



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 984**

51 Int. Cl.:

**G01N 31/22** (2006.01)

**G01N 21/78** (2006.01)

**C11D 1/00** (2006.01)

**C07K 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04731652 .6**

96 Fecha de presentación : **07.05.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1620718**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

54

Título: **Método de cuantificación del tensoactivo de una preparación proteínica.**

30

Prioridad: **07.05.2003 GB 0310347**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73

Titular/es: **Novozymes Biopharma DK A/S**  
**Krogshøjvej 36**  
**2880 Bagsvaerd, DK**

72

Inventor/es: **Morton, Philip Harvey y**  
**Cameron, Jason**

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

**ES 2 316 984 T3**

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

# ES 2 316 984 T3

## DESCRIPCIÓN

Método de cuantificación del tensoactivo de una preparación proteínica.

5 La presente invención se refiere a un método para eliminar componentes de una preparación de tensoactivo, y para evaluar un tensoactivo en una preparación.

10 La formación de partículas después del tratamiento con calor de preparaciones proteínicas, tales como albúmina de suero humano (F-ISA) y albúmina de humano recombinante (rHA), es un problema conocido (EP 0 341 103). Se considera que las partículas se forman a través de la desnaturalización de la proteína en la interfaz de aire/líquido y en otras superficies hidrofóbicas (Manning, M.C., Patel, K. & Borchart, R.T. (1989), *Pharmaceutical Research*, 6, 903-918; Thurow, F-I. & Geisen, K. (1984), *Diabetologia*, 27, 212-218). La formación de partículas puede ser inhibida por la adición de tensoactivos a la preparación proteínica.

15 Es posible usar polisorbato 80 a una concentración de 10-20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  o más como un formulante para el producto final de rHA para prevenir la formación de partículas. EP 0 341 103 discute el uso de varios tensoactivos a concentraciones de hasta 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para estabilizar soluciones de albúmina humana. Muchas otras preparaciones proteínicas farmacéuticas incluyen tensoactivos. Por ejemplo, Orthoclone OKT3 (Janssen-Cilag GmbH, Alemania) contiene polisorbato 80 a aproximadamente 0,2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; Activase 50 (Genentech, Inc., aprox., EEUU) contiene polisorbato 80 a  $\sim 4$   $\text{mg}$  por frasco en un volumen total de 50 mL; Vepesid J 100 (Bristol Laboratories NJ, EEUU) contiene entre otros ingredientes 400 mg de polisorbato 80; y NovoSeven 240 (Novo Nordisk NS, Dinamarca) contiene entre otros ingredientes 0,65 mg de polisorbato 80.

25 Por lo tanto, los agentes tensoactivos pueden representar un formulante significativo en una preparación proteínica incluyendo preparaciones proteínicas farmacéuticas. Como tal, hay un requisito regulador para su evaluación en el producto final. La exactitud del ensayo es particularmente importante en el caso de preparaciones farmacéuticas. No obstante, no es posible valorar el contenido de tensoactivo con precisión en presencia de proteína porque las técnicas de detección empleadas para tensoactivos, tales como la espectroscopia, cromatografía en fase líquida de alto rendimiento, tensiometría interfacial, electroforesis capilar, titulaciones con carbono orgánico total (TOC), y TLC etc., también detectan la proteína. Así el contenido de proteína conduce a una sobre-estimación de contenido de tensoactivo.

30 Garewal (*Anal. Biochem.*, 54, 319-324, 1973) proporcionó un método para evaluar el contenido de tensoactivo de una solución de proteína acuosa. El protocolo enseña, como una primera fase, la adición de etanol para disgregar micelas, seguido de la adición de cobaltotiocianato de amonio (ACT). El método ejemplificado por Garewal usaba una solución acuosa del tensoactivo Triton X-100, al que ACT se enlaza y forma un complejo de color azul. Garewal luego añadió una fase orgánica no miscible (dicloruro de etileno) donde el complejo ACT-Triton X-100 es soluble. El complejo emigra en la fase orgánica y la fase orgánica es separada de la fase acuosa. Finalmente, el contenido de Triton X-100 de la fase orgánica es determinado registrando el espectro de la fase orgánica de 580 nm a 700 nm; la diferencia en absorbencia a 622 nm y 687 nm debe ser proporcional a la cantidad de tensoactivo Triton presente.

40 Garewal investigó el efecto en la eficacia del método de introducción de una proteína, la albúmina de suero bovino (BSA), en la solución acuosa de Triton X-100. Se investigaron las concentraciones de BSA hasta 666  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El uso de menos concentraciones de BSA, p. ej. 267  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , provocó una reducción en la eficacia de extracción hasta aproximadamente el 85%, pero el aumento de la concentración proteínica hasta 666  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  no se consideró que causara ninguna reducción significativa adicional en la eficacia de la extracción. Garewal concluyó que, puesto que los grupos poli(óxido de polietileno), con los cuales ACT reacciona, son raros en componentes biológicos (p. ej. proteínas), un mínimo de interferencia está previsto y el método descrito allí es apropiado para ensayos bioquímicos.

50 El método de Garewal ha prevalecido como el método de elección para la cuantificación de tensoactivo en preparaciones biológicas durante los últimos 30 años. Con modificaciones menores, el método de Garewal fue presentado en WCBP 2002, 6º Simposio en la interfaz de Ciencias reguladoras y analíticas para Productos de salud de biotecnología (enero 27-30, 2002) por Lanteigne, D. & Kobayashi, K. de Biogen, Inc., Cambridge, MA EEUU en un cartel titulado "Determinación cuantitativa de polisorbato en productos biofarmacéuticos formulados a base de proteínas por un método colorimétrico directo". El cartel describe un ensayo para polisorbato 80 (vendido bajo la marca registrada "Tween 80") en una preparación de anticuerpo monoclonal a 52  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Lanteigne & Kobayashi declaran que, cuando las muestras contienen una concentración "elevada" de proteína (p. ej. 52  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), entonces es preciso usar "una fase de eliminación de la proteína para eliminar una posible interferencia por la sustancia farmacológica activa" (es decir, por la proteína). Lanteigne & Kobayashi se refieren a esto por la precipitación de etanol de la proteína en una preparación, implicando la incubación durante toda la noche de la muestra a menos 30°C (más centrifugado y aislamiento del sobrenadante), antes de complejar el tensoactivo por la adición de ACT y de la extracción del complejo ACT-tensoactivo usando diclorometano como una fase líquida orgánica.

65 No obstante, después de las investigaciones, se encontró sorprendentemente que, a diferencia de sus conclusiones, el método de Lanteigne & Kobayashi no proporciona un ensayo preciso para el contenido de tensoactivo de las soluciones proteínicas. La exactitud de este método, y también del método básico de Garewal, es particularmente pobre a una concentración proteínica más alta. Por ejemplo, según se describe abajo (véase ejemplo Comparativo 1), el método de Garewal dio resultados engañosos cuando se evaluó una muestra en la que el contenido de proteína de una solución de tensoactivo fue mayor que 50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El método de Garewal no está previsto para proporcionar un

## ES 2 316 984 T3

ensayo de tensoactivo preciso con soluciones que contienen proteína a  $200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Esto es porque estos métodos no pueden eliminar los componentes proteínicos de la muestra de tensoactivo en el punto de análisis. Además, hemos demostrado que las fases de adición de etanol propuestas por Garewal y por Lanteigne & Kobayashi suponen pérdidas inaceptablemente altas de tensoactivo, y de este modo proporcionan datos no fiables. Hemos demostrado también que la eliminación del contenido de proteína de una preparación de tensoactivo conduce a pérdidas de tensoactivo inaceptables extrayendo el agente tensoactivo usando el proceso de ACT/diclorometano descrito por Lanteigne & Kobayashi.

Para superar este problema inesperado, hemos concebido un nuevo método para separar la proteína y otros componentes de un tensoactivo en una muestra, de ese modo para proporcionar una preparación de tensoactivo más completa que, al ser analizada, proporciona un resultado que es más representativo del contenido de tensoactivo real de la muestra original de la que fue tomada. Además, el método de la presente invención no requiere la fase que consume mucho tiempo de la incubación durante toda la noche de una muestra para eliminar la proteína y por lo tanto es un método de realización más eficaz que aquel descrito por Lanteigne & Kobayashi.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la eliminación de componentes proteínicos de una preparación de tensoactivo de fase líquida comprendiendo-

- (a) suministrar una preparación de tensoactivo de fase líquida conteniendo un componente proteínico;
- (b) añadir un agente complejante a la preparación de fase (a) y permitir que el agente complejante forme un complejo con el tensoactivo;
- (c) simultáneamente con la fase (b), o posteriormente, añadir un agente de precipitación miscible a la preparación de fase (a) o el producto de fase (b), respectivamente, para formar una mezcla reactiva de fase líquida y permitir que el agente precipitante miscible precipite el componente proteínico dentro de la mezcla reactiva de fase líquida; y
- (d) separar dicho complejo del componente proteínico precipitado en el producto de fase (c) para proporcionar una preparación de tensoactivo de fase líquida purificada;

donde el complejo permanece en solución dentro de la mezcla reactiva de fase líquida, y donde la fase (d) conserva el complejo en la fase líquida.

Cualquier tipo de tensoactivo puede ser purificado por un método según el primer aspecto de la presente invención. Un tensoactivo es una molécula que puede actuar para reducir la tensión superficial de un líquido. La tensión superficial es la fuerza que actúa en la superficie de un líquido, tendiendo a minimizar el área de la superficie; de forma cuantitativa, es la fuerza que parece actuar a través de una línea de unidad de longitud en la superficie. La tensión superficial del agua es  $72 \text{ dina/cm}$  cuando se mide a la temperatura ambiente ( $200$ ) usando un tensiómetro; un tensoactivo puede reducir este valor, normalmente a una tensión superficial de no más de  $50 \text{ dina/cm}$ , por ejemplo aproximadamente  $30\text{-}50 \text{ dina/cm}$ .

Normalmente, el agente tensoactivo será no fónico, es decir, con un grupo hidrofílico principal sin carga. Ejemplos de tensoactivos no fónicos incluyen tensoactivos que tienen un grupo óxido de polialquileño, tal como un grupo poli(óxido de etileno), un grupo alcohol u otro grupo polar. Tensoactivos no iónicos adecuados pueden tener un grupo hidrofóbico y un átomo de hidrógeno reactivo, por ejemplo alcoholes alifáticos, ácidos, amidas o alquil-fenoles con óxidos de alquileño, especialmente óxido de etileno bien solo o con óxido de propileno.

Así el agente tensoactivo no fónico puede ser un condensado entre un alquilfenol y un óxido de alquileño; un polioxialquileño oleato de sorbitán; o un polioxialquileño glicol.

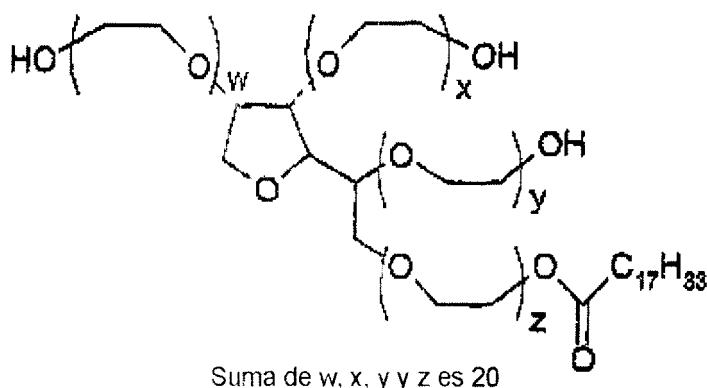
Compuestos tensoactivos no iónicos específicos incluyen condensados de alquil ( $\text{C}_6\text{-C}_{22}$ ) fenoles-óxido de etileno, productos de condensación de alcoholes lineales o ramificados alifáticos ( $\text{C}_8\text{-C}_{18}$ ) primarios o secundarios con óxido de etileno, y productos hechos por condensación de óxido de etileno con los productos reactivos de óxido de propileno y etilendiamina. Otros compuestos de tensoactivo no iónico incluyen óxidos de amina terciaria de cadena larga, óxidos de fosfina terciaria de cadena larga y dialquil sulfóxidos. Un tensoactivo no iónico puede también ser una amida de azúcar, tal como una amida polisacárida, tal como una de las lactobionamidas descritas en US 5,389,279 o una de las amidas de azúcar descritas en US 5,009,814. Otros tensoactivos típicos de este tipo incluyen Igepal DM 730, Igepal DM 530, Igepal DM 210, Igepal Co 880, Igepal Co 530, polioxietilenglicoles, incluyendo compuestos vendidos bajo la marca registrada Brij (tales como lauril éter (Brij 30) polioxietileno (4), lauril éter (Brij 35), cetil éter (Brij 58) polioxietileno (20), estearil éter (Brij 78) polioxietileno (20) y oleil éter (Brij 92) polioxietileno (20), y ésteres del ácido graso del polioxietileno, incluyendo compuestos vendidos bajo la marca registrada Mirj (tales como Mirj 51). Tensoactivos no fónicos típicos incluyen octil fenol polioxietileno (tal como Triton X-100); alquilfenoxipolietoxi (3) etanol, polioxietileno (20) monolaurato de sorbitán (Tween 20), polioxietileno (20) monopalmitato de sorbitán (Tween 40), polioxietileno (20) monoestearato de sorbitán (Tween 60), polioxietileno (20) tristearato de sorbitán (Tween 65), polioxietileno (20) monooleato de sorbitán (Tween 80), polioxietileno (20) trioleato de sorbitán (Tween 85), palmitato (G2079) de polioxietileno (20), lauril éter de polioxietileno (20); polioxietileno (23), aceite de ricino hidrogenado (G1292) de polioxietileno (25) y polioxietileno (25) monoestearato de oxipropileno (G2162).

Otros tensoactivos adecuados para el uso en un método según el primer aspecto de la invención serían:

- aniónicos, con grupos principales cargados negativamente. Ejemplos de tensoactivos aniónicos incluyen ácidos grasos de cadena larga, sulfosuccinatos, alquil sulfatos, fosfatos y sulfonatos, tales como dodecil sulfato de sodio, colato de sodio, desoxicolato de sodio, y taurocolato de sodio.
- catiónicos, con grupos principales cargados positivamente. Ejemplos de tensoactivos catiónicos incluyen aminas protonadas de cadena larga y compuestos de amonio cuaternario de cadena larga, tal como bromuro de hexadeciltrimetil amonio (Cetavlon), bromuro de cetiltrimetil amonio, y cloruro de N-hexadecilpiridinio.
- anfotéricos, con grupos principales zwitteriónicos. Ejemplos de tensoactivos anfotéricos incluyen betaínas y ciertas lecitinas.

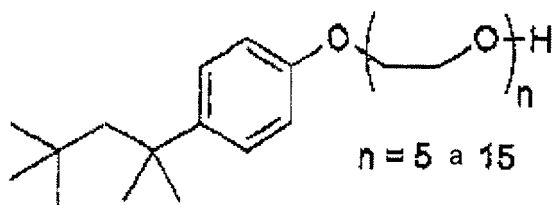
Los tensoactivos pueden tener uno o más grupos de óxido de alquileo. Cualquier grupo de óxido de alquileo puede estar presente, tal como óxido de etileno, óxido de propileno, óxido de butileno y similares. Los grupos de óxido de etileno son comunes en tensoactivos comercialmente disponibles. Muchos grupos de óxido de alquileo pueden estar presentes como un polímero (p. ej. un homopolímero, copolímero o copolímero en bloque), es decir, como un grupo óxido de polialquileo, tal como el grupo homopolimérico de poli(óxido de etileno). Es común que un tensoactivo contenga seis o más grupos de óxido de alquileo, aunque es posible que este método funcione con tensoactivos que tengan menos, tal como 5, 4, 3, 2 o 1 grupo(s) de óxido de alquileo. El agente tensoactivo puede ser un tensoactivo no iónico que tenga uno o más grupos poli(óxido de etileno), tales como los polisorbatos, condensado de óxido de octilfenol etileno, copolímeros en bloque de óxido de etileno/óxido de polipropileno, glicoles de polioxilalquileo, aceite de ricino endurecido con polioxietileno, ésteres de ácido graso de polioxietileno glicerol, éteres de alquil polioxietileno, polioxipropilenglicol polioxietileno, éteres de alil alquil polioxietileno y similares.

Los polisorbatos (también conocidos como ésteres de polioxietileno sorbitán, como vendidos bajo la marca registrada Registrada Tween) son tensoactivos no fónicos derivados de ésteres de sorbitán (Becher, P. "Polyol Surfactants" en Nonionic Surfactants, Schick, M.J. Ed. (Dekker, New York, 1967 1967), página 247-299. Chislett, L.R. & Walford, J. (1976) Int Flavours Food Addit., 7,61; Varma, R.K. *et al* (1985) Arzneimittel-Forsch, 35, 804). Los polisorbatos preferidos incluyen polisorbato 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81, 85 y similares. Un tensoactivo particularmente preferido es el polisorbato 80, que tiene la fórmula general (I)-



(I).

Octilfenoxi polietoxietanol (también conocido como octoxinol, y vendido bajo las Marcas registradas de Triton X, Igepal CA y Polytergent G) es un tensoactivo no fónico que puede ser preparado al reaccionar isoctilfenol con un óxido de alquileo, tal como óxido de etileno. El número medio de unidades de óxido de etileno (n) por molécula de octoxinol común comercialmente disponible normalmente varía entre 5 y 15. La fórmula general está representada por la fórmula (II) abajo-



(II).

En tal tensoactivo atípico, vendido como Triton X-100, n es aproximadamente 9.5.

## ES 2 316 984 T3

Polipropilenglicoles de polietileno (también conocidos como poloxámeros y vendidos bajo la marca registrada Pluronic) son una serie de tensoactivos no fónicos con la fórmula general representada por fórmula (III) abajo-



5

donde b es al menos 15 y  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a + (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_c$  es variado del 20 al 90% en peso. El peso molecular varía de 1,000 a 16,000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  o más. Para una revisión de poloxámeros, véase Schmolka, I.R. (1967) Am. Perfumer Cosmet., 82(7), 25-30. Ejemplos de poloxámeros particulares incluyen "Pluronic L62LF", donde a = 7, b = 30, c = 7.  
10 "Pluronic F68" donde a = 75, b = 30, c = 75. y "Pluronic L101" donde a = 7, b = 54, c=7.

Los tensoactivos para el uso con un método según el primer aspecto de la presente invención pueden contener adicionalmente una o más cadenas de hidrocarburo lineales o ramificadas. Las cadenas de hidrocarburo normalmente encontradas en los tensoactivos comercialmente disponibles incluyen ácidos grasos. Un ácido graso normalmente tiene  
15 al menos seis átomos de carbono en el esqueleto de hidrocarburo, y esqueletos más grandes son comunes, tales como  $\text{C}_{16}$  y  $\text{C}_{18}$ . Por consiguiente, la cadena de hidrocarburo puede ser un grupo de ácido oleico (es decir, ácido graso  $\text{C}_{16}$ ). El tensoactivo puede contener tanto un grupo óxido de polialquileno como una cadena de hidrocarburo. Por ejemplo, los polisorbatos contienen tanto los grupos poli(óxido de etileno) como un grupo de ácido oleico; el octoxinol comprende una cadena de hidrocarburo ramificada y grupo poli(óxido de etileno).  
20

El componente proteináceo puede comprender cualquier molécula proteinácea que es indeseada en cualquier preparación de tensoactivo purificada que es preparada a partir de la materia prima. En particular el componente puede ser uno que interfiere con la exactitud de cualquier cuantificación de tensoactivo ulterior. Un componente es proteináceo si comprende o consiste en un péptido, polipéptido o proteína. La frase "péptido, polipéptido o proteína" incluye cualquier polímero de aminoácidos, cuando son de origen natural; o artificial, preferiblemente unidos por enlaces peptídicos. Preferiblemente Ln péptido, polipéptido o proteína tendrá al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 aminoácidos de longitud. El componente proteináceo puede ser uno de origen natural o proteína producida por recombinación, tal como albúmina, una proteína de fusión de albúmina tal como se menciona en WO 01/77137, un anticuerpo monoclonal, etopósido, una proteína sérica (tal como un factor de coagulación sanguínea), antistasina, péptido anticoagulante tick o uno cualquiera o más de los "compañeros de fusión" de la albúmina descritos en WO 01/77137, como una proteína individual separada de la albúmina.  
30

A diferencia de los métodos de la técnica anterior, el método del primer aspecto de la invención es capaz de separar eficazmente tensoactivo de un componente altamente concentrado proteináceo, que por ejemplo, puede estar presente en la preparación de tensoactivo de fase líquida de fase (a) a una concentración de al menos 50, 75, 100, 150, 200 mg/ml, donde los niveles de componente son medidos en peso por volumen de preparación de tensoactivo.  
35

Puede ser apropiado medir la proporción de tensoactivo a componente proteináceo en la preparación de tensoactivo de fase líquida de fase (a). Por consiguiente, la proporción de tensoactivo a componente proteináceo, cuando se expresa como masa de moléculas de tensoactivo por masa de moléculas de componente proteináceo (es decir, ppm) presente en la preparación de tensoactivo de fase líquida de la fase (a) puede ser inferior a 4.800 ppm, tal como inferior a 4.500 ppm, 4.000 ppm, 3.500 ppm, 3.000 ppm, 2.500 ppm, 2.000 ppm, 1.500 ppm, 1.000 ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700 ppm, 600 ppm, 500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, 110 ppm, 100 ppm, 90 ppm, 80 ppm, 75 ppm, 70 ppm, 60 ppm, 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, 20 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15 ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm o menos.  
45

El término "preparación de tensoactivo de fase líquida" incluye cualquier preparación de fase líquida comprendiendo un tensoactivo. La preparación puede ser acuosa.

Mediante el "suministro", en el contexto del suministro de una preparación de tensoactivo de fase líquida, incluimos tomar una muestra entera, una alícuota de una preparación más grande, o una de una serie de muestras obtenida a partir del mismo lote básico.  
50

El término "agente complejante" incluye cualquier compuesto capaz de modificar la característica hidrofóbica de un tensoactivo a través de su capacidad para formar enlaces débiles con una o más moléculas de tensoactivo. Un tensoactivo tal como se ha definido anteriormente bajo las condiciones del proceso. Normalmente el agente complejante será un compuesto que contiene un ión metálico polivalente, tal como un ión metálico de transición. Por ejemplo, el ión metálico puede ser un ión metálico de transición grupo VI, VII, VIII, IX o X, tal como itrio, circonio, niobio, molibdeno, tecnecio, rutenio, rodio, paladio, plata, cadmio, hafnio, tantalio, tungsteno, renio, osmio, iridio, platino, oro, mercurio, aunque los iones metálicos de transición preferidos son los iones metálicos de transición en 3d tales como cobalto, hierro, cobre, zinc, níquel, manganeso, cromo, vanadio, titanio y escandio. Compuestos de cobalto pueden ser usados como el agente complejante. Por consiguiente, el agente complejante puede ser cobaltotiocianato de amonio (ACT). ACT es un agente complejante apropiado para usar para complejar un tensoactivo con un óxido de alquileno u óxido de polialquileno (p. ej. grupo de óxido de etileno u poli(óxido de etileno)).  
55  
60  
65

De forma similar, compuestos de hierro, tales como tiocianato de hierro (III), puede ser usado como el agente complejante.

A diferencia de los métodos de la técnica anterior, el método de la presente invención no depende de la formación de un complejo de color para evaluar la presencia de tensoactivo. En consecuencia, los agentes complejantes usados en la presente invención no necesitan necesariamente formar complejos de color.

Una cantidad eficaz del agente complejante se añade a la preparación de tensoactivo de fase líquida. En otras palabras, la cantidad de agente complejante añadida es suficiente para complejar sustancialmente todo el tensoactivo en la preparación de tensoactivo de fase líquida. Normalmente se añade en exceso. La cantidad de agente complejante requerida para complejar sustancialmente todo el tensoactivo en la preparación de tensoactivo de fase líquida puede ser determinada por evaluación empírica del agente complejante con una solución no contaminada del tensoactivo.

Mediante “permitir al agente complejante formar un complejo con el tensoactivo” nos referimos al menos a algunos complejos de agente complejante con al menos algo de tensoactivo. Normalmente, después de que el agente complejante es añadido a la preparación de tensoactivo de la fase líquida, la preparación es mezclada para dispersar el agente complejante dentro de la preparación. Las condiciones óptimas para permitir que la complejación ocurra dependerá de la naturaleza del tensoactivo y de la naturaleza del agente complejante, y normalmente incluirá la modificación de temperatura, presión, pH y/o fuerza iónica de la fase líquida. Las condiciones útiles para la complejación pueden incluir pH neutro y fuerza iónica baja (Crabb & Persinger, 1961, Journal of the American Oil Chemist's Society, 41, 752-755). Por ejemplo, en el caso de que el tensoactivo sea polisorbato 80 y el agente complejante sea ACT, las condiciones adecuadas para permitir que el agente complejante forme un complejo con el tensoactivo están expuestas más abajo en los ejemplos.

Después de la formación, el complejo permanece en solución dentro de la fase líquida. Por lo tanto bajo las condiciones usadas para permitir que el agente complejante forme un complejo con el tensoactivo (pero en ausencia de cualquier proteína), sustancialmente nada del complejo forma un precipitado. Se puede considerar que complejo permanezca en solución si la cantidad de tensoactivo que puede ser recogida en el granulado como un precipitado, por centrifugado de la fase líquida a 47.800 g durante 15 minutos a 4°C, es inferior al 20%, 15%, 10% 5%, 2%, 1%, 0,5% 0 0,1% en peso del tensoactivo recogido en el sobrenadante después del centrifugado cuando se determina usando HPLC como se describe en los ejemplos abajo. Valores porcentuales inferiores son preferidos.

Un “agente precipitante” es cualquier agente que provoca que un componente aparte del tensoactivo precipite. El agente precipitante debe ser “miscible” dentro de la preparación de tensoactivo de fase líquida para desempeñar su función. En otras palabras, bajo las condiciones usadas, el agente precipitante no debe formar un líquido separado o fase sólida que sea inmisible con la preparación de tensoactivo de fase líquida. Preferiblemente el agente precipitante es miscible en una preparación de tensoactivo de fase líquida acuosa. Para ser miscible con agua, un agente precipitante comúnmente tiene una región polar. Normalmente el agente precipitante es un solvente orgánico miscible con agua. Ejemplos de agentes de precipitación miscibles con agua incluyen solventes polares próticos y solventes polares apróticos tales como alcoholes, cianoalquilos, aminas, amidas, ácidos carboxílicos, aldehidos, cetonas, glicoles, éteres, alquilhaluros e hidrocarburos aromáticos. Agentes de precipitación preferidos incluyen acetona, acetonitrilo, isopropanol, metanol y etanol. Acetonitrilo proporciona un buen equilibrio entre la producción de tensoactivo y el contaminante sobrante. Además, el acetónitrilo tiene ventajas sobre la acetona incluyendo-

(a) el uso de acetona requiere el uso de vidrio para la manipulación del sobrenadante que podría ser contaminado con detergente de limpieza, mientras que el uso de acetonitrilo permite el uso de recipientes de plástico desechables, de ese modo minimizando el riesgo de contaminación; y

(b) la acetona también tiene un punto de inflamabilidad de -18°C, inferior a las temperaturas de centrifugado típicas, y por seguridad es mejor usar acetonitrilo, que tiene un punto de inflamabilidad de +13°C.

El agente precipitante se añade simultáneamente o, más generalmente, después, pero no antes, de que el agente complejante sea añadido a la preparación de tensoactivo de fase líquida. Ésta es una diferencia importante entre la presente invención y el estado de la técnica. Ambos Garewal (op. cit.) y Lanteigne & Kobayashi (op. cit.) añadieron un agente precipitante (etanol) a la preparación de tensoactivo antes de que el agente complejante (ACT) fuera añadido. Esto provoca que algo de tensoactivo se pierda de la solución, al ser transportado en el precipitado. Por lo tanto, la cuantificación resultante del tensoactivo en el sobrenadante es una medida imprecisa de la cantidad de tensoactivo en la preparación de partida. Sin estar limitados por la teoría, se cree que añadiendo un agente precipitante simultáneamente o, más generalmente, después, pero no antes, del agente complejante, la eficacia de la eliminación del componente proteináceo es mejorada. El agente complejante conserva sustancialmente todo el tensoactivo en solución mientras que el componente proteináceo es precipitado.

En algunos casos, la adición ulterior del agente precipitante puede aumentar el efecto del agente complejante y suponer un grado superior de formación del complejo entre el tensoactivo y el agente complejante. Sin estar limitados por la teoría, creemos que esto sucede porque el agente precipitante adicionalmente separa el tensoactivo del componente proteináceo, permitiendo de ese modo una complejación mejorada del tensoactivo por el agente complejante.

Al “permitir que el agente precipitante miscible precipite el componente proteináceo dentro de la mezcla de reacción de fase líquida”, la mezcla reactiva de fase líquida puede ser incubada bajo condiciones que favorecen la precipitación del componente proteináceo pero no alteran sustancialmente el complejo. Las condiciones reales usadas

## ES 2 316 984 T3

dependerán de la identidad de los componentes particulares dentro del sistema en cuestión. El experto en la materia es capaz de determinar las condiciones apropiadas para cualquier combinación dada de componentes del sistema mediante evaluación empírica.

5 El complejo permanece en solución dentro de la mezcla reactiva de fase líquida. En este contexto, el complejo “permanece en solución” si la cantidad de tensoactivo que puede ser recogida en el granulado como un precipitado, por centrifugado de a mezcla reactiva de fase líquida a 47.800 g durante 15 minutos a 4°C, es inferior al 20%, al 15%, al 10%, al 5%, al 2%, al 1%, al 0,5% o al 0,1% en peso del tensoactivo recogido en el sobrenadante después del centrifugado cuando se determina usando HPLC como se describe en los ejemplos más abajo. Los valores porcentuales inferiores son preferidos.

10 La fase de “separación de dicho complejo del componente proteináceo precipitado en el producto de la fase (c)” puede ser efectuada por cualquier método adecuado conocido en la técnica para separar el precipitado de una solución, mientras que “mantiene el complejo en la fase líquida”. Sustancialmente todo el complejo es retenido en el producto de fase líquida de fase (c). Para evitar dudas, el complejo no es retenido en la fase líquida si es dividido en una fase líquida no miscible separada. Ésta es otra diferencia importante entre el método de la presente invención y los métodos de Garewal (*op. cit.*) y Lanteigne & Kobayashi (*op. cit.*). Los métodos de Garewal (*op. cit.*) y Lanteigne & Kobayashi (*op. cit.*) aíslan el tensoactivo complejado de una solución acuosa por la adición de una fase orgánica inmisible (bien dicloruro de etileno o diclorometano). Sin estar limitados por la teoría, creemos que la partición de complejo de tensoactivo en una fase líquida separada resulta en un gran remanente contaminante. Por contraste, no dependemos de esta forma de aislamiento compleja y, consecuentemente, conseguimos una eliminación superior de componentes proteináceos.

25 La fase de separación es normalmente realizada centrifugando la mezcla reactiva, de manera que el componente proteináceo precipitado forma un granulado y el complejo es retenido en el sobrenadante, y separando el sobrenadante del granulado. Los parámetros de centrifugado óptimos tales como g y la duración variarán dependiendo de la naturaleza del precipitado formado. Una guía puede ser tomada de los ejemplos abajo, aunque el experto en la materia es capaz de determinar condiciones apropiadas mediante evaluación empírica.

30 No obstante, el experto en la materia será consciente de que otros numerosos métodos están disponibles en la técnica para separar una preparación de fase líquida de un precipitado, tal como la filtración.

35 El producto de la fase de separación es una preparación de tensoactivo de fase líquida purificada. Mediante “preparación de tensoactivo de fase líquida purificada” se incluye el significado de una preparación de tensoactivo de fase líquida que está sustancialmente libre de componente proteináceo precipitado. En este contexto, una preparación de tensoactivo de fase líquida está sustancialmente libre de componente proteináceo precipitado si ésta puede ser aplicada a un cartucho de extracción de fase sólida hidrofóbica bajo condiciones definidas en los ejemplos más abajo sin bloquear el cartucho o afectar significativamente la pureza del tensoactivo después de la purificación de SPE.

40 Un método según el primer aspecto de la presente invención puede comprender una o más fases de purificación adicional para purificar adicionalmente el tensoactivo en la preparación de tensoactivo de fase líquida purificada. Cualquier método adecuado puede ser usado.

45 En una forma de realización, el método según el primer aspecto de la presente invención comprende la fase adicional de unir de manera no covalente el complejo en la preparación de tensoactivo de fase líquida purificada a una fase sólida. Normalmente se usa una fase sólida hidrofóbica, puesto que adsorbe el tensoactivo. De forma alternativa, una fase sólida hidrofílica puede ser usada, que adsorbe el componente proteináceo restante en la preparación de tensoactivo de fase líquida purificada sin retener el tensoactivo, de ese modo permitiendo que el tensoactivo sea recogido como un eluato.

50 Puede ser una ayuda si el complejo es disociado antes de la exposición a la fase sólida El experto en la materia es bien consciente de los métodos para disociar el complejo. Los detalles particulares dependen de la naturaleza del tensoactivo y del agente complejante. Por ejemplo, un agente quelante puede ser usado. Normalmente el agente quelante competirá con el tensoactivo para enlazarse con el ión metálico polivalente del agente complejante. Por consiguiente, cuando el agente complejante es ACT (es decir, el ión metálico polivalente es cobalto), un método adecuado de disociación del complejo es mediante la adición de un agente quelante tal como ácido tetraacético etilendiamina (EDTA) al tensoactivo de fase líquida purificada.

60 En una forma de realización, la fase sólida usada en la fase adicional es un cartucho o disco de extracción de fase sólida (SPE)

65 El cartucho o disco de SPE puede ser hidrofóbico. Ejemplos de cartuchos y discos de SPE hidrofóbicos incluyen un poliestireno divinilbenceno (p. ej. las columnas Bakerbond SDB1 ejemplificadas más abajo, los cartuchos Licrolut EN PDBV suministrados por Merck, o StrattaX suministrados por Phenomenex) o un cartucho de C<sub>2-24</sub> alquilo.

En un método según el primer aspecto de la invención, donde el tensoactivo se une de manera no covalente a una matriz sólida, la matriz sólida puede ser lavada con un líquido que permite que el tensoactivo unido permanezca unido a la matriz mientras que cualquier componente proteináceo restante es arrastrado. Los líquidos de lavado adecuados

## ES 2 316 984 T3

son bien conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles. Los líquidos de lavado adecuados incluyen isopropanol, hexano y acetonitrilo. Puede ser una ayuda que un lavado sea ácido o alcalino. Por ejemplo, ácido acético puede ser presentado en hexano en una concentración apropiada, tal como 0,1% (v/v), para proporcionar un lavado ácido. Amonio, o trietilamina, puede ser presentado en hexano en una concentración apropiada, tal como 0,5% (v/v) de amonio o 1% (v/v) de trietilamina, para proporcionar un lavado alcalino. Las condiciones de lavado apropiadas pueden ser determinadas por el experto en la materia dependiendo de la naturaleza del tensoactivo y de la fase sólida.

La matriz puede ser lavada con un líquido que no elimina el tensoactivo de la matriz. Normalmente, un líquido de lavado apropiado puede ser suficientemente hidrofílico como para no interrumpir la interacción del tensoactivo con la matriz o de forma alternativa puede ser suficientemente hidrofóbico como para precipitar el tensoactivo en solución. Un método para determinar un líquido de lavado adecuado puede ser realizado como sigue. Se considera que un líquido precipita un tensoactivo si al menos el 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% o sustancialmente el 100% de tensoactivo (p. ej. polisorbato 80) puede ser recuperado de la matriz (p. ej. un cartucho de SPE de poliestireno divinilbenceno, tal como las columnas Bakerbond SDB1 ejemplificadas abajo, los cartuchos de Licrolut EN PDBV suministrados por Merck, o StrattaX suministrados por Phenomenex, o equivalentes de los mismos) bajo las condiciones siguientes-

- (a) el cartucho es preparado conforme la fase 2(v)(a) del Ejemplo 2 abajo.
- (b) el cartucho está cargado (a aproximadamente  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) con 10 mL de una solución de tensoactivo acuosa de  $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .
- (c) el cartucho es lavado con  $3 \times 1 \text{ ml}$  del líquido de lavado en cuestión. El cartucho está completamente secado para pasar aire a través del mismo al vacío durante al menos 30 segundos.
- (d) tensoactivo en cada cartucho es eluido y recogido conforme al ejemplo 2, fase 2(v) (d)-(g) y la recuperación de tensoactivo es determinada usando un aparato de HPLC configurado conforme al ejemplo 2, fase 2 (vi) según el protocolo establecido en el ejemplo 2, fases (vii)-(ix).
- (e) la recuperación debería ser calculada a partir de una extracción sin el lavado de solvente bajo investigación.

Así un experto en la materia es capaz de seleccionar un líquido de lavado apropiado, dependiendo de la naturaleza del tensoactivo y de la naturaleza de la matriz sólida que es usada. Un lavado apropiado puede ser suficientemente fuerte para precipitar el tensoactivo en la fase sólida o suficientemente débil para minimizar o prevenir la elución del tensoactivo. Normalmente el líquido de lavado será un solvente orgánico insoluble en agua o solvente orgánico hidrosoluble.

Un líquido de lavado adecuado, particularmente en el caso de un tensoactivo que tiene un óxido de polialquileno (tal como el grupo poli(óxido de etileno)) (p. ej. polisorbato 80) puede incluir hexano o similar, tal como cloroformo o tolueno. Un líquido de lavado adecuado, particularmente en el caso de tensoactivo que tiene un grupo que se enlaza fuertemente a la fase sólida, tal como un grupo de sorbitán (p. ej. polisorbato 80), puede ser un lavado débil que no eluye el tensoactivo, tal como acetonitrilo, isopropanol y/o trietilamina. El experto en la materia apreciará que, cuando sea apropiado, estos enfoques pueden ser combinados. Por ejemplo, el polisorbato 80 contiene tanto un grupo poli(óxido de etileno) como un grupo sorbitán, y por lo tanto ambos lavados fuertes y débiles pueden ser usados. Por ejemplo, hemos encontrado que el lavado siguiente puede ser adecuado para el polisorbato 80: 30% (v/v) de acetonitrilo seguido de isopropanol, 1% (v/v) de trietilamina en hexano y finalmente hexano.

Se pueden emplear fases de lavado adicionales dependiendo de la naturaleza del tensoactivo, la naturaleza de la matriz y la naturaleza de los componentes proteínicos que se deben eliminar.

Después de la(s) fase(s) de lavado, el tensoactivo es normalmente eluido de la matriz y recogido como un eluato. Cualquier eluyente adecuado puede ser usado Hemos encontrado que una mezcla de tolueno:etanol (1:1) proporciona buenos resultados en el sistema ejemplificado.

La preparación de tensoactivo de fase líquida purificada, o eluato derivado de la misma, puede ser analizado para determinar el contenido de tensoactivo. El experto en la materia es bien consciente de métodos para determinar el contenido de tensoactivo de una solución. Por ejemplo, si un tensoactivo contiene al menos seis grupos de óxido de alquileno, entonces el tensoactivo puede ser complejoado con ACT y la concentración de tensoactivo determinada espectrofotométricamente por ejemplo como se describe por Garewal (*op. cit.*). De forma alternativa, el contenido de tensoactivo puede ser determinado por HPLC, o GPC acuosa, tal como se describe en los ejemplos abajo.

Debido a los niveles bajos de componente proteínico en la muestra evaluada, los resultados del análisis se correlacionan más próximamente con el contenido de tensoactivo real de la preparación de tensoactivo de fase líquida inicial que si el análisis fuera realizado conforme a los métodos de la técnica anterior. Preferiblemente, el nivel de componente proteínico en la muestra evaluada está por debajo de los niveles detectables evaluados por HPLC usando el método ejemplificado abajo.

## ES 2 316 984 T3

Por consiguiente, un método de la presente invención puede ser útil cuando la preparación de tensoactivo de fase líquida usada es una alícuota de una preparación mayor o una muestra de un lote de preparaciones y el método comprende la fase adicional de correlacionar el contenido de tensoactivo así determinado de la preparación de tensoactivo de fase líquida purificada, o eluato derivado de la misma, con el contenido de tensoactivo de la preparación mayor u otros elementos del lote.

Hecha esta correlación, el usuario puede luego marcar apropiadamente la preparación mayor o los otros elementos del lote, o pueden suministrar informes de control de la calidad apropiados, para reflejar el contenido de tensoactivo así determinado.

Puesto que un método de la presente invención proporciona un método más preciso de determinación del contenido de tensoactivo que los métodos de la técnica anterior, una preparación que ha sido sometida a análisis usando un método de la presente invención y marcada con el contenido de tensoactivo determinado será distinguida de las preparaciones de la técnica anterior por el hecho de que su marcador u otros datos asociados refleja con más exactitud y con más precisión el nivel de tensoactivo en su contenido. Por consiguiente tal producto es más capaz de cumplir los requisitos reguladores.

Una preparación de tensoactivo de fase líquida marcada obtenible por un método tal como se ha definido anteriormente está descrita. Se prefiere que, la preparación de tensoactivo de fase líquida comprenda un componente proteínico, tal y como se ha mencionado anteriormente. Preferiblemente el componente está presente en la preparación de tensoactivo de fase líquida, de fase (a) a una concentración de al menos 50, 75, 100, 150, 200 mg/ml o más, donde los niveles de componente son medidos en peso por volumen de preparación de tensoactivo.

Puede ser apropiado medir la proporción de tensoactivo a componente proteínico en la preparación de tensoactivo de fase líquida de fase (a).

Por consiguiente, la proporción de tensoactivo a componente proteínico, cuando se expresa como masa de moléculas de tensoactivo por masa de moléculas de componente proteínico (es decir, ppm) presente en la preparación de tensoactivo de fase líquida de fase (a) puede ser inferior a 4,800 ppm, tal como inferior a 4,500 ppm, 4,000 ppm, 3,500 ppm, 3,000 ppm, 2,500 ppm, 2,000 ppm, 1,500 ppm, 1,000 ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700 ppm, 600 ppm, 500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, 110 ppm, 100 ppm, 90 ppm, 80 ppm, 75 ppm, 70 ppm, 60 ppm, 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, 20 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15 ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm o menos.

Será evidente para el lector experto que los métodos anteriormente descritos son útiles en el control de la calidad de un lote de una preparación farmacéutica con tensoactivo. El control de la calidad es un sistema para mantener estándares en un producto fabricado examinando una muestra de la salida del proceso de producción, normalmente un lote o serie, contra una especificación estándar, de ese modo asegurando que el producto de salida reúne los estándares requeridos. Esto es particularmente importante en la producción de productos farmacéuticos que necesitan cumplir los requisitos reguladores solicitados. Por lo tanto, el "componente" en el contexto del ensayo de tensoactivo es generalmente el compuesto deseado farmacéuticamente activo. Así, el control de la calidad del contenido de tensoactivo de la preparación puede ser realizado determinando el contenido de tensoactivo de una muestra de la preparación usando un método tal y como se ha definido anteriormente.

También está descrita una preparación farmacéutica con tensoactivo que ha sido controlada en cuanto a la calidad usando un método como se ha descrito anteriormente.

La invención será ahora descrita con más detalle con referencia a las Figuras y Ejemplos siguientes donde:

Figura 1 muestra los resultados de un ensayo de polisorbato 80 usando la formación del complejo de ión metálico y extracción de solvente como se ha descrito en el Ejemplo Comparativo 1.

Figura 2 muestra cromatogramas de HPSEC de diferentes extracciones de albúmina como se describe en el Ejemplo 1.

Figura 3 muestra la configuración de HPLC usada en el Ejemplo 2.

Figura 4A muestra los datos de calibración.

Figura 4B muestra la curva de calibración lineal generada en el Ejemplo 2.

Figura 5 muestra un perfil cromatográfico para calcular el número de placas teóricas.

Figura 6 muestra un perfil cromatográfico para calcular la aparición de una formación de cola de pico.

Figura 7 muestra un perfil cromatográfico para calcular la resolución.

## ES 2 316 984 T3

### Ejemplo comparativo 1

El ejemplo siguiente se basa en el método de Garewal (*op. cit.*).

5 Muestras de preparación de rHA al 5 y 25% (p/v) fueron adicionadas con polisorbato 80 ("Tween 80" de Sigma) a una concentración final de  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  y partes alícuotas de  $200 \mu\text{L}$  fueron mezcladas con 2 mL de reactivo ACT (17,8 g tiocianato de amonio y 2,8 g nitrato de cobalto en 100 mL de agua Milli Q).

10 La mezcla fue luego extraída con 2 mL de cloroformo mezclándose durante 15 minutos a la temperatura ambiente. El cloroformo fue luego recogido y la extracción repetida con otras cuatro partes alícuotas de 1 mL de cloroformo.

La absorbencia a 600 nm de cada extracto de cloroformo fue medida y la absorbencia total para cada muestra calculada (es decir, el complejo de ACT total extraído bajo las condiciones definidas arriba).

15 Este procedimiento de extracción fue repetido para soluciones estándar de polisorbato 80 (0: 0,5: 5,0 y 50,0  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) preparadas tanto en agua ultra pura (agua "Milli QTM" de Millipore Corp.) y rHA (5% p/v).

Los resultados están mostrados en la tabla 1.

20

TABLA 1

25

30

35

40

45

Muestra	Absorbencia de extracto (600nm)	Concentración de Tween 80 de curva estándar de rHA ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Recuperación de Tween 80 (%)
5% (p/v) de rHA + $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de polisorbato 80	0,329	0,610	>4.000
25% (p/v) de rHA + $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de polisorbato 80	0,346	0,695	>4.600

50

El reactivo ACT mezclado con polisorbato 80 en soluciones acuosas resulta en la formación de una sal insoluble de color (azul) que puede ser extraída en tampones orgánicos. La extracción de reactivo ACT-solvente de rHA produjo absorbencias de fondo más altas que aquellas obtenidas para agua (figura 1). Esto indica que rHA contiene ciertas sustancias aparte de polisorbato 80 que reaccionan con el reactivo ACT que produce una absorbencia superior a la prevista en este método.

55

La estimación de polisorbato 80 en productos finales de rHA es más de 4000 veces mayor que la concentración conocida por este método (Tabla 1) lo que demuestra que el método no es preciso. La alta absorbencia en las muestras de rHA no adicionadas combinadas con la variabilidad del ensayo supuestamente representa este resultado. La respuesta interferente alta y variable obtenida con rHA no adicionada hace que este método sea inadecuado para el ensayo directo de polisorbato 80 en productos finales de rHA.

### 60 Ejemplo comparativo 2

En un intento de superar el problema contaminante experimentado al usar el método del Ejemplo Comparativo 1, el efecto de incluir una fase de purificación adicional, usando un cartucho  $\text{C}_{18}$  SPE, fue evaluado.

65

Polisorbato 80 fue preparado en agua ultra pura a una concentración final de  $50 \text{mg.mL}^{-1}$  y en rHA a  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A  $200 \mu\text{L}$  de cada una de estas muestras se añadieron  $800 \mu\text{L}$  de etanol seguido de 2 mL de reactivo ACT. Las mezclas fueron luego extraídas por la adición de 5 mL de cloroformo seguido de la mezcla a la temperatura ambiente durante

## ES 2 316 984 T3

15 minutos. Los extractos de cloroformo fueron luego eliminados y extraídos en C<sub>18</sub> SPE como sigue:

Fase	Procedimiento
5 <u>Humidificación:</u>	1 ml de cloroformo
<u>Equilibrado:</u>	1 ml de cloroformo
10 <u>Carga:</u>	extracto de cloroformo del complejo ACT-Tween 80 de rHA o agua
<u>Lavado:</u>	1 ml de cloroformo
<u>Elución:</u>	0,25: 0,50 o 1,00 mL de metanol

15 Los eluatos de SPE fueron secados usando evaporación por centrifugación y resuspendidos en bien 1 mL (extractos de agua) o 0,5 mL (extractos de rHA) de tetrahidrofurano (THF). La absorbencia a 600 nm de cada eluato resuspendido fue luego medida.

20 Como un control una alícuota de 200  $\mu$ L de rHA sin polisorbato 80 fue también extraída usando el procedimiento anteriormente descrito. Los resultados están mostrados en la tabla 2.

TABLA 2

25

Muestra	Volumen de elución	A600	Recuperación de Polisorbato 80 (%)
30 Agua + 50mg.mL <sup>-1</sup> de polisorbato 80 (control de carga)	1,0mL (volumen secado)	1,463	100
35 Agua + 50mg.mL <sup>-1</sup> de polisorbato 80	0,25mL	1,297	89
40 Agua + 50mg.mL <sup>-1</sup> de polisorbato 80	0,5mL	1,246	85
45 Agua + 50mg.mL <sup>-1</sup> de polisorbato 80	1,0mL	1,170	80
50 rHA (5% p/v) + 0 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> de polisorbato 80	1,0mL	1,132	ND
55 rHA (5% p/v) + 15 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> de polisorbato 80	1,0mL	1,288	ND
60 rHA (25% p/v) + 15 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> de polisorbato 80	1,0mL	1,144	ND

65

“ND” significa no determinado. Las recuperaciones de estas muestras no fueron calculadas como la absorción de la rHA no adicionada es equivalente al estándar de 50 mg.mL<sup>-1</sup>. Es decir, hay un fondo elevado de muestras de rHA.

## ES 2 316 984 T3

La recuperación del complejo ACT-polisorbato 80 del agua es superior al 80% (Tabla 2). Esta recuperación del complejo ACT-polisorbato 80 es mantenida con volúmenes de elución de SPE de 0,25 a 1,0 mL (Tabla 2). El uso de volúmenes de elución bajos puede ser provechoso para reducir el tiempo de secado de los eluatos antes de la resuspensión.

La extracción de polisorbato 80 de rHA usando la formación del complejo de ACT, extracción de solvente y SPE resultó en absorbencias esencialmente idénticas para muestras con y sin polisorbato 80 (Tabla 2). Esto indica que el color producido en estos extractos no está totalmente relacionado con la presencia de polisorbato 80 y puede ser producido por contaminantes de rHA, excipientes o la proteína misma.

Así, aunque el complejo polisorbato 80-ACT puede ser extraído del cloroformo usando C<sub>18</sub> SPE, una alta respuesta de fondo es también producida.

### Ejemplo comparativo 3

El método de evaluación de los niveles de tensoactivo en soluciones que contienen concentraciones “elevadas” de proteína (p. ej. 52 mg.mL<sup>-1</sup>) descritas por Lanteigne & Kobayashi (*op. cit.*) implica la precipitación de etanol de la proteína, incluyendo la incubación durante toda la noche de la muestra a menos 30°C (más centrifugado y aislamiento del sobrenadante), antes de complejar el tensoactivo por la adición de ACT y de la extracción del complejo de ACT-tensoactivo usando diclorometano como una fase líquida orgánica.

Hemos encontrado que la fase de precipitación de etanol inicial propuesta por Lanteigne & Kobayashi resulta en niveles inaceptables de pérdidas de tensoactivo.

Partes alícuotas (10 mL) de rHA (5% p/v) + 10 µg.mL<sup>-1</sup> de polisorbato 80 fueron tratadas con 40 mL de etanol frío. Las muestras fueron centrifugadas en un centrifugador Sorval RC5C (rotor = SS34) durante 20 minutos a 20.000 rpm. Los sobrenadantes fueron luego secados usando evaporación giratoria (hasta aproximadamente 2 mL) y luego extraídos en cartuchos C<sub>18</sub> SPE.

La eliminación de rHA por precipitación de etanol seguida de C<sub>18</sub> SPE no mejoró la recuperación de polisorbato 80 por encima del 35% (datos no mostrados). Esto indica que la precipitación de la proteína resulta en pérdidas de polisorbato 80 puesto que la recuperación en C<sub>18</sub> SPE es inferior a aquella obtenida de extractos de agua (es decir, sin proteína).

El método de Garewal (*op. cit.*) también incluye, como una primera fase, la adición de etanol, sin embargo sin la incubación extensiva durante toda la noche de la muestra a menos 30°C como se describe por Lanteigne & Kobayashi. Hemos encontrado que la fase de adición de etanol inicial propuesta por Garewal, o de forma alternativa la adición de un solvente similar (en este caso metanol o isopropanol), también resulta en niveles inaceptables de pérdidas de tensoactivo.

rHA (5% p/v) + 10 µg.mL<sup>-1</sup> de polisorbato 80 fue preparada y partes alícuotas de 10 mL mezcladas con 5 mL de metanol, isopropanol o etanol. Las muestras tratadas (15 mL) fueron luego extraídas como antes en cartuchos de C<sub>18</sub> SPE, los eluatos siendo evaluados para polisorbato 80 según el Ejemplo 1. El pretratamiento de producto final de rHA con 30% isopropanol, metanol o etanol antes de C<sub>18</sub> SPE resultó en recuperaciones de polisorbato 80 de 7, 25 y 51% respectivamente. Estas recuperaciones son inaceptablemente bajas para un ensayo regulador y llevarían a resultados engañosos.

### Ejemplo comparativo 4

Además de las pérdidas de tensoactivo observadas como resultado de la precipitación de etanol cuando se usa el método de Lanteigne & Kobayashi (*op. cit.*), descrito en el Ejemplo Comparativo 3, hemos demostrado también que la fase de complejación del tensoactivo por la adición de ACT y extracción del complejo de tensoactivo-ACT usando diclorometano como una fase líquida orgánica adicionalmente causa una pérdida de tensoactivo.

La recuperación de polisorbato 80 fue comparada entre una alícuota de 10 mL de rHA (5% p/v) + 10 µg.mL<sup>-1</sup> de Tween 80 y una alícuota de 10 mL de agua ultra pura + 10 µg.mL<sup>-1</sup> de polisorbato 80. Dos adiciones de 70 mL de reactivo ACT (17,8 g tiocianato amónico y 2,8 g de nitrato hexahidratado de cobalto en 100 mL de agua ultra pura) fueron hechas en cada muestra, antes de mezclarse con 52 mL de diclorometano. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche. Las mezclas fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos y la fase acuosa superior fue descartada. Unos cristales de sulfato de amonio anhidro fueron añadidos y las muestras fueron mezcladas y recentrifugadas como anteriormente. El diclorometano fue luego transferido a un tubo limpio y secado bajo una corriente de helio. El residuo fue luego resuspendido en 1 mL de metanol y secado por evaporación por centrifugación antes de ser resuspendido en 100 mL de THF. Estas muestras resuspendidas fueron luego evaluadas para polisorbato 80 como se describe en el Ejemplo 1.

La recuperación de polisorbato 80 de la muestra de agua fue del 82%. La recuperación de polisorbato 80 de la muestra de rHA fue sólo del 21%. Esto demuestra que el protocolo de recuperación de tensoactivo de Lanteigne & Kobayashi no puede extraer eficazmente el tensoactivo en presencia de un contaminante proteínico.

## ES 2 316 984 T3

### Ejemplo 1

Modificaciones significantes a los métodos usados en los Ejemplos Comparativos incluyen-

- un agente precipitante de proteínas fue añadido después de, mejor que antes de, la adición de ACT; y
- el complejo ACT-polisorbato 80 fue inicialmente separado de los componentes proteínicos usando centrifugado mejor que la extracción de solvente.

Seis lotes ("A" a "F") de rHA fueron examinados. El lote F fue deliberadamente adicionado con  $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de polisorbato 80. A partes alícuotas de 10 mL de la rHA ( $250 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), se añadieron 2 mL de reactivo ACT seguido de 18 mL de acetona.

Las muestras fueron luego mezcladas en vortex y centrifugadas a  $47.800 \text{ g}$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Los sobrenadantes fueron eliminados y diluidos con 30 mL de EDTA 100 mM en un tampón Tris/HCl 0,5M pH 8.0 (preextraído en una columna Bakerbond SDB 200 mg/3 mL). Estas muestras diluidas fueron luego extraídas por extracción de fase sólida (SPE) usando columnas Bakerbond SDB1 de 50 mg como sigue:

Fase	Procedimiento
<u>Humidificación:</u>	2 mL cloroformo, 2 mL metanol
<u>Equilibrado:</u>	2 mL de 30% acetona, 50% solución de EDTA, 20% agua ultra pura (Milli QTM)
<u>Carga:</u>	Sobrenadante de ACT diluido
<u>Lavado:</u>	1 mL cada uno de agua ultra pura (Milli QTM), metanol, acetonitrilo, isopropanol, 0,5% de amonio en hexano, hexano, 1% de ácido acético en hexano, hexano
<u>Elución:</u>	2 X 750 $\mu\text{L}$ partes alícuotas de tolueno:etanol (1:1)

Los eluatos de SPE fueron luego secados por evaporación giratoria, resuspendidos en 200  $\mu\text{L}$  de tetrahidrofurano (THF) y analizados por HPSEC, como sigue:

<u>Columna:</u>	Tres columnas 300 X 7.8 mm Phenomenex Phenogel $50\text{\AA}$ , 5 $\mu\text{m}$ precedidas por una columna de seguridad de 5 $\mu\text{m}$ 50 X 7.8 mm
<u>Fase móvil:</u>	tetrahidrofurano (THF)
<u>Nivel de flujo:</u>	1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
<u>Inyección:</u>	50 $\mu\text{L}$
<u>Detección:</u>	Refractómetro diferencial de Waters 410
<u>Temperatura de la columna:</u>	$25^\circ\text{C}$
<u>Temperatura del detector:</u>	$35^\circ\text{C}$

Sólo se observó una contaminación ligera en un par de Zotes (E y D) (figura 2). No obstante, esto puede ser negado para facilitar un ensayo exacto y preciso mediante la cuantificación usando la altura mejor que el área y/o usando una curva estándar en rHA no formulada (es decir, la curva estándar puede ser preparada usando la rHA antes que el polisorbato 80 fuera añadido).

### Ejemplo 2

#### 1. Preparaciones farmacéuticas evaluadas

*Orthoclone™ OKT3*: la bibliografía del producto para Orthoclone™ OKT3 ((muromonab-CD3)-Janssen-Cilag GmbH, Alemania) declara que cada ampolla de 5 mL contiene entre otros ingredientes 1 mg de polisorbato 80. Para el análisis, 1,25 mL de producto fue evaluado, equivalente a 0,25 mg de polisorbato 80.

*Vepesid™ J 100*: ((etopósido)-Bristol Laboratories NJ, EEUU) contiene entre otros ingredientes 400 mg de polisorbato 80. Para el análisis de polisorbato 80, 5  $\mu\text{L}$  de producto fueron evaluados.

## ES 2 316 984 T3

*NovoSeven™ 240*: ((factor VIIa de coagulación recombinante) Novo Nordisk NS, Dinamarca) entre otros ingredientes contiene 0,65 mg de polisorbato 80. La reconstitución fue realizada como se describe en la bibliografía del producto por la adición de 8,5 mL de agua estéril para inyección, USP. Para el análisis de polisorbato 80, se evaluaron 3 mL de producto reconstruido.

5

### 2. Extracción y análisis de Polisorbato 80

El análisis de polisorbato 80 fue realizado como sigue:

10 (i) el equipamiento siguiente fue usado: 1 mL, 50 mg de cartuchos Bakerbond SDB1 SPE (Mallinckrodt Baker B.V.); 3 mL, 200 mg de cartuchos Bakerbond SDB1 SPE (Mallinckrodt Baker B.V.); sistema de HPLC analítica con autoinyector apto con bucle de muestra de 50  $\mu$ L, controlador de sistema e integrador; detector de índice de refracción adecuado para sistema de HPLC anterior; columnas Phenomenex Phenogel 50Å, de 5  $\mu$ m (300 X 7,8 mm); columna de seguridad Phenomenex Phenogel 50Å de 5  $\mu$ m (50 X 7,8 mm); calefactor de columna de HPLC y módulo de control  
15 (Waters, sin insertos); recipientes Sterilin (70 mL); frascos de vidrio con parte superior roscada (2 mL - 12 mm X 46 mm) con tapaderas; concentrador vaporizable giratorio Univap con rotor para frascos de 12 mm X 46 mm; frascos de vidrio de muestras de HPLC de 250  $\mu$ L con sellos de encaje.

20 (ii) los reactivos siguientes fueron usados: tiocianato amónico, grado AR (Fisher Chemicals); hexahidrato de nitrato de cobalto, grado AR (Fisher Chemicals); acetonitrilo, grado UV lejano (Fisher Chemicals); ácido etilendiaminatetraacético (sal disodio), grado Sigma Ultra (Sigma); tris(hidroximetil)aminometano, grado Sigma (Sigma); ácido clorhídrico (concentrado), grado SLR (Fisher Chemicals); hexano, grado Distol (Fisher Chemicals); tetrahidrofurano, grado GPC (Fisher Chemicals); trietilamina, grado AR (Fisher Chemicals); isopropanol, grado HPLC (Fisher Chemicals); metanol, grado HPLC (Fisher Chemicals); cloroformo, grado HPLC (Fisher Chemicals); agua, grado de laboratorio; tolueno, grado GPC (Fisher Chemicals); etanol, grado AR (Fisher Chemicals); polisorbato 80, materia  
25 prima CAPP 34 (Surfachem); ácido hexadecanoico, grado Sigma Ultra (Sigma).

(iii) las soluciones siguientes fueron usadas:

- 30 (a) Orthoclone™ OKT3, Vepesid™ J 100, y NovoSeven™ 240 tal y como se ha definido anteriormente, completado hasta 10 mL con agua de grado de laboratorio;
- (b) solución acuosa de albúmina humana recombinante 25% (p/v) conteniendo 15  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de polisorbato 80  
35 (10 mL).
- (c) reactivo ACT (71,2 g de tiocianato amónico y 11,2 g de hexahidrato de nitrato de cobalto disuelto en 20 mL de agua de grado de laboratorio, volumen completado hasta 100 mL).
- 40 (d) Solución de EDTA tamponada (37,22 g de ácido etilendiaminatetraacético, sal disódica (EDTA), y 60,55 g de tris(hidroximetil)aminometano disuelto en aproximadamente 900 mL de agua de grado de laboratorio, pH ajustado a 8.0 por adición de ácido clorhídrico concentrado y volumen completado hasta 1 L). La solución fue purificada usando extracción de fase sólida como sigue:
- 45 • un cartucho de 3 mL, 200 mg de Bakerbond SDB1 SPE fue lavado con 6 mL de THE seguido de 6 mL de agua de grado de laboratorio que permite que las soluciones fluyan a través bajo gravedad.
  - una bomba de Pharmacia P1 fue usada para pasar 6 mL de la solución de EDTA tamponada a través de la columna de SPE hasta aproximadamente 4 mL.min<sup>-1</sup> y la solución fue descartada.
  - 50 • la solución de EDTA tamponada restante fue bombeada a través de la columna SPE hasta aproximadamente 4 mL.min<sup>-1</sup> y recogida para el uso en el ensayo.
- (e) 30% (v/v) de acetonitrilo (30 mL de acetonitrilo fue mezclado con 70 mL de agua de grado de laboratorio);
- 55 (f) 1% (v/v) de trietilamina en hexano (200  $\mu$ L de trietilamina fueron disueltos en 19,8 mL de hexano);
- (g) tolueno:etanol (1:1) (10 mL de tolueno fueron mezclados con 10 mL de etanol);
- 60 (h) solución normal de polisorbato 80 (0,5000  $\pm$  0,0005 g de polisorbato 80 fue disuelta en un volumen final de 502 mL de agua de grado laboratorio en un matraz volumétrico de grado A). Concentración final = 10 mg.mL<sup>-1</sup>; y
- 65 (i) solución normal de "Aptitud del Sistema" (0,10 g de ácido hexadecanoico y 0,10 g de polisorbato 80 fueron disueltos en un volumen final de 10 mL de THF en un matraz aforado: concentración final = 10 mg.mL<sup>-1</sup> de polisorbato 80 y 10 mg.mL<sup>-1</sup> de ácido hexadecanoico; almacenado en 200  $\mu$ L partes alícuotas en ampollas de cristal a menos 20°C).

## ES 2 316 984 T3

(iv) la precipitación y eliminación de la proteína fue realizada como sigue:

- (a) En todos los tubos (estándares y pruebas) 4 mL de reactivo ACT fueron añadidos y la mezcla agitada suavemente para mezclarse.
- (b) En todos los tubos (estándares y pruebas) 20 mL de acetonitrilo fueron añadidos. Los tubos fueron cubiertos y agitados enérgicamente para romper precipitados viscosos y mezclados en vortex durante al menos 1 minuto. Los tubos fueron incubados a la temperatura ambiente durante 15 minutos.
- (c) Después de la incubación, cada muestra fue mezclada en vortex durante otro minuto y luego se centrifugó a 47.800 g (centrifugador Sorvall RC5C y rotor SS34 a 20.000 r.p.m.) a 4°C durante 20 minutos.
- (d) En 10 tubos Sterilin (70 mL), se añadieron 17 mL de solución de EDTA tamponada.
- (e) Después del centrifugado, todo el sobrenadante de cada tubo fue transferido en partes alícuotas separadas (17 mL) de solución de EDTA tamponada (preparada arriba).
- (f) Cada tubo de centrifugado fue enjuagado con otros 172 mL de solución de EDTA tamponada, que fue añadida al tubo Sterilin apropiado. Esto representa la preparación de tensoactivo purificada.

(v) la preparación de tensoactivo purificada fue adicionalmente purificada por extracción de la fase sólida (SPE). SPE fue realizado como sigue:

- (a) Según las instrucciones del fabricante, diez cartuchos de SPE Bakerbond SDB 1 de 1 mL, 50 mg de fueron ajustados al colector de SPE y lavados con 2 mL de cloroformo seguido de 2 mL metanol y finalmente 2 mL de acetonitrilo al 30% cada uno.
- (b) cada columna fue cargada (a aproximadamente 0,5 mL.min<sup>-1</sup>) con una preparación de tensoactivo purificada obtenida como se ha perfilado arriba.
- (c) cada columna fue lavada con 2 mL de acetonitrilo al 30% (v/v) seguido de 1 mL de isopropanol, 1 mL de trietilamina al 1% (v/v) en hexano y finalmente 1 mL de hexano. Los cartuchos de SPE fueron completamente secados para pasar aire a través de cada cartucho al vacío durante al menos 30 segundos.
- (d) frascos de vidrio de 2 mL con tapón de rosca fueron ajustados en el colector de SPE para recoger el eluato.
- (e) cada columna fue eluida con 2 partes alícuotas de 1000 mL de tolueno:etanol (1:1) a aproximadamente 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Después de cada alícuota, el eluato fue expulsado en el tubo de recogida pasando una jeringa de 10 mL llena de aire a través de la columna SPE .
- (f) todos los eluatos fueron secados usando evaporación por centrifugación a 50°C al vacío y luego resuspendidos en 200 µL de THF.
- (g) cada muestra fue transferida a frascos de HPLC de vidrio de 250 µL y sellados con tapaderas plegables.

(vi) El aparato de HPLC fue configurado como se muestra en la figura 3. El depósito de fase móvil, conteniendo 2 L de tetrahidrofurano (THF), fue colocado en un baño María termostáticamente controlado ajustado a 25°C. Un filtro de succión fue conectado al tubo de entrada de la bomba de HPLC y la fase móvil cebó la línea hasta la columna de seguridad colocada para expeler el aire. El autoinyector fue conectado a la columna de seguridad y luego se conectó a las columnas analíticas. Las columnas de seguridad y analíticas fueron colocadas en el horno controlado termostáticamente a 25°C según se establece en el módulo de control del horno de HPLC de Waters. Se dejó durante una hora para el equilibrado de la temperatura después de la instalación de las columnas. La salida de la columna analítica fue conectada al puerto de entrada del detector del índice de refracción, la referencia de detector del índice de refracción fue dirigida, y las salidas purgadas en un contenedor de residuos. El nivel de flujo de la bomba fue ajustado a 1.0 mL.min<sup>-1</sup> y el detector de índice de refracción fue ajustado a una sensibilidad de 256 y una constante de tiempo de 10 segundos. El horno de detector fue ajustado a 35°C. El controlador del sistema de HPLC e integrador fueron ajustados para recoger e integrar los datos cromatográficos según las instrucciones del fabricante. Antes del análisis, pruebas de aptitud del sistema fueron realizadas (véase abajo).

(vii) el siguiente procedimiento fue usado para el análisis de HPLC: el detector del índice de refracción fue purgado durante al menos una hora antes del uso y vigilado para una línea de referencia estable; solución de EDTA tamponada fue preparada y su extracción comenzada; todos los demás tampones de ensayo fueron preparados; la extracción de pruebas y estándares fue comenzada; el sistema de HPLC fue comenzado y equilibrado; la línea de referencia en HPLC fue controlada y la solución para la prueba preparada; una prueba de aptitud del sistema fue realizada; mientras que las muestras estaban siendo procesadas a través de SPE, el sistema de HPLC fue examinado para asegurar que la prueba de aptitud del sistema fuera aceptable; cuando la extracción fue completada, y la aptitud del sistema fue aceptable, fueron realizadas las muestras.

## ES 2 316 984 T3

(viii) una curva estándar extraída de polisorbato 80 fue obtenida a partir de 0,00: 0,10: 0,20: 0,30: 0,40 y 0,50 mg de polisorbato 80 en 10 mL de agua de laboratorio.

(ix) polisorbato 80 fue cuantificado por HPLC como sigue:

- (a) Inmediatamente después de realizar la prueba de aptitud del sistema, 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra fueron inyectados sobre la HPLC bajo las condiciones estándar anteriormente descritas.
- (b) después de la cromatografía de todas las muestras y la integración de los picos de polisorbato 80, una curva de calibración lineal de altura de pico de polisorbato 80 contra concentración estándar ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fue construida para los estándares mediante la realización de la regresión lineal para calcular la inclinación ( $m$ ) e interceptar el eje  $x$  ( $c$ ) para la curva estándar. Estos datos de regresión fueron usados para calcular la concentración de polisorbato 80 en las muestras de la prueba como sigue:

La línea de mejor ajuste para curva estándar es la altura del pico de polisorbato 80 en la prueba =  $mx + c$

Donde  $X$  = concentración de polisorbato 80 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Así:

$$\text{Concentración de Polisorbato 80 } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{(\text{Altura de pico de Polisorbato 80 en la prueba} - c)}{m}$$

La concentración media de polisorbato 80 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para las réplicas de la prueba fue luego calculada.

### 3. Resultados

La curva estándar extraída generó una curva de calibración lineal con una línea de regresión  $R^2$  de 0,999 y un porcentaje de CV para las alturas de picos normalizadas del 3,4% (figura 4). Comparación de la masa de polisorbato 80 medida contra la masa de formulación declarada usando la curva de calibración mostró un acuerdo cercano para Albúmina, NovoSeven<sup>TM</sup> y Vepesid<sup>TM</sup> (Tabla 3).

TABLA 3

Nombre comercial del producto	Masa de Polisorbato 80 / frasco (mg)	Masa de Polisorbato 80 / extracto (mg)	Altura de pico	Masa de medida (mg)	Porcentaje de (%) previsto
Albúmina	0,750	0,150	74975	0,15	100
Orthoclone <sup>TM</sup> OKT3	1,0	0,25	102763	0,20	81
Vepesid <sup>TM</sup> 100	400	0,40	202292	0,39	98
NovoSeven <sup>TM</sup> 240	0,56	0,20	93038	0,18	90

El método de cuantificación de polisorbato 80 en el producto final de rHA según se ha descrito anteriormente mostró que era adecuado para la cuantificación de todos los productos sin modificación de la metodología.

## ES 2 316 984 T3

### Pruebas de aptitud del sistema

#### Procedimiento

- 5 1. 50  $\mu\text{L}$  de la solución normal de aptitud del sistema fueron inyectados en la HPLC funcionando bajo las condiciones estándar.
2. La muestra para la prueba fue evaluada calculando las placas teóricas, formación de cola y resolución para polisorbato 80 y ácido hexadecanoico (véase abajo).
- 10 3. Si ninguno de los parámetros, bien para el polisorbato 80 o para el ácido hexadecanoico, era inferior al valor esperado las columnas fueron sustituidas con un grupo nuevo de columnas.

#### 15 Evaluación de la muestra para la prueba

1. El número de placas teóricas fue calculado para los picos de polisorbato 80 (primer pico de elución) y ácido hexadecanoico (segundo pico de elución) usando la Ecuación 1, con referencia a la Figura 5.

20

$$\text{Placas teóricas} = 16 \times \left( \frac{t}{W_b} \right)^2 \quad \text{Ecuación 1}$$

25

Valores previstos: polisorbato 80 > 650 placas teóricas

Ácido hexadecanoico > 6200 placas teóricas

30

2. La formación de cola de pico fue calculado para los picos de polisorbato 80 y de ácido hexadecanoico usando la Ecuación 2, con referencia a la Figura 6.

35

$$\text{Formación de cola} = \frac{W_{0.05}}{2 \times f} \quad \text{Ecuación 2}$$

40

Valores previstos: polisorbato 80 < 3.5

Ácido hexadecanoico < 3.0

45

3. La resolución entre polisorbato 80 y ácido hexadecanoico fue calculada usando la Ecuación 3, con referencia a la Figura 7.

50

$$\text{Resolución} = 2 \times \frac{V_2 - V_1}{W_{b1} + W_{b2}} \quad \text{Ecuación 3}$$

55

Valor esperado: resolución > 2.0

#### Referencias citadas en la descripción

60

*Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.*

#### Documentos de patente citados en la descripción

65

- EP 0341103 A [0002] [0003]
- US 5389279 A [0014]

## ES 2 316 984 T3

- US 5009814 A [0014]
- WO 0177137 A [0022] [0022]

### 5 Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- MANNING, M.C. PATEL, K. BORCHART, R.T. *Pharmaceutical Research*, 1989, vol. 6, 903-918 [0002]
- THUROW, H. GEISEN, K. *Diabetologia*, 1984, vol. 27, 212-218 [0002]
- 10 • GAREWAL *Anal. Biochem.*, 1973, vol. 54, 319-324 [0005]
- LANTEIGNE, D. KOBAYASHI, K. 6th Symposium on the Interface of Regulatory and Analytical Sciences for Biotechnology Health Products Biogen, Inc. 2002. [0007]
- 15 • Polyol Surfactants BECHER, P. Nonionic Surfactants, Schick Dekker 1967. 247-299 [0017]
- CHISLETT, L.R. WALFORD, J. *Int Flavours Food Addit.*, 1976, vol. 7, 61- [0017]
- 20 • VARMA, R.K. *et al. Arzneimittel-Forsch*, 1985, vol. 35, 804- [0017]
- CRABB PERSINGER *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 1961, vol. 41, 752-755 [0031]

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la eliminación de un componente proteináceo de una preparación de tensoactivo de fase líquida comprendiendo-
- (a) suministro de una preparación de tensoactivo de fase líquida conteniendo un componente proteináceo;
  - (b) adición de un agente complejante a la preparación de fase (a) y permitir que el agente complejante forme un complejo con el tensoactivo;
  - (c) simultáneamente con la fase (b) o posteriormente, adición de un agente precipitante miscible a la preparación de fase (a) o el producto de fase (b), respectivamente, para formar una mezcla reactiva de fase líquida y permitir que el agente precipitante miscible precipite el componente proteináceo dentro de la mezcla reactiva de fase líquida; y
  - (d) separación de dicho complejo del componente proteináceo precipitado en el producto de fase (c) para proporcionar una preparación de tensoactivo de fase líquida purificada;
- 20 donde el complejo permanece en solución dentro de la mezcla reactiva de fase líquida, y donde la fase (d) considera el complejo en la fase líquida.
2. Método según la reivindicación 1 donde el tensoactivo contiene uno o más grupos de óxido de alquileo.
- 25 3. Método según la reivindicación 1 o 2 donde el tensoactivo es no iónico, y es preferiblemente un condensado entre un alquilfenol y un óxido de alquileo; un polioxialquileo oleato de sorbitán; o un glicol polioxialquileo.
4. Método según la reivindicación 2 o 3 donde el agente complejante comprende un ión metálico polivalente, preferiblemente un ión metálico de transición.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el agente precipitante es un solvente acuoso orgánico miscible, tal como un alcohol, cianoalquilo, amina, amida, ácido carboxílico, aldehído, cetona, glicol, éter, alquilhaluro o hidrocarburo aromático, por ejemplo acetona, acetonitrilo o etanol.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el componente proteináceo comprende un péptido, polipéptido o proteína.
7. Método según la reivindicación 6 donde el componente proteináceo comprende albúmina, una proteína de fusión con albúmina, un anticuerpo monoclonal, etopósido o un factor de la coagulación sanguínea.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la concentración de proteína del componente proteináceo en la preparación de tensoactivo de fase líquida de fase (a) según la reivindicación 1 es al menos 50 mg/ml.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el tensoactivo está presente a menos de 4800 ppm con respecto al componente proteináceo en la preparación de tensoactivo de fase líquida de fase (a) según la reivindicación 1.
- 45 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la fase de suministro de una preparación de tensoactivo de fase líquida purificada comprende el centrifugado de la mezcla reactiva, de manera que el precipitado componente proteináceo forme un granulado y el complejo sea retenido en el sobrenadante, y la separación del sobrenadante del granulado.
- 50 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende la fase ulterior adicional de unir de manera no covalente el complejo a una fase sólida, preferiblemente un medio de extracción de la fase sólida (SPE).
- 55 12. Método según la reivindicación 11 donde el complejo es disociado antes de la fase de unión no covalente del tensoactivo a la fase sólida.
13. Método según la reivindicación 12 donde el complejo es disociado por la adición de un agente quelante al tensoactivo de la fase líquida purificada.
- 60 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 donde la fase sólida es un medio hidrofóbico de SPE .
15. Método según la reivindicación 14 donde el medio de SPE es un poliestireno divinilbenceno o un medio de C<sub>2-24</sub> alquilo.
- 65 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 donde el tensoactivo que es unido a la fase sólida es lavado para eliminar el componente proteináceo residual.

## ES 2 316 984 T3

17. Método según la reivindicación 16 donde la matriz es lavada con un solvente hidrosoluble orgánico, tal como acetonitrilo, isopropanol y/o trietilamina.

5 18. Método según la reivindicación 16 donde la fase sólida es lavada con un líquido que precipita el tensoactivo si estuviera en solución.

19. Método según la reivindicación 18 donde la fase sólida es lavada con un solvente orgánico insoluble en agua tal como hexano, cloroformo o tolueno.

10 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19 donde el tensoactivo es eluido de la fase sólida y recogido como un eluato.

15 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende la fase adicional de determinar el contenido de tensoactivo de la preparación de tensoactivo de la fase líquida purificada, u otra fracción derivada de la misma.

20 22. Método según la reivindicación 21 donde la preparación de tensoactivo de la fase líquida de fase (a) es una alícuota de una preparación mayor o es una muestra de un lote de preparaciones y el método comprende la fase adicional de correlacionar el contenido de tensoactivo determinado de la preparación de tensoactivo de fase líquida purificada, u otra fracción derivada de la misma, con el contenido de tensoactivo de la preparación mayor u otros elementos del lote.

25 23. Método según la reivindicación 22 que comprende la fase adicional de marcar apropiadamente la preparación mayor o los otros elementos del lote para reflejar el contenido de tensoactivo determinado.

30 24. Método de control de la calidad de un lote de una preparación farmacéutica con tensoactivo comprendiendo la determinación del contenido de tensoactivo de una muestra de la preparación usando un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

35

40

45

50

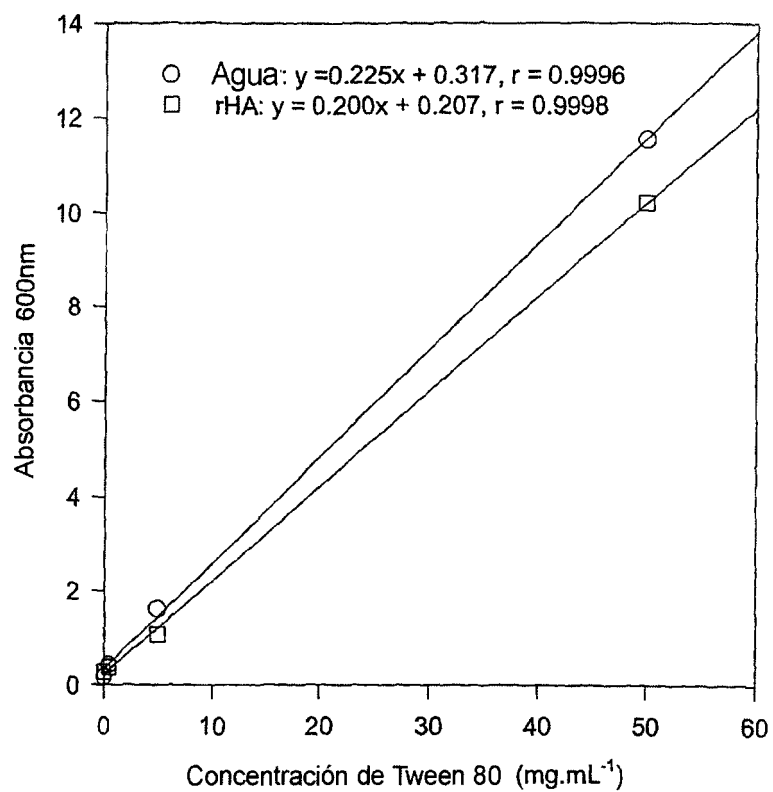
55

60

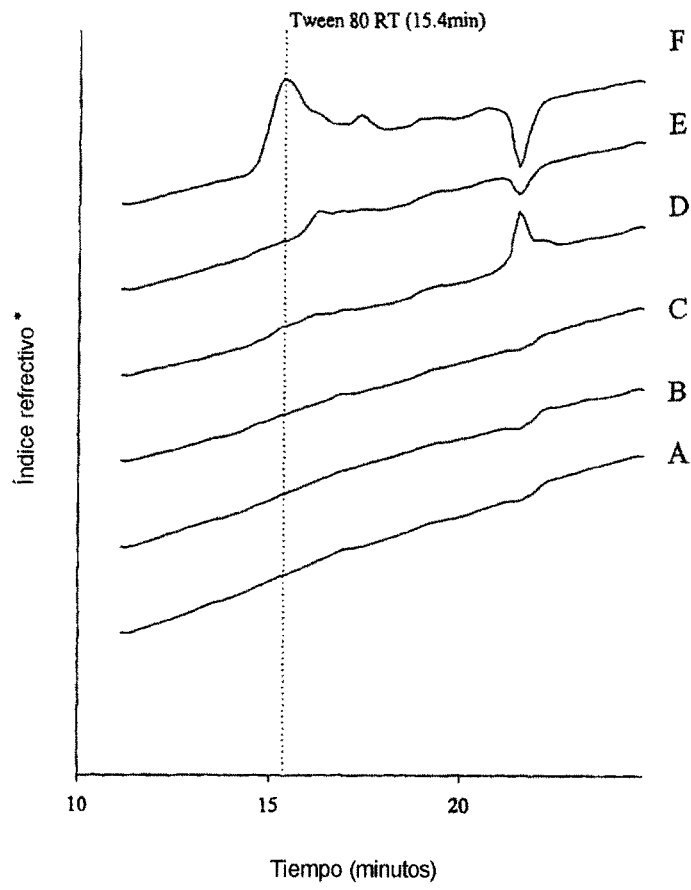
65

**FIG. 1**

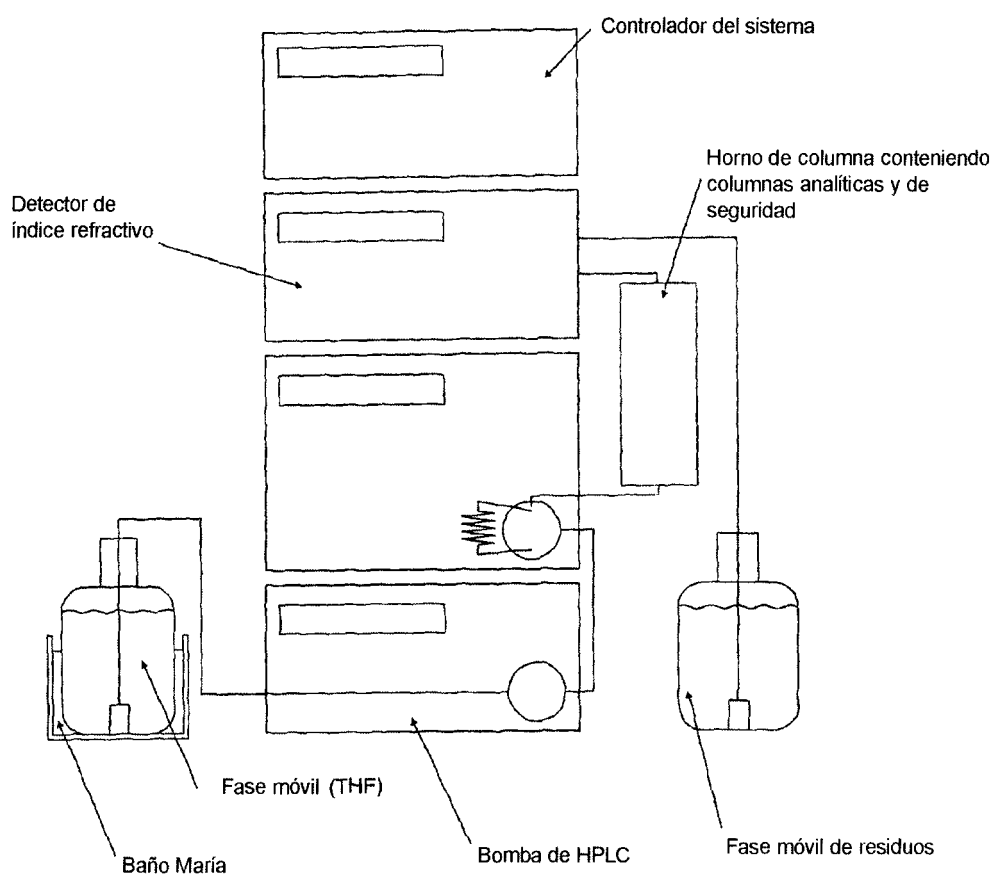
**Curvas estándar en agua y 5% (w/v) rHA**



**FIG.2**



**FIG.3**

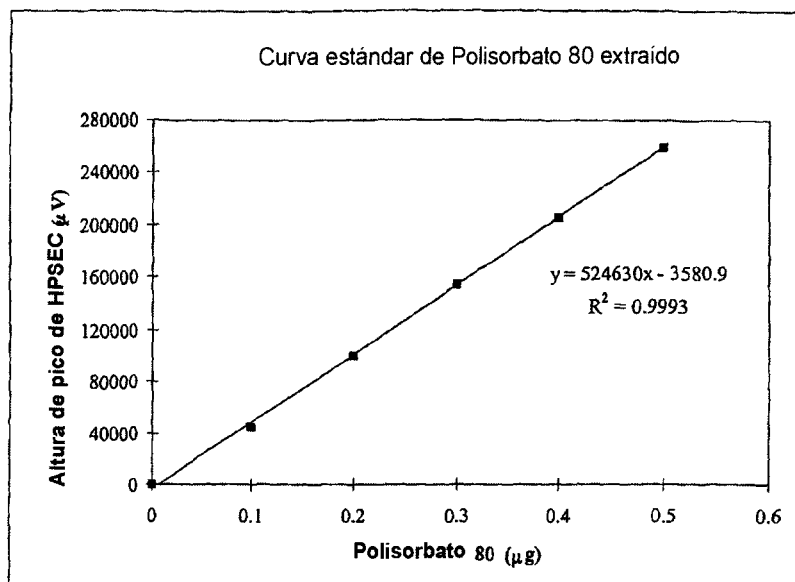


**FIG.4A**

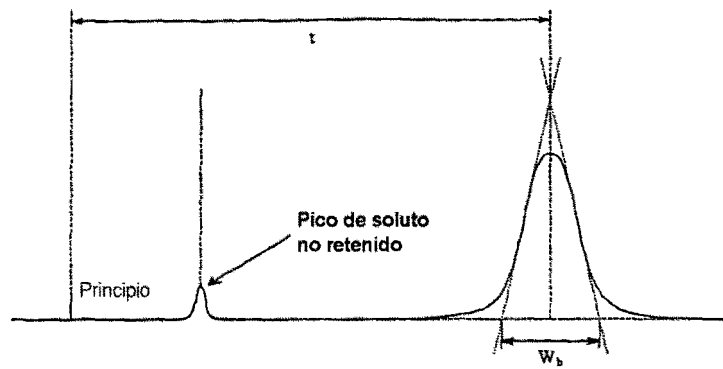
Masa de Polisorbato 80 (mg)	Altura de pico ( $\mu\text{V}$ )	Altura de pico normalizada
0	0	N/A
0.1	44956	485369
0.2	100007	517940
0.3	154746	527756
0.4	206210	524477
0.5	259541	526244
Porcentaje de CV		3.4

Datos de regresión	
Inclinación =	524630
Intercepción =	-3581
$R^2 =$	0.999

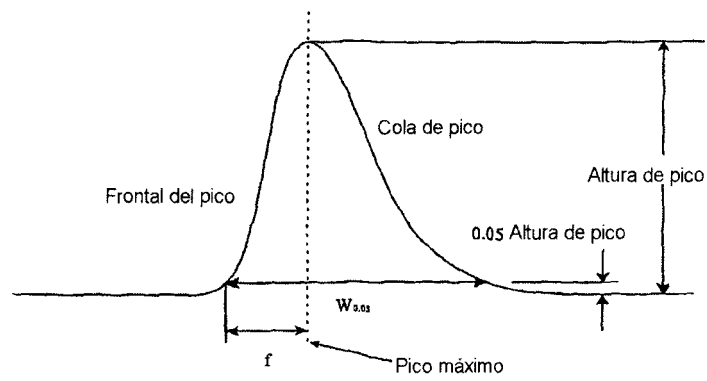
**FIG.4B**



**FIG.5**



**FIG.6**



**FIG.7**

