenuada em que a radiação incidente sobre um IRE tendo pelo menos duas faces de reflexão, interage, pelo menos, duas vezes com uma face de reflexão antes de sair do IRE. Tais interações podem ser referidas como "saltos" ou "passes". ATR de múltiplos passes gera um espectro de ATR de múltiplos passes. Como aqui usado, o termo "ATR de passe único" significa uma técnica de refletância total atenuada em que a radiação incidente sobre um IRE tendo pelo menos uma face de reflexão dentro de IRE interage apenas uma vez com uma face de reflexão antes de sair de IRE (um "salto" ou “passe”). ATR de passe único gera um espectro de ATR de passe único.

[00088] Como aqui usado, uma curva de calibração usada em uma forma de realização da invenção, significa um padrão de referência criado usando as mesmas etapas como descrito no método, mas usando amostras (amostras de calibração) contendo quantidades conhecidas de uma espécie de polissorbato. As espécies de polissorbato na amostra de calibração são iguais como nas amostras de teste, e as quantidades das espécies de polissorbato na amostra de calibração abrangem uma faixa englobando a faixa razoavelmente esperada, por alguém versado na arte, para estar presente nas amostras de teste. Por exemplo, onde se espera que a concentração de polissorbato nas amostras de teste possa estar na faixa entre zero e 500 µg/ml, as amostras de calibração

contendo 0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml podem ser usadas para preparar uma curva de calibração. Qualquer unidade apropriada de área pode ser usada para a curva de calibração.

[00089] Os termos singulares "um", "uma" e "o" incluem as referências no plural, salvo se o contexto indicar claramente o contrário. Da mesma forma, a palavra "ou" destina-se a incluir "e" salvo se contexto indicar claramente o contrário. O termo "pluralidade" refere-se a dois ou mais. Além disso, limitações numéricas dadas com relação às concentrações ou níveis de uma substância e indicadas como sendo "cerca de" um determinado nível, são destinadas a ser aproximadas. Assim, sempre que uma concentração for indicado como sendo "cerca de 250 µg/ml" (por exemplo), pretende-se que a concentração seja entendida como sendo, pelo menos, cerca de (ou "cerca de" ou "~") de 250 µg/ml.

[00090] Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser usados na prática ou nos testes da descrição, métodos e materiais apropriados são descritos abaixo. O termo "compreende" significa "inclui". Assim, salvo se o contexto requerer de outra forma, a palavra "compreende" e variações como "compreendem" e "compreendendo" será entendida como implicando a inclusão de um composto ou composição indicado (por exemplo, ácido nucléico, polipeptídeo, antígeno) ou etapa, ou grupo de compostos ou etapas, mas não a exclusão de quaisquer outros compostos, composição, etapas, ou grupos dos mesmos. A abreviatura "e.g." é aqui usada para indicar um exemplo não limitativo e é sinônimo do termo "por exemplo".

[00091] Para facilitar a análise das várias formas de realização deste relatório descritivo, as seguintes explicações dos termos são dadas. Termos e explicações adicionais podem ser fornecidas no contexto da descrição.

[00092] Um método rápido e sensível foi desenvolvido para a quantificação de polissorbato em formulações líquidas, incluindo formulações

compreendendo proteínas (incluindo glicoproteínas) e/ou polissacarídeos. O método é também apropriado para a quantificação de polissorbato em formulações líquidas contendo outros excipientes (não polissorbato), e em formulações líquidas contendo tanto proteínas como outros excipientes (não polissorbato).

EXEMPLOS

Exemplo 1: Método de quantificação de polissorbato 80 por GC-MS

[00093] Cromatografia a gás - Espectrometria de Massa (GC-MS) é um método comumente usado e validado para medição do teor de polissorbato 80 em amostras de líquido.

[00094] As amostras e padrões foram tratados usando um procedimento em duas etapas:

(1) Derivatização: metanol + HCl trans-esterificação Fischer

(2) Extração do produto de derivatização: divisão hexano/ meios aquosos

[00095] Transmetilação de polissorbato 80 (usando MeOH + HCl) fornece o ácido 9-octadecenóico, éster metílico.

[00096] Um padrão interno (ácido pentadecanóico) foi usado para explicar a variabilidade da etapa de derivatização. A separação cromatográfica foi obtida usando uma coluna capilar de sílica fundida (Varian WCOT (coluna tubular aberta revestida na parede) Ulti-metal de 25m x 0,25 mm, revestida com TAP-CB DF = 010 (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Faixa de calibração foi de 50 a 2000 µg/ml. A detecção de espectrometria de massa de Polissorbato 80 e padrão interno (IS) ocorreu em m/z específica (razão de massa-para-carga).

[00097] As amostras e padrões foram preparados misturando:

200 µl de amostra ou padrão

200 µl ácido pentadecanóico (padrão interno, IS)

400 µl de MeOH/HCl 4N.

[00098] As amostras (ou padrões) foram, então, aquecidos durante uma hora a 80°C, e 400 µl de hexano foi adicionado para extrair o derivado de éster metílico. As amostras (ou padrões) foram, então, centrifugados durante cinco minutos a 11000 rpm. A fase de hexano foi coletada e analisada por GC-MS.

[00099] A Tabela 1 mostra a razão de massa-para-carga (m/z) usada para detecção de GC-MS do Padrão Interno e Polissorbato 80, e o tempo de retenção destes componentes.

TABELA 1

Análito	m/z	Tempo de retenção
Ácido pentadecanóico (IS)	256-143	9,29 min
Polissorbato 80	264-296	10,69 min

[000100] A Figura 1 é um exemplo de um cromatograma GC-MS no modo SIM mostrando o pico de polissorbato 80. O primeiro pico corresponde ao padrão interno (quantidade conhecida), e o segundo pico (rotulado TIC: 25.D\data.ms 10,686 (TIC = Contagem total de íons)) corresponde ao polissorbato derivatizado. O número de contagens indica abundância.

Exemplo 2: Procedimento ATR-FTIR

[000101] Um método de quantificação de polissorbato usando ATR-FTIR foi desenvolvido usando amostras obtidas durante a produção de componentes de vacina inativada a granel contra influenza.

[000102] Vírus Influenza foi produzido em células EB66®. A coleta viral foi separada das células e purificada para produzir um concentrado a granel usando as seguintes etapas sucessivas: centrifugação, microfiltração, ultrafiltração, ultracentrifugação de gradiente de sacarose, inativação de β-propiolactona, inativação com luz ultravioleta (UV), ultrafiltração, subdividida (ruptura e inativação do vírus total), ultracentrifugação, cromatografia, ultrafiltração, filtração 0,22 µm.

[000103] Os volumes a granel finais purificados compreendiam antígenos de proteína de influenza e excipientes.

[000104] Os espectros de ATR-FTIR foram registrados em temperatura ambiente em um espectrofotômetro de feixe simples TENSOR™ 27 FT-IR (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha) equipado com um detector de mercúrio/cádmio/telureto resfriado com nitrogênio líquido a uma resolução nominal de 4 cm^{-1} e codificado cada um em cm^{-1} . O espectrofotômetro foi continuamente purgado com ar seco. Um espectro de absorbância de fundo foi realizado antes de cada amostra (IRE sem amostra). Este "branco" foi subtraído do espectro medido da amostra pelo *software* usado.

[000105] Aproximadamente $1\text{ }\mu\text{L}$ da amostra foi espalhado sobre o elemento de reflexão interna (IRE) e o solvente foi evaporado lentamente sob uma corrente de nitrogênio suave. O IRE era um cristal de diamante (Golden Gate Reflectance ATR, Reflex Analytical Corporation, Ridgewood, NJ, EUA; reflexão única) transparente para a radiação infravermelho de interesse (IR). Um alojamento óptico selável e purgável padrão foi usado; foi usado um interferômetro de Michelson.

[000106] Para cada amostra, foram registrados os espectros de $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ e para cada amostra varreduras múltiplas foram obtidas em média.

[000107] Região de espectro $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ é atribuída à cadeia alifática de polissorbato 80; pico de $2200\text{--}1980\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao padrão interno (azida); pico a 1735 cm^{-1} é de polissorbato 80 (alongamento $\text{C}=\text{O}$); pico a 1100 cm^{-1} é atribuída à ligação C-O de polissorbato 80. (Ver Coates, The Interpretation of Infrared Spectra: Published Reference Sources, Applied Spectroscopy Review, Vol. 31 (1–2), 179–192 (1996); Smith, Infrared Spectral Interpretation, a Systematic Approach, CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.) As áreas de pico (I), (III) e (IR) foram normalizadas, usando a área de pico de azida (II) (padrão interno).

[000108] Como descrito nos Exemplos 3 e 4, curvas de calibração foram criadas usando amostras de calibração contendo quantidades conhecidas de polissorbato, e foram identificados picos específicos de interesse, usando

padrões de referência com concentrações conhecidas de polissorbato 80. Os padrões de referência foram (1) soluções de polissorbato 80 em H₂O (20, 50, 100, 250 e 500 µg/ml), e (2) as amostras de Flu-CC purificadas a granel com concentrações conhecidas de polissorbato 80 adicionadas. Os padrões de referência também continham azida como padrão interno (0,2% de azida p/v; diluída dez vezes para dar 0,02% de azida final). A análise dos dados foi realizada usando o software OPUS (Bruker Optics, Alemanha) e Matlab (Mathworks Inc., USA).

[000109] Modos vibracionais gerais estão representados na Figura 2. Meio-infravermelho, aproximadamente 4000-400 cm⁻¹ (1,4-3,0 µm), é usado para estudar as vibrações fundamentais e estrutura associada. Por exemplo, os modos vibracionais para um grupo CH₂ incluem alongamento simétrico (ν_s CH₂ aproximadamente 2853 cm⁻¹), alongamento assimétrico (ν_{as} CH₂ aproximadamente 2926 cm⁻¹), flexão em plano ou corte (δ_s CH₂ aproximadamente 1465 cm⁻¹), flexão em plano ou balanço (ρ CH₂ aproximadamente 720 cm⁻¹), flexão fora do plano ou abano (w CH₂ 1350-1150 cm⁻¹), flexão fora do plano ou torção (τCH₂ 1350-1150 cm⁻¹).

Exemplo 3: Detecção ATR-FTIR de polissorbato em água

[000110] Usando o método como descrito no Exemplo 2, a concentração de polissorbato foi investigada usando 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml de polissorbato 80 em água (única amostra inicial diluída para criar as diferentes concentrações). Cada amostra continha azida (0,02% p/v) como um padrão interno.

[000111] A Figura 3 mostra um exemplo de espectros obtidos a partir das diluições de polissorbato 80/água. Cada linha representa uma das amostras (20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml de polissorbato 80 em água), e é um valor médio de 32 varreduras (resultados em média de 256 varreduras por amostra foram também preparados (não mostrados), e deram a mesma correlação como os resultados médios de 32 varreduras). Região de

espectro 3000 - 2800 cm^{-1} é atribuído à cadeia alifática de polissorbato 80; pico de 2200 - 1980 cm^{-1} corresponde ao padrão interno (azida); pico a 1735 cm^{-1} é de polissorbato 80 (alongamento C = O); pico a 1100 cm^{-1} é atribuído à ligação C-O de polissorbato 80. (Ver Coates, *The Interpretation of Infrared Spectra: Published Reference Sources*, *Applied Spectroscopy Review*, Vol. 31 (1-2), 179-192 (1996); Smith, *Infrared Spectral Interpretation, a Systematic Approach*, *CRC Press*, Boca Raton, FL, 1999.)

[000112] As cinco linhas da Figura 3 representam as cinco amostras de diluição de polissorbato/ água. As áreas de pico (I), (III) e (IR) são polissorbato normalizado usando a azida (padrão interno, mostrado na área do pico (II)).

Região (I) 3000-2800 cm^{-1} = cadeia alifática polissorbato;

Região (II) 2200-1980 cm^{-1} = padrão interno, azida;

Região de pico (III) a 1,735 cm^{-1} = polissorbato-1 (C = O);

Região (IR) pico a 1100 cm^{-1} = polissorbato (C-O).

[000113] As áreas de pico (I), (III) e (IR) foram identificadas como aumentando como uma função da concentração de polissorbato 80.

[000114] A partir destes cinco espectros, a regressão linear da Figura 4 foi traçada. A Figura 4 mostra em gráfico as proporções de áreas de pico (I, III e IR; normalizadas usando o padrão interno). A área é expressa em unidades arbitrárias. A dose-resposta de polissorbato 80 foi mostrada como sendo linear nesta faixa com coeficientes de determinação R^2 acima de 0,99 por pico (III) e (IR).

Exemplo 4: Detecção ATR-FTIR de polissorbato em amostras de Flu-CC a granel

[000115] Para demonstrar que a matriz não teve qualquer impacto sobre a medição de polissorbato, polissorbato 80 (nas quantidades de 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ e 500 $\mu\text{g/ml}$) foi adicionado às amostras de Flu-

CC a granel. As amostras continham azida como um padrão interno, e foram investigadas usando ATR-FTIR como descrito nos Exemplos 2 e 3.

[000116] A Figura 5 mostra um exemplo de espectros obtidos a partir de amostras de polissorbato 80/Flu-CC. As cinco linhas na Figura 5 representam as cinco amostras polissorbato/gripe diferentes, em média de 32 varreduras, e normalizadas usando o padrão interno de azida. (áreas de pico (I), (II) e (III) são como descritas na Figura 3.)

[000117] O pico a 1735 cm^{-1} (III) foi identificado como aumentando com precisão com quantidades adicionadas de polissorbato 80. Devido à complexidade da matriz, somente o pico (III) pode ser usado para identificar e quantificar polissorbato 80 em amostras de Flu-CC. Ver os coeficientes de linearidade abaixo.

[000118] A Figura 6 mostra a regressão linear traçada em gráfico para (I) e (III), usando os cinco espectros da Figura 5. A área é expressa em unidades arbitrárias. A dose-resposta de polissorbato 80 foi mostrada como sendo linear nesta faixa com coeficiente de determinação r^2 superior a 0,99 para pico (III). Isto indica que a matriz não impacta de modo significativo a medição de polissorbato, e, assim, polissorbato em água pode ser usado como uma curva de calibração.

Exemplo 5: ATR-FTIR Detecção de Polissorbato em padrões de referência e amostras de Influenza

[000119] Os dados obtidos nos Exemplos 3 e 4 foram usados para calcular valores de recuperação, como mostrado na Tabela 2 (valor de recuperação = % de quantidade conhecida de polissorbato que foi medido).

Tabela 2

Amostra	20µg/ ml	50µg/ ml	100µg /ml	250µg/ ml	500µg/ ml	Média
Polissorbato 80 em H ₂ O	86%	110%	104%	96%	101%	99%
Flu-CC a granel com polissorbato 80 adicionado	80%	89%	88%	90%	98%	89%

Exemplo 6: Uso de padrão interno

[000120] As Figuras 7 e 8 ilustram o efeito do uso do padrão interno na medição de polissorbato Flu-CC a granel. A Figura 7A é uma vista ampliada de um exemplo de pico III obtido usando o método ATR-FTIR como descrito no Exemplo 2, para três amostras (os resultados são uma média de 256 varreduras) sem normalização. A Figura 8A é uma vista ampliada de um exemplo de Pico III obtido usando o método ATR-FTIR, como descrito no Exemplo 2, para três amostras (resultados são uma média de 256 varreduras), onde os picos foram normalizados usando o padrão interno (área do pico dividida pela área do pico de padrão interno).

[000121] As Figuras 7B e 8B mostram em gráfico as áreas de pico versus concentração de polissorbato (eixo X, $\mu\text{g/ml}$) para as Figuras 7 e 8, respectivamente. A normalização melhora a linearidade da resposta ($R^2=0,9933$).

Exemplo 7: Quantificação polissorbato em amostras de Flu-CC em massa

[000122] Tabela 3: Quantificações de polissorbato em amostras de Flu-CC a granel usando GC-MS (método como descrito no Exemplo 1) e ATR-FTIR (método como descrito no Exemplo 2). Todas as amostras são a granel purificadas ou a granel final. A presença de polissorbato foi devido ao processo de purificação utilizado.

Tabela 3- Todos os antígenos produzidos em cultura de células

amostras Flu-CC (números de lote)	GC-MS: concentração polissorbato 80 $\mu\text{g/ml}$	ATR-FTIR: concentração polissorbato 80 $\mu\text{g/ml}$	Razão de medições GC-MS/ATR- FTIR
DFCPB002 -Final	216	249	0,87
DFCPB003 -final	124	175	0,71
DFCPB004- final	201	233	0,86
DFCPBDA001	368	372	0,99
DFCPBDA003	1124	1088	1,03
DFCPBDA004	411	387	1,06
DFCPBDA005	281	321	0,88
DFCPBDA006	304	306	0,99
EB66-61 Lote A	382	392	0,97

EB66-61 Lote B	356	316	1,13
EB66-69 Lote A	255	204	1,25
EB66-69 Lote B	326	309	1,06
EFCPAHA016-A	268	294	0,91
EFCPAHA026	122	128	0,95
EFCPAHA028	129	191	0,68
EFCPAHA037	338	351	0,96
EFCPAHA038	737	789	0,93

[000123] A comparabilidade dos resultados indica que o método ATR-FTIR é um método alternativo confiável para a quantificação de polissorbato. O uso do presente método de ATR-FTIR para a quantificação de polissorbato não requer pré-tratamento químico da amostra, e não mostra a interferência a partir da matriz de Flu-CC a granel purificada.

[000124] A Tabela 4 mostra a quantificação de polissorbato 80 em amostras obtidas em diferentes momentos durante o processamento de lote EB66-69 (cultura de células). Foi observada boa correlação de dados entre os dois métodos de medição.

Tabela 4: Quantificação de Polissorbato (GC-MS e ATR-FTIR)

Etapas do processo	Tampão amostra	Amostra	Polissorbato 80		Medida (µg /ml)
			Conc. medida (GC-MS µg /ml)	Conc. medida (ATR-FTIR µg /ml)	
EB66-69					
Ultrafiltração	PBS	UF1	<51	<LOQ	0
Ultracentrifugação	PBS- Tx100	SN	802	75	0
Ultracentrifugação	PBS-Tx100	SN	858	<LOQ	0
Remoção do detergente	PBS-Tw80-Tx100-VES	FT	<51	18*	50-200
Ultrafiltração	PBS-Tw80-Tx100-VES	UF2	520	539	100-500
Filtração esterilizadora	PBS-Tw80-Tx100-VES	A granel	255	219	100-500

*Ruído

LOQ = limite de quantificação

[000125] Como mostrado na Tabela 4, a técnica de GC-MS indicou a presença de polissorbato antes da adição de polissorbato 80.

[000126] A Figura 9 compara a medição ATR-FTIR na área do pico III, usando amostras a partir de dois pontos diferentes no processo. A amostra "divisão SN" foi tomada antes de qualquer polissorbato ser adicionado durante o processamento de purificação. A Figura 9 não mostra nenhuma interferência na zona do Pico III. Compare a amostra "PBS-a granel", tomada em um ponto na purificação depois de polissorbato ser adicionado. Este exemplo contém polissorbato (rotulado como TWEEN80 no gráfico). A Figura 9 demonstra a especificidade da presente técnica de ATR-FTIR para a medição de polissorbato em uma amostra contendo proteínas.

Referências adicionais

Baulsir e Simler, Design and evaluation of IR sensors for pharmaceutical testing, *Advanced Drug Delivery Reviews* 21(3): 191-203 (Out 1996)

Blanco et al., Analytical control of pharmaceutical production steps by near infrared reflectance spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 392(2-3):237 (1999)

Chang et al., Study of Interaction of Tributyl Phosphate, Non-ionic Surfactant and Water by FT-Infrared Spectrum. ISEC 2002, Cape Town, South Africa, 131-136, 2002

Hillgren et al., Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH, *International Journal of Pharmaceutics* 2002 237:1-2 (57-69)

Kato et al., Determination of polysorbates in foods by colorimetry with confirmation by infrared spectrophotometry, thin-layer chromatography, and gas chromatography, *J Assoc Off Anal Chem.* 1989 Jan-Feb;72(1):27-9.

Kerwin et al., Effects of tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long- term storage at -20 °C of a recombinant hemoglobin, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998 87:9 (1062-1068)

Kishore et al., The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics. Pharm Res. Maio de 2011;28(5):1194-210. Epub 3 de março de 2011.

Li et al., Effect of poly(ethylene glycol) stearate on the phase behavior of monocaprato/Tween80/water system and characterization of poly(ethylene glycol) stearate-modified solid lipid nanoparticles, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2008 317:1-3 (352-359)

Schwegman et al., Evidence of partial unfolding of proteins at the ice/freezing-concentrate interface by infrared microscopy, Journal of Pharmaceutical Sciences 2009 98:9 (3239-3246)

Tian et al., Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles, Int J Nanomedicine. 2011;6:445-52. Epub 23 Feb. 2011.

Xie et al., Improvement of antifouling characteristics in a bioreactor of polypropylene microporous membrane by the adsorption of Tween 20, Journal of Environmental Sciences Volume 19, Issue 12, 2007, Páginas 1461-1465

Xie et al., Surface modification of polyethylene membrane by adsorption of Tween 20 to improve antifouling characteristics in a bioreactor, Environmental Science and Technology, 2009

Xie et al., Surface modification of polypropylene microporous membranes by the adsorption of non-ionic surfactants, Chinese Journal of Polymer Science (English Edition) 24(4), Julho 2006, pags. 421-429

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

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

Yelenskii, et al., Phase state determination of tween-80-water binary mixtures

by IR spectroscopy, Moscow University Chemistry Bulletin, 47 (6), pp. 386-392 (2006)

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

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar a concentração de uma espécie de polissorbato em uma mistura que conhecidamente contém uma única espécie de polissorbato, caracterizado pelo fato de compreender:

- a) obter uma amostra de teste da referida mistura;
- b) adicionar um padrão interno à referida amostra de teste;
- c) obter, com um espectrômetro, espectros de refletância total atenuada meio-infravermelho (ATR) da amostra de teste;
- d) identificar, a partir dos espectros de refletância, um número de onda correspondendo ao pico de C=O da dita espécie de polissorbato;
- e) identificar, a partir dos espectros de refletância, um número de onda correspondendo ao padrão interno;
- f) calcular a área sob a curva para referido número de onda C=O, normalizado pelo padrão interno; e
- g) comparar referida área normalizada a uma curva de calibração para determinar a concentração de espécie de polissorbato na referida amostra de teste.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida mistura compreende um antígeno proteico, opcionalmente selecionado a partir do grupo consistindo em proteínas do vírus de influenza; proteínas da hemaglutinina de influenza (HA); proteínas da neuraminidase de influenza (NA); proteínas do vírus do sarampo, proteínas do vírus da caxumba, proteínas do vírus de varicela (catapora), proteínas do vírus da rubéola, proteínas do vírus da dengue, proteínas do vírus sincicial respiratório (RSV), proteínas de citomegalovírus (CMV), proteínas do papilomavírus humano (HPV); proteínas do vírus da hepatite A; proteínas do vírus da hepatite B; proteínas de rotavírus; proteínas de poliovírus; proteínas do vírus do sarampo; proteínas do vírus do herpes; proteínas do vírus da varíola; proteínas de poxvírus; proteínas de *S. pneumococcus*; proteínas de

Haemophilus influenzae B; proteínas de *Corynebacterium diphtheria*; proteínas de espécie *Corynebacterium*; proteínas de *Clostridium tetani*; proteínas de espécie *Clostridium*; proteínas *Bordetella pertussis*; e proteínas de espécie *Bordetella*.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida mistura compreende um antígeno de polissacarídeo, opcionalmente selecionado dentre o grupo consistindo em polissacarídeos de espécie *Streptococcus*; polissacarídeos de *Streptococcus pneumonia*, polissacarídeos de *Neisseria meningitides*; polissacarídeos de *Haemophilus influenza*; polissacarídeos de espécie *Salmonella*; e polissacarídeos de *Salmonella typhi*.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida amostra de teste não é pretratada quimicamente antes de obter os espectros de refletância total atenuada no meio-infravermelho da amostra de teste.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a única espécie de polissorbato é polissorbato 80, e o número de onda correspondendo ao pico de C=O é de aproximadamente 1735 cm^{-1} .

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o referido padrão interno é azida.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida amostra de teste é uma amostra líquida.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida mistura compreende excipientes não polissorbato.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida mistura compreende um

excipiente não polissorbato selecionado dentre 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol, *t*-octilfenoxipolietoxietanol, *terc*-octilfenil éter de polietileno glicol e succinato de vitamina E (VES).

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida mistura é um componente de vacina a granel.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida amostra de teste é colocada em contato com um único elemento de refletância interna (IRE) antes da obtenção dos espectros de ATR.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida amostra de teste é colocada em contato com um elemento de refletância interna múltiplo (IRE) antes da obtenção dos espectros de ATR.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a amostra é secada sob nitrogênio antes da obtenção dos espectros.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida mistura é uma solução aquosa compreendendo uma única espécie de polissorbato, em que a dita espécie de polissorbato é polissorbato 80, e em que o referido método compreende a adição de azida à referida amostra de teste como um padrão interno; medindo a área do pico a 1735 cm^{-1} e a $2200\text{-}1980\text{ cm}^{-1}$ usando ATR-FTIR; normalizando a referida área de pico a 1735 cm^{-1} com referida área de pico a $2200\text{-}1980\text{ cm}^{-1}$, e determinando a área de pico normalizada a 1735 cm^{-1} .

FIGURA 1

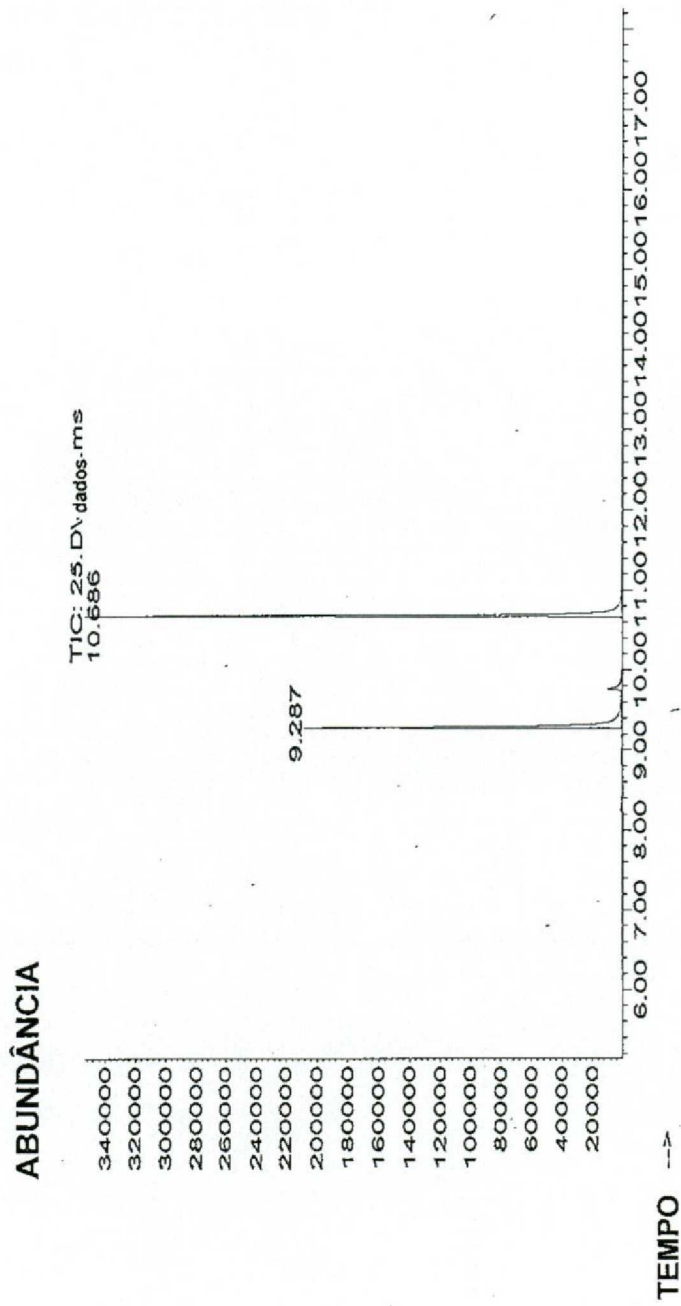


FIGURA 2

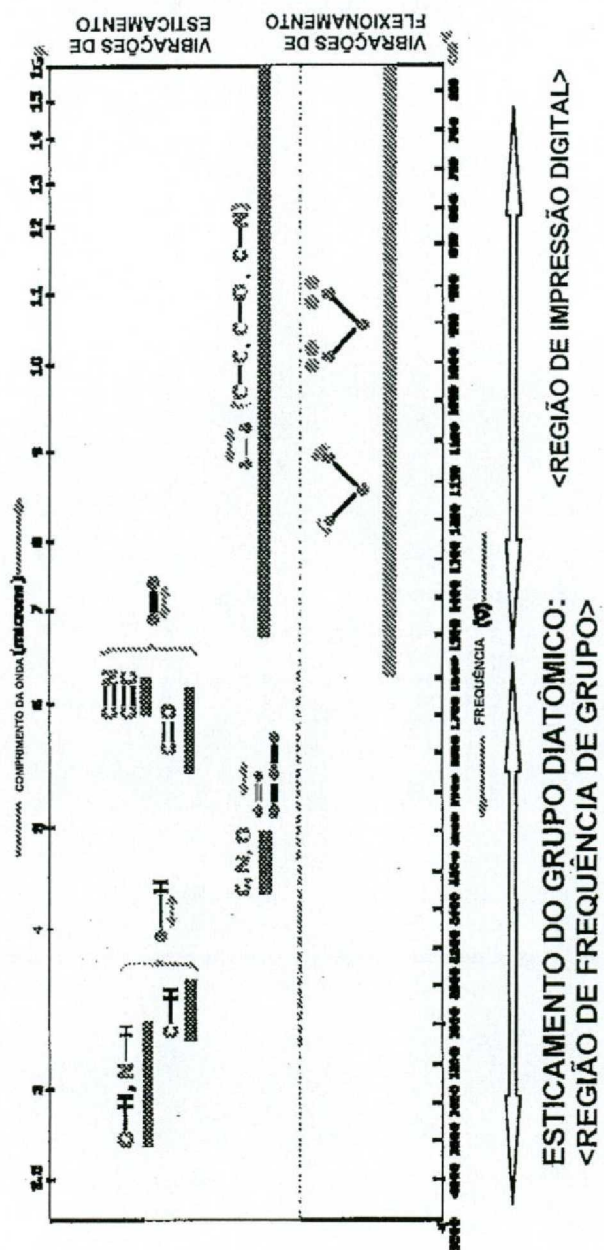


FIGURA 3

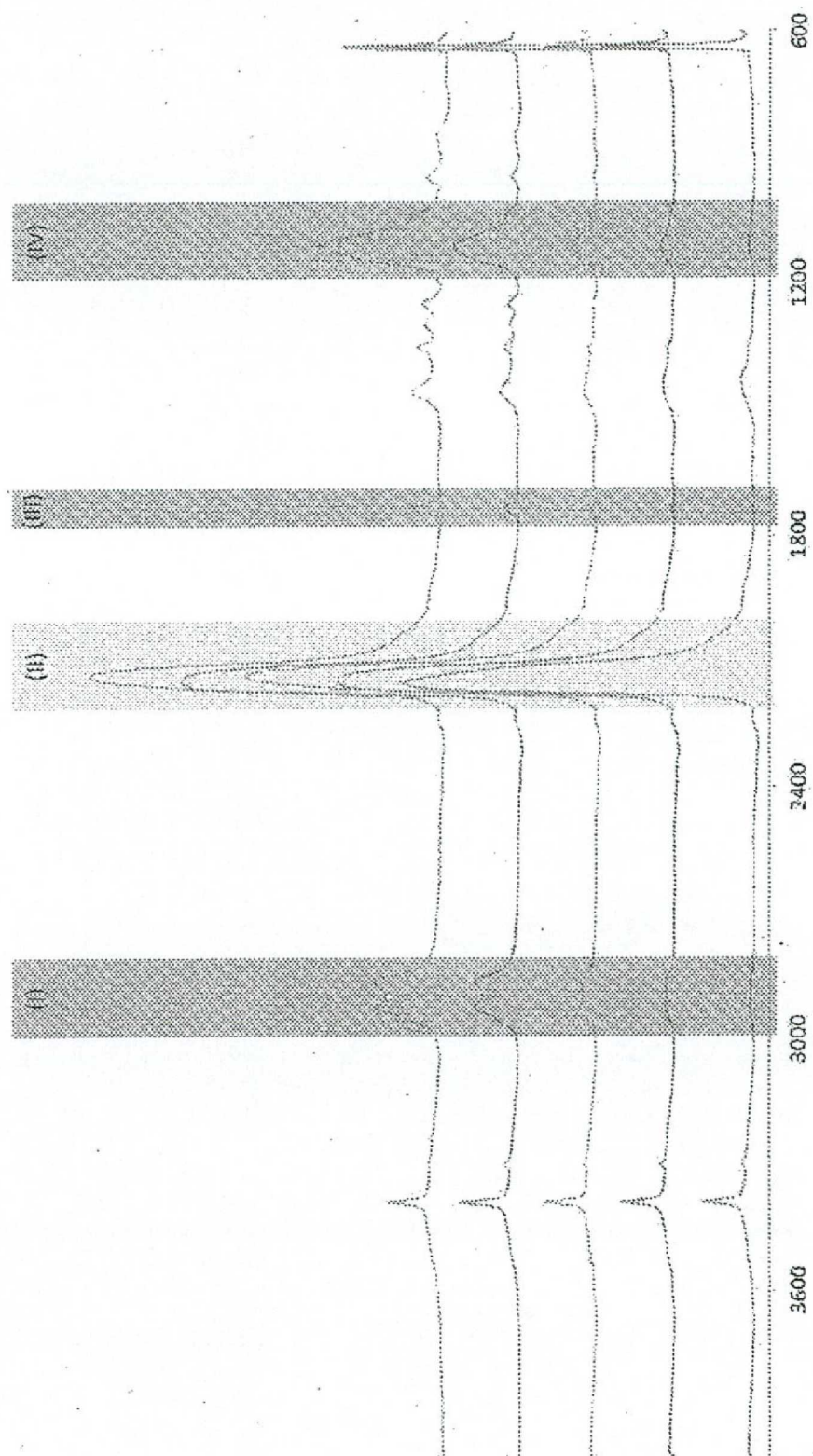


FIGURA 4

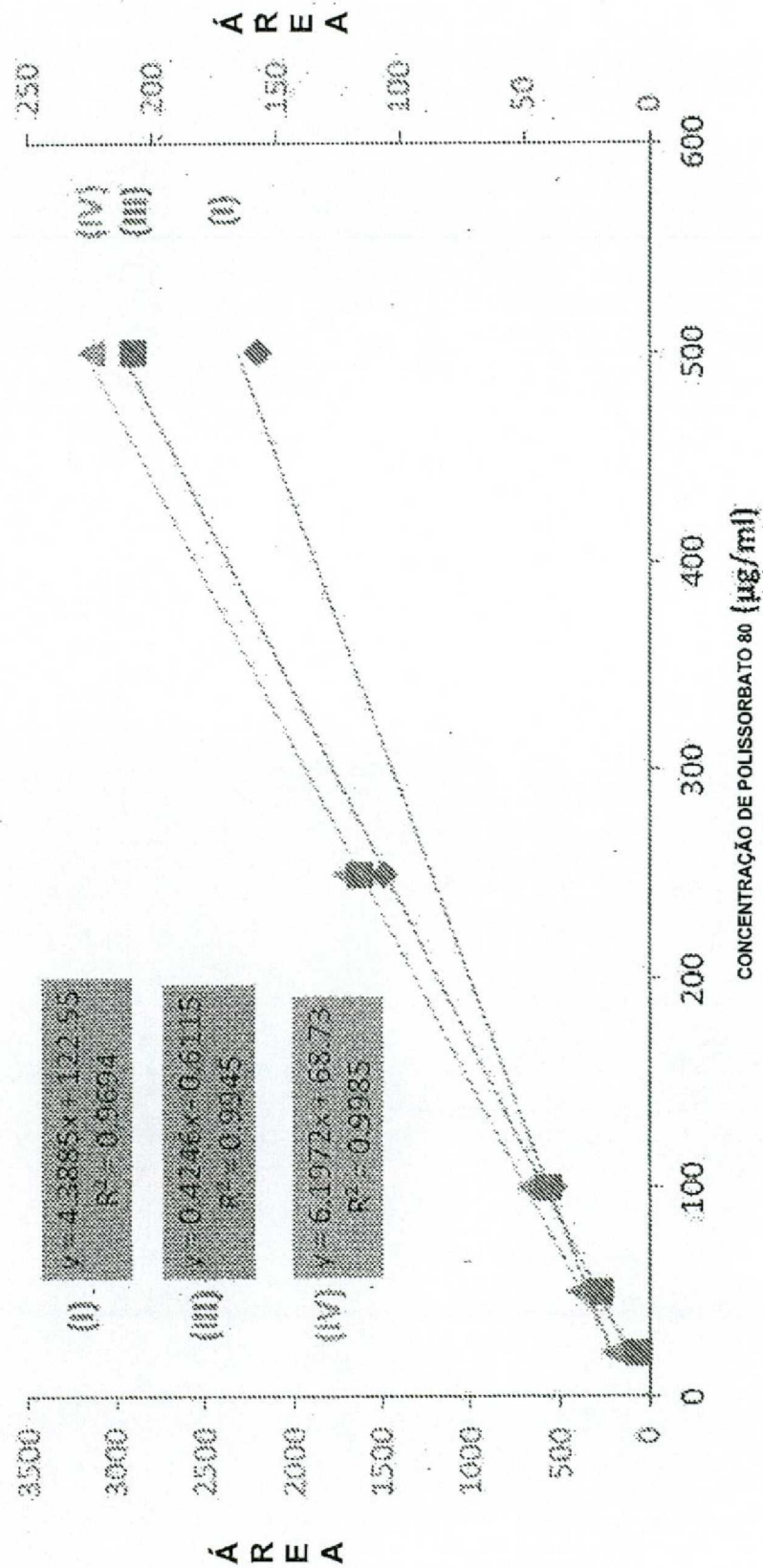


FIGURA 5

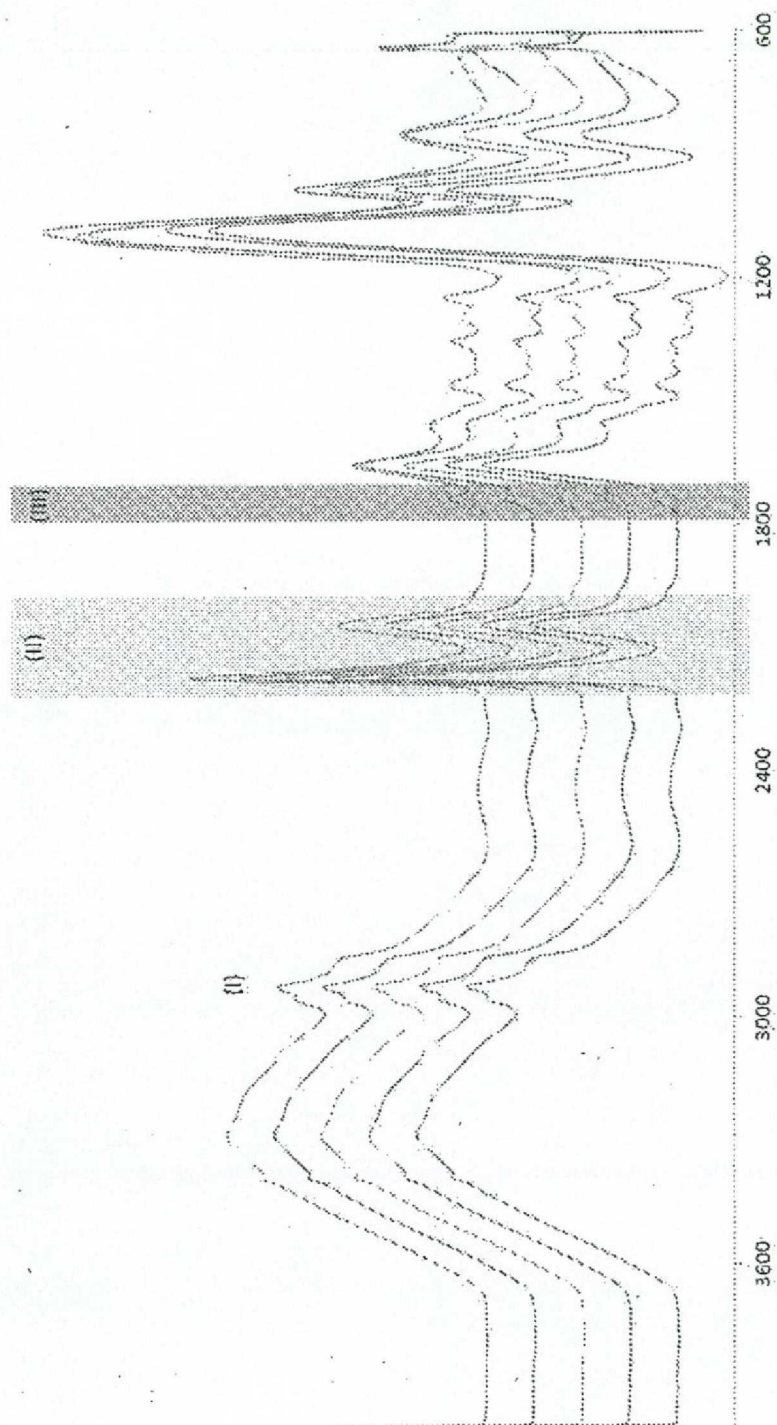


FIGURA 6

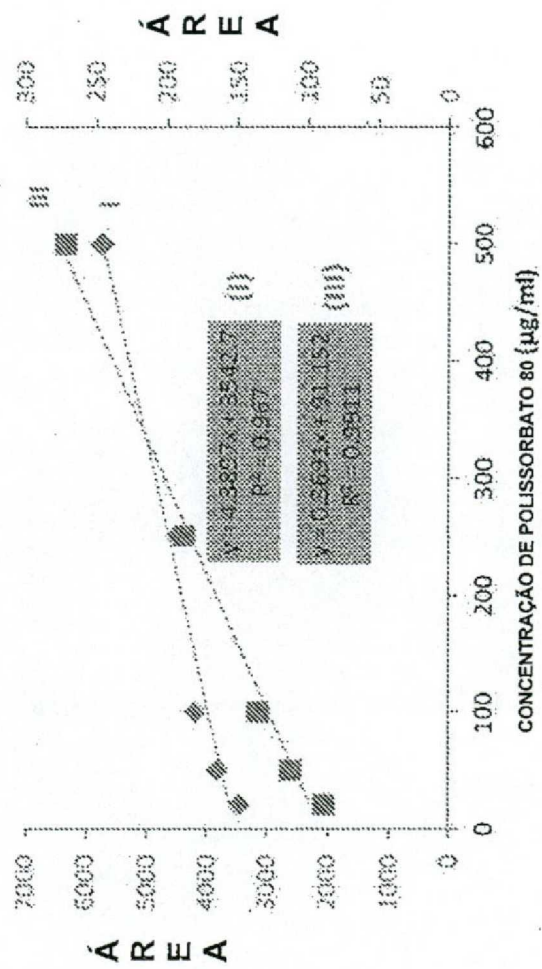
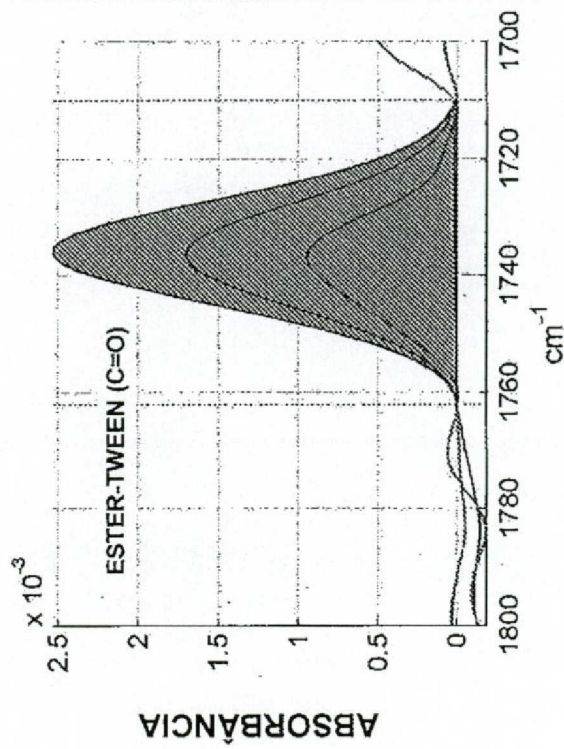


FIGURA 7A

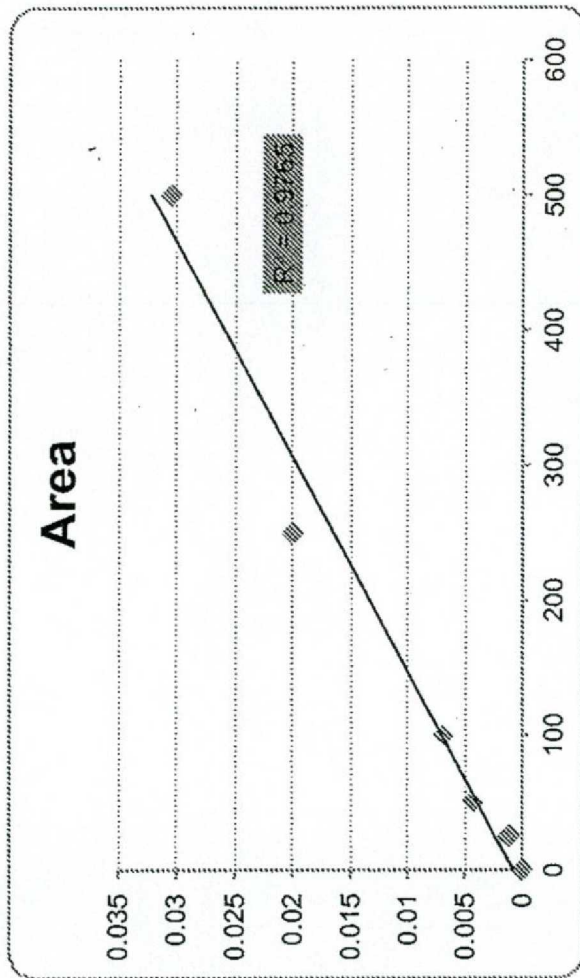


UMA APROXIMAÇÃO NA ÁREA DE INTERESSE.

7A É ÁREA DE TWEEN APENAS (PARA CONCENTRAÇÕES DIFERENTES).

MOSTRA QUE A RESPOSTA NÃO É TÃO BOA.

FIGURA 7B



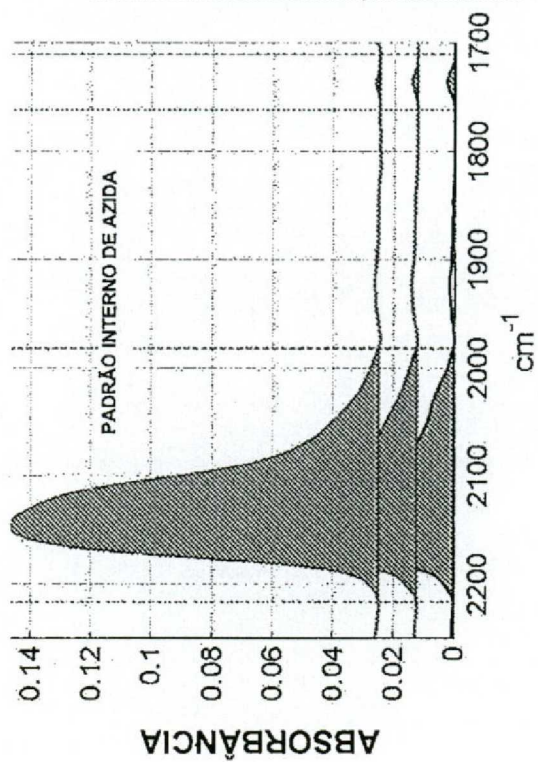


FIGURA 8A

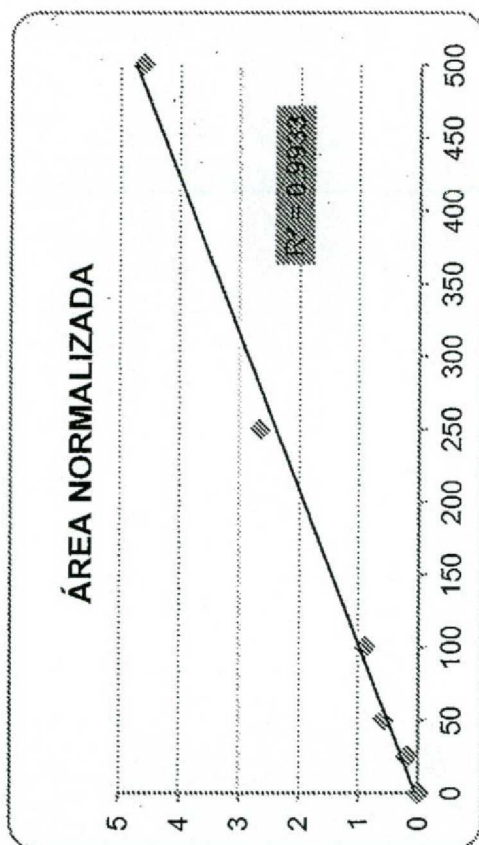


FIGURA 8B

FIGURA 9

