República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

BR112019002979B1

(11) BR 112019002979-6 B1

(22) Data do Depósito: 14/08/2017

(45) Data de Concessão: 03/10/2023

(54) Título: MÉTODO DE CROMATOGRAFIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE UM TENSOATIVO NÃO IÔNICO EM UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O TENSOATIVO NÃO IÔNICO E UM POLIPEPTÍDEO

(51) Int.Cl.: G01N 30/96; G01N 30/36; A61K 47/00.

(30) Prioridade Unionista: 15/08/2016 US 62/375,373.

(73) Titular(es): GENENTECH, INC..

(72) Inventor(es): MARY MONTTI; RICHARD L. BEARDSLEY; MICHAEL S. CHINN.

(86) Pedido PCT: PCT US2017046725 de 14/08/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/035025 de 22/02/2018

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/02/2019

(57) Resumo: A invenção fornece métodos para quantificação de um tensoativo não iônico em uma composição que compreende um polipeptí-deo e o tensoativo não iônico, em que a quantificação apresenta interferência reduzida entre o tensoativo não iônico e o polipeptídeo. São também fornecidos métodos em que a composição inclui ainda N-acetil-triptofano, e a quantificação apresenta uma interferência reduzida entre o tensoativo não iônico, o polipeptídeo e o N-acetil-triptofano.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO DE CROMATOGRAFIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE UM TENSOATIVO NÃO IÔNICO EM UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O TENSOATIVO NÃO IÔNICO E UM POLIPEPTÍDEO".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório US n. 62/375,373, depositado em 15 de agosto de 2016, cuja divulgação é incorporada neste documento por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção fornece métodos para analisar formulações de polipeptídeos quanto à presença de polissorbatos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] O polissorbato 20 (PS20) é um tensoativo comumente usado em formulações de polipeptídeos para proteger o produto de danos físicos durante o processamento e armazenamento (Kerwin, B., 2007, *J. Pharm. Sci.* 97 (8): 2924-2935). Devido à sua importância para a estabilidade do produto, o PS20 deve ser quantificado com precisão no sistema de controle de cada produto. O PS20 pode ser quantificado por ensaio espectrofotométrico, ensaio de micela fluorescente, ou Detector de Espalhamento de Luz Evaporativo por Cromatografia Líquida de Alto desempenho (HPLC-ELSD) (*vide*, por exemplo, Kim, J. e Qiu, J., *Analytica chimica acta* 806: 144-151, 2014; Hewitt *et al*., *Journal of Chromatography A*, 1215 (1): 156-160, 2008).

[004] O ensaio do detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD) é preferido como ensaio do sistema de controle porque, em relação ao ensaio de micelas fluorescentes, não requer tempos de condicionamento longos. O método ELSD também pode evitar a necessidade de usar o mesmo lote de polissorbato para a preparação da curva padrão conforme foi usada na produção. Além disso, o ensaio de

micela fluorescente é suscetível à interferência não específica da proteína, particularmente para proteínas hidrofóbicas e conjugados de anticorpo e fármaco (ADCs). O fármaco ligante vcMMAE de ADCs introduz hidrofobicidade adicional à proteína, o que pode levar ao aumento da interferência de proteínas ao quantificar o PS20. Em alguns casos, esta interferência de proteína não específica pode ser mitigada usando o ensaio de HPLC-ELSD.

[005] Embora o ensaio HPLC-ELSD possa reduzir o grau de interferência de proteínas, essa interferência não é completamente eliminada. A questão da interferência de proteínas torna-se particularmente problemática em baixas concentrações de polissorbato e com mais proteínas hidrofóbicas e/ou concentradas. Além disso, o efeito da interferência da proteína é altamente dependente do lote de resina do cartucho usado. As estratégias para mitigar esses problemas incluem a) adição padrão de PS20 para diluir a interferência de proteína sem diminuir a resposta do PS20, e b) remoção da proteína da amostra por precipitação de proteína.

[006] A abordagem de adição padrão implica a diluição de uma amostra com uma solução mãe de PS20 na concentração alvo da formulação. Esta preparação de amostra dilui a concentração de proteína enquanto mantém uma concentração de PS20 aproximadamente inalterada. A quantidade de PS20 adicionada à amostra é então subtraída durante a análise de dados. Uma vez que a relação entre a resposta do ELSD e a massa analisada no detector segue uma lei de potência, a adição no PS20 diminui desproporcionalmente de acordo com a contribuição da proteína para o sinal do ELSD. A abordagem de adição padrão foi mostrada para aprimorar a precisão da quantificação de PS20 em alguns casos, mas nos casos em que esta não é uma solução viável, a precipitação de proteína deve ser usada. Embora seja eficaz na remoção da interferência de proteínas, o método de precipi-

tação HPLC-ELSD não é ideal devido ao tempo de preparação da amostra durante a noite, grandes volumes de amostra e variabilidade da preparação da amostra. Pelo contrário, a remoção de proteína usa as mesmas condições de HPLC-ELSD, mas sem procedimentos significativos de preparação de amostras. O que é necessário é uma solução mais robusta para eliminar a interferência de proteínas e produzir quantificação de PS20 consistente em todas as condições de cromatografia.

[007] Todas as referências citadas neste documento, incluindo pedidos de patente e publicações são incorporadas por referência em sua totalidade.

BREVE SUMÁRIO

[008] Em alguns aspectos, a invenção fornece um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que a interferência entre o tensoativo não iônico e o polipeptídeo durante a quantificação é reduzida, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma fase móvel A e uma fase móvel B, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol, em que o polipeptídeo se liga ao material de cromatografia especificamente e não especificamente b) eluir o polipeptídeo especificamente ligado a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada em comparação com a etapa a); c) eluir o tensoativo não iônico e o polipeptídeo ligado não especificamente a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a ra-

zão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada em comparação com a etapa c); d) quantificar o tensoativo não iônico, em que a interferência entre o tensoativo não iônico e o polipeptídeo durante a quantificação seja reduzida. Em algumas modalidades, a razão da fase móvel B para a fase móvel A na etapa a) é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 40:60 na etapa b). Em algumas modalidades, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 100:0 na etapa c). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende cerca de 2% de ácido em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende cerca de 2% de ácido em metanol. Em algumas modalidades, o ácido é ácido fórmico. Em algumas modalidades, o ácido é ácido acético. Em algumas modalidades, o caudal da cromatografia é de cerca de 1,25 mL/minuto. Em algumas modalidades, a etapa b) começa cerca de 1 min após a cromatografia ser iniciada e termina cerca de 3,4 min após a cromatografia ser iniciada. Em algumas modalidades, a etapa c) começa cerca de 3,5 min após a cromatografia ser iniciada e termina cerca de 4,6 min após a cromatografia ser iniciada. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é poloxâmero (P188) ou um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de tensoativos não iônicos na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL. Em algumas modalidades, a formulação tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5. Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para adminis-

tração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glicomanipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[009] Em alguns aspectos, a invenção fornece um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma fase móvel A e uma fase móvel B, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B

compreende hidróxido de amônio em um solvente orgânico; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada em comparação com a etapa a); c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada em comparação com a etapa c); d) quantificar o tensoativo não iônico. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, a razão da fase móvel B para a fase móvel A na etapa a) é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 45:55 na etapa b). Em algumas modalidades, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 100:0 na etapa c). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende cerca de 2% de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende cerca de 2% de hidróxido de amônio em metanol. Em algumas modalidades, o caudal da cromatografia é de cerca de 1,4 mL/minuto. Em algumas modalidades, a etapa b) começa cerca de 1 min após a cromatografia ser iniciada e termina cerca de 4,4 min após a cromatografia ser iniciada. Em algumas modalidades, a etapa c) começa cerca de 4,5 min após a cromatografia ser iniciada e termina cerca de 7,6 min após a cromatografia ser iniciada. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v). Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a razão da fase móvel B para a fase móvel A na etapa a) é de cerca de 10:90.

Em algumas modalidades, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 40:60 na etapa b). Em algumas modalidades, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para 100:0 na etapa c). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende cerca de 2% de hidróxido de amônio em água ou em 43% de metanol. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende cerca de 2% de hidróxido de amônio em acetonitrila. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um poloxâmero. Em algumas modalidades, o poloxâmero é um poloxâmero P188. Em algumas modalidades, a concentração de poloxâmero na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente N-acetil triptofano e/ou metionina. Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM. Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeos na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL. Em algumas modalidades, a formulação tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5. Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glicomanipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THI-

OMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0010] A FIG. 1 é uma sobreposição de A1 ADC livre de PS20 e um padrão de PS20 de 0,6 mg/ml usando o gradiente de múltiplas etapas para aumentar 5% de metanol. O solvente de eluição contém 2% de ácido fórmico.

[0011] A FIG. 2 mostra a comparação de uma experiência de gradiente de várias etapas de metanol e uma experiência de gradiente de uma etapa de isopropanol (ambos contendo 2% de ácido fórmico) em cartuchos diferentes. Para cada sobreposição, há A1 ADC livre de PS20 em um primeiro cartucho (traço 1), A1 ADC livre de PS20 em um segundo cartucho (traço 2) e no padrão de PS20 (traço 3).

[0012] A FIG. 3 mostra resultados do projeto de otimização do método experimental. As linhas sólidas mostram a direcionalidade de acordo com o modelo estatístico que o software JMP10 ajusta aos dados. As linhas pontilhadas que delimitam cada linha sólida indicam erro

associado ao ajuste. Os declives das linhas indicam o efeito que cada fator teve na área de pico de PS20 e largura de pico de PS20.

[0013] A FIG. 4 mostra uma comparação dos cromatogramas do método de PS20 a partir da otimização do método DoE com uma lavagem de 40% de MeOH e com lavagem de 50% de MeOH. Para estes experimentos, a vazão foi 1,25 mÇ/min, 12 µg de PS20 foram carregados e a duração da lavagem foi de 3 minutos.

[0014] A FIG. 5 mostra A10 ADC de 10 mg/ml livre de PS20 e padrão de PS20 de 0,6 mg/ml com 0,2% de ácido trifluoroacético na fase móvel.

[0015] A FIG. 6 mostra A1 ADC de 20 mg/ml livre de PS20 e padrão de PS20 de 0,6 mg/ml com 2% de ácido fórmico na fase móvel.

[0016] A FIG. 7 mostra A1 ADC de 20 mg/ml livre de PS20 e 0,7 mg/ml de padrão de PS20 com 2% de ácido acético na fase móvel.

[0017] A FIG. 8 mostra uma comparação entre as fases móveis contendo ácido fórmico e ácido acético usando as seguintes amostras: água (traço 1), A1 ADC livre de PS20, 20 mg/ml (traço 2) e 0,2 mg/ml de PS20 marcado em A1 ADC, 20 mg/ml (traço 3).

[0018] A FIG. 9 mostra vários perfis da volta padrão de PS20 em cartuchos OASIS® MAX diferentes usando eluição com metanol/ácido acético. Perfil típico (traço 1), pico com alargamento (traço 2), pico mostrando separação (traço 3) e pico com alargamento leve (traço 4). Esta variabilidade no perfil não afeta a quantificação dos padrões, controles ou amostras de proteína.

[0019] A FIG. 10 mostra o método de MeOH/ácido acético. Injeções comuns de 20 µl de água (traço 1), tampão de formulação de A1 ADC livre de PS20 (traço 2), A1 ADC livre de PS20 (traço 3) e o padrão mais baixo de PS20 a 0,1 mg/mL (traço 4).

[0020] As FIGS. 11A e 11B mostram a avaliação de A16/A17 livre de PS20 usando o Método 1 do Exemplo 1. A FIG. 1A mostra ELSD e

A FIG. 1B mostra UV (280 nm). Água (traço 1), tampão de formulação de A16/A17 livre de PS20 (traço 2) e proteína A16/A17 livre de PS20 (traço 3) foram avaliados usando o Método 1 do Exemplo 1.

[0021] As FIGS.12A e 12B mostram cromatogramas de ELSD de componentes de tampão de A16/A17 diferentes usando o método do Exemplo 1. A FIG. 12A mostra tampões com NAT: 20 mM de histidina-HCl, 1mM de NAT, 5 mM de metionina, 240 mM de sacarose (traço 1); 20 mM de histidina-HCl, 1 mM de NAT, 240 mM de sacarose (traço 2); 20 mM de histidina-HCl, 5 mM de NAT (traço 3). A FIG. 12B mostra tampões sem NAT: 20 mM de histidina-HCl, 5 mM de metionina, 240 mM de sacarose (traço 1); 20 mM de histidina-HCl, 25 mM de metionina (traço 2); 20 mM de histidina-HCl (traço 3). Injeções de tampão de 50 µL.

[0022] As FIGS.13A e 13B mostram cromatogramas ELSD de componentes de tampão diferentes usando um modo modificado (cartucho MCX e hidróxido de amônio na fase móvel). A FIG. 13A mostra tampões com NAT: 20 mM de histidina-HCl, 1mM de NAT, 5 mM de metionina, 240 mM de sacarose (traço 1); 20 mM de histidina-HCl, 1 mM de NAT, 240 mM de sacarose (traço 2); 20 mM de histidina-HCl, 5 mM de NAT (traço 3); e proteína livre de PS20 com NAT (traço 4). A FIG. 13B mostra tampões sem NAT: 20 mM de histidina-HCl, 5 mM de metionina, 240 mM de sacarose (traço 1); 20 mM de histidina-HCl, 25 mM de metionina (traço 2); 20 mM de histidina-HCl (traço 3). Injeções de 50 µL.

[0023] As FIGS.14A e 14B mostram a avaliação da proteína A16/A17 livre de PS20 com 0,15-1,50% de aditivo de hidróxido de amônio na fase móvel. A FIG. 14A mostra cromatogramas ELSD. A FIG. 14B mostra cromatogramas UV (280 nm). Injeção de 50 µL de proteína A16/A17 livre de PS20 com 0,15, 0,29, 0,73 e 1,5% de hidróxido de amônio na fase móvel (traços 1, 2, 3 e 4, respectivamente) e tampão de formulação A16/A17 livre de PS20 hidróxido de amônio a

1,5% (traço 5).

[0024] As FIGS.15A e 15B mostram a avaliação de 20-60% da fase de lavagem B da fase móvel. A FIG. 15A mostra cromatogramas ELSD. A FIG. 15B mostra cromatogramas UV (280 nm). Injeção de 15 µL de proteína A16/A17 livre de PS20. 20, 30, 40, 50 e 60% da fase móvel B (etapa de lavagem), mostrada como traços 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

[0025] A FIG. 16 mostra a avaliação dos tempos de lavagem e volumes de injeção para proteína A16/A17 livre de PS20 por cromatografia ELSD. Injeção de 25 µL de amostra A16/A17 livre de PS20: etapa de lavagem de 3,4 minutos (traço 1). Injeção de 50 µL de amostra A16/A17 livre de PS20: etapa de lavagem de 3,4 minutos (traço 2) e etapa de lavagem de 2,4 minutos (traço 3).

[0026] As FIGS.17A e 17B mostram a avaliação de vazões diferentes para A18/A19 livre de PS20. A FIG. 17A mostra cromatogramas ELSD. A FIG. 17B mostra cromatogramas UV (280 nm). 25 µL de A18/A19 livre de PS20 (150 mg/mL) com vazões diferentes: 1,6, 1,4, 1,25, 1,0 e 0,8 mL/min, correspondendo aos traços 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

[0027] A FIG. 18 mostra a avaliação de tempos de eluição diferentes para PS20 em água por cromatografia ELSD. Injeção de 50 µL de 0,1 mg/mL de PS20 em água, 3,1 minutos de eluição (traço 1) ou 1,1 minutos de eluição (traço 2).

[0028] A FIG. 19 mostra a avaliação do método finalizado 2 por cromatografia ELSD. Injeção de 25 µL de água (traço 1), 150 mg/mL de A18/A19 livre de PS20 (traço 2), 0,2 mg/mL de PS20 adicionado em água (traço 3) e 0,2 mg/mL de PS20 adicionado em A18/A19 (traço 4) usando os parâmetros finalizados para o Método 2.

[0029] As FIGS. 20A-20F mostram a avaliação da especificidade para três produtos diferentes. As FIGS. 20A (A18/A19), 20C (A16/A17)

e 20E (A14/A20) mostram cromatogramas ELSD. As FIGS. 20B (A18/A19), 20D (A16/A17) e 20F (A14/A20) mostram cromatogramas UV (280 nm). Formulação livre de PS20 (traço 1), proteína livre de PS20 (traço 2) e PS20 0,1 mg/mL em água (traço 3).

[0030] A FIG. 21 mostra a avaliação da variabilidade de cartucho para cartucho usando PS20 misturada com água ou A18/A19 livre de PS20 por cromatografia ELSD. Cartucho 2, 0,1 mg/mL de PS20 adicionado em A18/A19 livre de PS20 (traço 1); Cartucho 6, 0,1 mg/mL de PS20 adicionado em A18/A19 livre de PS20 (traço 2); cartucho 2, 0,2 mg/mL de PS20 adicionado em água (traço 3); e cartucho 6, 0,2 mg/mL de PS20 adicionado em água (traço 4).

[0031] A FIG. 22 mostra a avaliação da variabilidade de cartucho para cartucho usando PS20 adicionado em água ou A18/A19 livre de PS20 por cromatografia ELSD. Cartucho 4, 0,2 mg/mL de PS20 adicionado em A18/A19 livre de PS20 (traço 1); Cartucho 6, 0,2 mg/mL de PS20 adicionado em A18/A19 livre de PS20 (traço 2); cartucho 4, 0,2 mg/mL de PS20 adicionado em água (traço 3); e cartucho 6, 0,2 mg/mL de PS20 adicionado em água (traço 4).

[0032] A FIG. 23 mostra cromatogramas ELSD para amostras de controle usadas em uma sequência incluindo 100 injeções de A18/A19 em um único cartucho. Sobreposição de 11 amostras de controle injetadas ao longo da sequência.

[0033] A FIG. 24 mostra cromatogramas ELSD para amostras de A18/A19 usadas em uma sequência incluindo 100 injeções de A18/A19 em um único cartucho. Sobreposição de 100 injeções de amostras de A18/A19 em toda a sequência.

[0034] As FIGS. 25A e 25B mostram cromatogramas da 1ª, 50ª e 100ª injeções de proteína de uma sequência incluindo 100 injeções de A18/A19 em um único cartucho.

[0035] As FIGS. 26A e 26B mostram os resultados de quantifica-

ção de 100 injeções de amostra A18/A19 (nominal 0,2 mg/mL de PS20) usando o cartucho 4. A FIG. 26A mostra a área de PS20 vs número de injeções. A FIG. 26B mostra a concentração de PS20 vs número de injeções.

[0036] As FIGS. 27A e 27B mostram os resultados de quantificação de 100 injeções de tampão de formulação de A18/A19 (nominal 0,2 mg/mL de PS20) usando o cartucho 5. A FIG. 27A mostra a área de PS20 vs número de injeções. A FIG. 27B mostra a concentração de PS20 vs número de injeções.

[0037] As FIGS. 28A e 28B mostram os resultados de quantificação de 100 injeções de 0,2 mg/mL de PS20 misturado em água usando o cartucho 3. A FIG. 28A mostra a área de PS20 vs número de injeções. A FIG. 28B mostra a concentração de PS20 vs número de injeções.

[0038] As FIGS. 29A-29F mostram a avaliação de três produtos de baixo índice de imunidade usando o Método 1 e o Método 2 por cromatografia ELSD. As FIGS. 29A, 29C e 29E mostram cromatogramas para o Método 1 com A21, A14/A15 e A14, respectivamente. As FIGS. 29B, 29D e 29F mostram cromatogramas para o Método 2 com A21, A14/A15 e A14, respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0039] A invenção fornece métodos para quantificação de um tensoativo não iônico em uma composição que compreende um polipeptídeo e o tensoativo não iônico, em que a quantificação apresenta interferência reduzida entre o tensoativo não iônico e o polipeptídeo. São também fornecidos métodos em que a composição inclui ainda N-acetil triptofano, e a quantificação apresenta uma interferência reduzida entre o tensoativo não iônico, o polipeptídeo e o N-acetil-triptofano.

Definições

[0040] O termo "polipeptídeo" ou "proteína" são usados intercam-

biavelmente neste documento para se referir aos polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender aminoácidos modificados, e pode ser interrompido por não aminoácidos. Os termos também englobam um polímero de aminoácido que tenha sido modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, pela formação da ligação de dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação ou qualquer outra manipulação ou modificação, como conjugação com um componente de marcação ou toxina. Estão também incluídos na definição, por exemplo, polipeptídeos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, *etc.*), bem como outras modificações conhecidas na técnica. Os termos "polipeptídeo" e "proteína", conforme usados neste documento, englobam especificamente anticorpos.

[0041] Polipeptídeo "purificado" (*por exemplo*, anticorpo ou imunoadesina) significa que o polipeptídeo foi aumentado em pureza, de modo que existe em uma forma que é mais pura do que existe no seu ambiente natural e/ou quando inicialmente sintetizado e/ou amplificado em condições laboratoriais. A pureza é um termo relativo e não significa necessariamente pureza absoluta.

[0042] O termo "antagonista" é usado no sentido lato e inclui qualquer molécula que total ou parcialmente bloqueia, inibe ou neutraliza uma atividade biológica de um polipeptídeo nativo. De modo semelhante, o termo "agonista" é usado em sentido mais amplo e inclui qualquer molécula que imita uma atividade biológica de um polipeptídeo nativo. Moléculas de agonistas ou antagonistas adequadas especificamente incluem anticorpos agonistas ou antagonistas ou fragmentos de anticorpos, fragmentos ou variantes da sequência de aminoácidos do polipeptídeos nativos, *etc.* Métodos para a identificação dos antagonistas ou agonistas de um polipeptídeo podem compreender o

contato com um polipeptídeo com uma molécula de um agonista ou antagonista do candidato e medição de uma alteração detectável em uma ou mais atividades biológicas normalmente associadas ao polipeptídeo.

[0043] Um polipeptídeo "que se liga" a um antígeno de interesse, *por exemplo* um alvo de antígeno de polipeptídeo associado a tumor, é aquele que se liga ao antígeno com suficiente afinidade, de tal modo que o polipeptídeo é útil como um agente de diagnóstico e/ou terapêutico para direcionar uma célula ou tecido que expressa o antígeno e que não reage significativamente de forma cruzada com outros polipeptídeos. Em tais modalidades, a extensão da ligação do polipeptídeo a um polipeptídeo "não alvo" será inferior a cerca de 10% da ligação do polipeptídeo ao seu polipeptídeo alvo particular, tal como determinado pela análise de classificação de células ativadas por fluorescência (FACS) ou por radioimunoprecipitação (RIA).

[0044] No que diz respeito à ligação de um anticorpo para uma molécula alvo, o termo "ligação específica" ou "liga-se especificamente a" ou é "específico para" um polipeptídeo particular ou um epítopo em um polipeptídeo alvo particular, significa que a ligação que é mensuravelmente diferente de uma interação não específica. Ligação específica pode ser medida, por exemplo, por meio da determinação da ligação de uma molécula em comparação com a ligação de uma molécula de controle, a qual geralmente é uma molécula de estrutura semelhante que não tem atividade de ligação. Por exemplo, a ligação específica pode ser determinada por competição com uma molécula de controle que é semelhante ao alvo, por exemplo, um excesso de alvo não marcado. Nesse caso, a ligação específica é indicada se a ligação do alvo marcado a uma sonda é inibida competitivamente pelo excesso de alvo não marcado.

[0045] O termo "anticorpo", é usado neste documento no sentido

mais amplo e abrange especificamente anticorpos intactos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos *(por exemplo*, anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpos, desde que exibam a desejada atividade biológica. O termo "imunoglobulina" (Ig) é usado intercambiavelmente com anticorpo neste documento.

[0046] Os anticorpos são moléculas de imunoglobulina de ocorrência natural que possuem estruturas variáveis, todas baseadas na dobra de imunoglobulina. Por exemplo, os anticorpos IgG possuem duas cadeias "pesadas" e duas cadeias "leves" que são ligadas por dissulfeto para formar um anticorpo funcional. Cada cadeia pesada e leve em si compreende uma região "constante" (C) e uma região "variável" (V). As regiões V determinam a especificidade da ligação ao antígeno do anticorpo, enquanto as regiões C provêm suporte estrutural e funcionam em interações não específicas de antígenos com efetores imunes. A especificidade de ligação ao antígeno de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo é a capacidade de um anticorpo de se ligar especificamente a um antígeno particular.

[0047] A especificidade de ligação ao antígeno de um anticorpo é determinada pelas características estruturais da região V. A variabilidade não é distribuída uniformemente em toda a extensão do aminoácido 110 dos domínios variáveis. Em vez disso, as regiões V consistem em trechos relativamente invariáveis chamados regiões de framework (FRs) de 15-30 aminoácidos separados por regiões mais curtas de extrema variabilidade chamadas de "regiões hipervariáveis" (HVRs) que têm, cada uma, de 9-12 aminoácidos longos. Os domínios variáveis de cadeias leves e pesadas nativas, cada um, compreendem quatro FRs, amplamente adotando uma configuração β-folha, conectada por três regiões hipervariáveis, que formam conexão em alças e, em alguns casos, formando parte da estrutura β-folha. As regiões hipervariáveis

em cada cadeia são mantidas juntas em proximidade estreita por FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação de antígeno de anticorpos (*vide* Kabat *et al*., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, tais como participação do anticorpo na citoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

[0048] Cada região V compreende tipicamente três HVRs, *por exemplo*, regiões determinantes de complementariedade ("CDRs", cada uma das quais contém uma "alça hipervariável") e quatro regiões de framework. Um local de ligação do anticorpo, a unidade estrutural mínima necessária para se ligar com uma afinidade substancial a um antígeno desejado particular, irá, portanto, incluir tipicamente as três CDRs, e pelo menos três, preferencialmente quatro, regiões de framework intercaladas entre elas para manter e apresentar as CDR na conformação apropriada. Os anticorpos clássicos de quatro cadeias têm locais de ligação ao antígeno que são definidos por domínios V_H e V_L em cooperação. Certos anticorpos, como os anticorpos de camelo e tubarão, carecem de cadeias leves e dependem de sítios de ligação formados apenas por cadeias pesadas. As imunoglobulinas modificadas de domínio único podem ser preparadas naqueles sítios de ligação que são formados apenas por cadeias pesadas ou cadeias leves, na ausência de cooperação entre V_H e V_L.

[0049] O termo "variável" se refere ao fato de que certas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente na sequência entre os anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo em particular ao seu antígeno específico. No entanto, a variabilidade não está uniformemente distribuída ao longo dos domínios variáveis

dos anticorpos. Está concentrada em três segmentos denominados regiões hipervariáveis, tanto nos domínios variáveis da cadeia leve como nos domínios variáveis da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são denominadas as regiões de framework (FRs). Os domínios variáveis de cadeias leves e pesadas nativas, cada um, compreendem quatro FRs, amplamente adotando uma configuração β-folha, conectada por três regiões hipervariáveis, que formam conexão em alças e, em alguns casos, formando parte da estrutura β-folha. As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em proximidade estreita por FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação de antígeno de anticorpos (*vide* Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, tais como participação do anticorpo na citoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

[0050] O termo "região hipervariável" (HVR), quando usado neste documento, diz respeito aos resíduos de aminoácido de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável pode compreender resíduos de aminoácidos a partir de uma "região determinante de complementariedade" ou "CDR" (*por exemplo*, em torno de cerca de 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) resíduos na V_L, e em torno de cerca de 31-35B (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) na V_H (Kabat *et al*., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) e/ou aqueles resíduos de uma "alça hipervariável" (*por exemplo* resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) na V_L, e 26-32 (H1), 52A-55 (H2) e 96-101 (H3) na V_H (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

[0051] Resíduos de "framework" ou "FR" são aqueles resíduos de domínio variável que não são os resíduos de região hipervariável como definidos neste documento.

[0052] Os "fragmentos de anticorpo" compreende uma porção de um anticorpo intacto, preferencialmente compreendendo a região de ligação ao antígeno do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem Fab, Fab', $F(ab')_2$, e fragmentos de Fv; diacorpos ("diabodies"); anticorpos tandem (*por exemplo*, vide a Patente U.S. n. 5,641,870, Exemplo 2; Zapata *et al*., *Protein Eng*. 8 (10): 1057-1062 (1995)); anticorpos de um braço, anticorpos de domínio variável único, minicorpos, moléculas de anticorpos de cadeia única; anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo (*por exemplo*, incluindo, mas não limitado a, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3, (scFV)4-Fc, di-scFv, bi-scFv ou tandem (di, tri)-scFv); e acopladores biespecíficos de células T (BiTEs).

[0053] A digestão por papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação ao antígeno idênticos, chamados fragmentos "Fab", cada um com um único sítio de ligação a antígeno, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete sua habilidade de cristalizar rapidamente. Tratamento com pepsina rende um fragmento $F(ab')_2$ que possui dois sítios de ligação ao antígeno e é capaz, ainda, de reticular antígenos.

[0054] "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio completo de ligação ao antígeno e de reconhecimento ao antígeno. Esta região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia leve e um de cadeia pesada em associação estreita, não covalente. É nesta configuração que as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação ao antígeno na superfície do dímero V_H-V_L. Coletivamente, as seis regiões hipervariável conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv com-

preendendo somente três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) tem a capacidade para reconhecer e ligar antígeno, embora em uma afinidade inferior ao local de ligação inteiro.

[0055] O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de poucos resíduos no terminal carbóxi do domínio CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de articulação de anticorpo. Fab'-SH é a designação neste documento para Fab' no qual o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes carregam pelo menos um grupo tiol livre. Fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ originalmente foram produzidos como pares de fragmentos Fab', os quais têm cisteínas de dobradiça entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos também são conhecidos.

[0056] As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de quaisquer espécies de vertebrados podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, denominados capa (κ) e lambda (λ), com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

[0057] Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos podem ser atribuídos a diferentes classes. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e vários deles podem ser divididos em "subclasses" (isotipos), *por exemplo,* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem a diferentes classes de anticorpos são denominados α, δ, ε, γ, e μ, respectivamente. As estruturas de subunidade e as configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

[0058] Fragmentos de anticorpos "Fv de cadeia simples" ou "scFv" compreendem os domínios V_H e V_L do anticorpo, em que esses domí-

nios estão presentes em uma única cadeia polipeptídica. Em algumas modalidades, o polipeptídeo Fv compreende adicionalmente um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L que possibilita que o sFv forme a estrutura desejada para ligação ao antígeno. Para uma revisão de scFv, *vide* Plückthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, pp. 269-315 (1994).

[0059] O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois locais de ligação a antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável da cadeia leve (V_L) na mesma cadeia polipeptídica (V_H - V_L). Ao usar um ligante que seja curto demais para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar-se com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação ao antígeno. Diacorpos são descritos mais plenamente em, por exemplo, EP 404.097; WO 93/11161; e Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 90:6444-6448 (1993).

[0060] O termo "anticorpo multiespecífico" é usado no sentido mais amplo e abrange especificamente um anticorpo que tem especificidade poliepitópica. Tais anticorpos multiespecíficos incluem, mas não estão limitados a, um anticorpo que compreende um domínio variável de cadeia pesada (V_H) e um domínio variável de cadeia leve (V_L), onde a unidade V_HV_L tem especificidade poliepitópica, anticorpos que têm dois ou mais V_L e V_H com cada unidade V_HV_L ligando-se a um epítopo diferente, anticorpos que têm dois ou mais domínios variáveis únicos, em que cada domínio variável único se liga a um epítopo diferente, anticorpos de comprimento completo, fragmentos de anticorpo, tais como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacorpos, diacorpos biespecíficos e triacorpos ("triabodies"), fragmentos de anticorpo que foram ligados de forma co-

valente ou não covalente. "Especificidade poliepitópica" refere-se à capacidade de se ligar especificamente a dois ou mais epítopos diferentes nos mesmos alvos ou em alvos diferentes. "Monoespecífico" refere-se à capacidade para se ligar apenas um epítopo. De acordo com uma modalidade, o anticorpo multiespecífico é um anticorpo IgG que se liga a cada epítopo com uma afinidade de 5 μM a 0,001 pM, 3 μM a 0,001 pM, 1 μM a 0,001 pM, 0,5 μM a 0,001 pM, ou 0,1 μM a 0,001 pM.

[0061] A expressão "anticorpos de domínio único" (sdAbs) ou "anticorpos de domínio variável único (SVD)" refere-se geralmente a anticorpos nos quais um único domínio variável (VH ou VL) pode conferir ligação ao antígeno. Em outras palavras, o domínio variável único não precisa interagir com outro domínio variável para reconhecer o antígeno alvo. Exemplos de anticorpos de domínio único incluem os derivados de camelídeos (lhamas e camelos) e peixes cartilaginosos (*por exemplo*, tubarão lixa) e os derivados de métodos recombinantes de humanos e anticorpos de camundongo (*Nature* (1989) 341: 544-546; *Dev Comp Immunol* (2006) 30: 43-56, *Trend Biochem Sei* (2001) 26: 230-235, *Trends Biotechnol* (2003): 21: 484-490, WO 2005/035572, WO 03/035694, *Febs Lett* (1994) 339: 285. -290; WO00/29004; WO 02/051870).

[0062] O termo "anticorpo monoclonal", conforme usado neste documento, se refere a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, *isto é*, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos e/ou se ligam ao mesmo epítopo, exceto por possíveis variantes que podem surgir durante a produção do anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estando presentes em quantidades menores. Em contraste com preparações de anticorpo (policlonal), as quais tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinan-

te no antígeno. Além de sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos pelo fato de que eles podem ser não contaminados por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos e não deve ser interpretado como exigindo a produção do anticorpo por qualquer método em particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com os métodos fornecidos neste documento podem ser produzidos pelo método do hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler *et al., Nature* 256: 495 (1975), ou podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante (*vide*, *por exemplo*, Patente U.S. N. 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados das bibliotecas de anticorpos de fagos utilizando as técnicas descritas em Clackson *et al., Nature* 352:624-628 (1991) and Marks *et al., J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), por exemplo.

[0063] Os anticorpos monoclonais neste documento incluem anticorpos especificamente "quiméricos" (imunoglobinas), em que uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica às ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma determinada espécie ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpo específica, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é (são) idêntica(s) às ou homóloga(s) às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma outra espécie ou pertencentes de outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (Patente U.S. N° 4.816.567; Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 81: 6851-6855 (1984)). Anticorpos quiméricos de interesse neste documento incluem anticorpos "primatizados" compreendendo sequências de ligação ao antígeno de domínio variável derivadas de um primata não humano *(por exemplo* Macaco Velho Mundo, tal como macaco babuíno, rhesus

ou cynomolgus) e sequências de regiões constantes humanas (Pat n. 5,693,780).

[0064] As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos *(por exemplo,* murinos) são anticorpos quiméricos que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. No geral, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humanas (anticorpo doador), tais como camundongo, rato, coelho ou primata não humano, tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos da região de framework (FR) da imunoglobulina humana são substituídos pelos correspondentes resíduos não humanos. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para adicionalmente refinar o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todos, ou substancialmente todos, as alças hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas, ou substancialmente todas, as FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana, exceto para a(s) substituições FR como referido acima. O anticorpo humanizado opcionalmente compreenderá também pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina, normalmente o de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, *vide* Jones *et al*., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

[0065] Para os propósitos neste documento, um "anticorpo intacto" é um que compreende domínios variáveis pesados e leves, bem como uma região Fc. Os domínios constantes podem ser domínios constan-

tes de sequência nativa (*por exemplo*, humano de sequência nativa domínios constantes) ou aminoácidos variante de sequência dos mesmos. Preferencialmente, o anticorpo intacto tem uma ou mais funções efetoras.

[0066] "Anticorpos nativos" são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, compostas por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, enquanto o número de ligações dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve tem também pontes de dissulfeto intracadeia espaçadas regularmente. Cada cadeia pesada tem, em uma extremidade, um domínio variável (V_H) seguido por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que os resíduos de aminoácidos específicos formem uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada.

[0067] Um "anticorpo nu" é um anticorpo (conforme definido neste documento) que não é conjugado com uma molécula heteróloga, tal como uma porção citotóxica ou radioativa.

[0068] Em algumas modalidades,"funções efetoras" do anticorpo referem-se às atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc de sequência de aminoácidos variante) de um anticorpo e variam com o isotipo de anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpo incluem: ligação C1q e complemento dependente de citotoxicidade; ligação ao receptor de Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose;

regulação negativa de receptores da superfície celular.

[0069] "Citotoxicidade dependente de anticorpo mediada por células" e "ADCC" referem-se a uma reação mediada por células na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores de Fc (FcR) *(por exemplo* células exterminadoras naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado a uma célula alvo e subsequentemente causam a lise da célula alvo. As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam FcγRIII apenas, enquanto que monócitos expressem FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, pode ser realizado um ensaio ADCC *in vitro*, tal como o descrito na Patente US n. 5,500,362 ou 5,821,337. As células efetoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células exterminadoras naturais (NK). Alternativa, ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, *por exemplo*, em um modelo animal, tal como aquele divulgado em Clynes *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA)* 95:652-656 (1998).

[0070] "Células efetoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcR e desempenham funções efetoras. Em algumas modalidades, as células expressam pelo menos FcγRIII e executam a função efetora ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que medeiam ADCC incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células assassinas naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com PBMC e as células NK sendo preferenciais.

[0071] "Citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" refere-se à capacidade de lise de uma molécula em um alvo na presença de complemento. A via de ativação do complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema do complemento (C1q) a

uma molécula (*por exemplo,* polipeptídeo (*por exemplo*, um anticorpo)) complexado com um antígeno cognato. Para avaliar a ativação do complemento, um ensaio de CDC, *por exemplo,* conforme descrito em Gazzano-Santoro *et al*., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996), pode ser realizado.

[0072] Os termos "receptor Fc" ou "FcR" são utilizados para descrever um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. Em algumas modalidades, o FcR é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferencial é aquele que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores de FcγRI, FcγRII, e FcγRIII, incluindo subclasses variantes alélicas e formas de splicing alternativas destes receptores. Os receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), que possuem sequências de aminoácidos similares que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. Receptor de ativação de FcγRIIA contém um motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição de FcγRIIB contém um motivo de inibição de imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático, (*vide* Daëron*, Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Os FcRs são analisados em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al., Immunomethods* 4:25-34 (1994); e de Haas *et al., J. Lab. Clin. Med*. 126:330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo "FcR" no presente documento. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgG maternas para o feto (Guyer *et al., J. Immunol*. 117:587 (1976) e Kim *et al., J. Immunol*. 24:249 (1994)).

[0073] "Impurezas" se referem a materiais que são diferentes das do produto polipeptídico desejado. Em algumas modalidades da invenção, as impurezas incluem variantes de carga do polipeptídeo. Em

algumas modalidades da invenção, as impurezas incluem variantes de carga de um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em outras modalidades da invenção, a impureza inclui, sem limitação: materiais da célula hospedeira, tais como CHOP; Proteína A lixiviada; ácido nucleico; uma variante, fragmento, agregado ou derivado do polipeptídeo desejado; outro polipeptídeo; endotoxina; contaminante viral; componente de mídia de cultura celular, *etc.*

[0074] Conforme usado neste documento, o termo "imunoadesina" designa moléculas do tipo anticorpo que combinam a especificidade de ligação de um peptídeo heterólogo com as funções efetoras dos domínios constantes de imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas compreendem uma fusão de uma sequência de aminoácidos com a especificidade de ligação desejada que é outra senão o reconhecimento do antígeno e do local de ligação a um anticorpo (*isto* é, "heteróloga") e uma sequência de domínio constante de imunoglobulina. A parte de adesina de uma molécula de imunoadesina é tipicamente uma sequência de aminoácidos contígua compreendendo pelo menos o local de ligação de um receptor ou um ligante. A sequência de domínio constante de imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida de qualquer imunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, ou IgG-4, IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM.

[0075] Conforme usado neste documento, "tensoativo" refere-se a um agente tensoativo, preferencialmente um agente tensoativo não iônico. Os exemplos de agentes tensoativos na presente invenção incluem polissorbato (*por exemplo*, polissorbato 20 e polissorbato 80); poloxâmero (por exemplo, poloxâmero 188); Triton; dodecilsulfato de sódio (SDS); laurilsulfato de sódio; octil glicosídeo de sódio; lauril-, miristil-, linoleil- ou estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- ou estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- ou cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- ou isos-

tearamidopropil-betaína (*por exemplo*, lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil- ou isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-taurato de sódio ou metil oleil-taurato dissódico; e a série Monaquat™ (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey); polietilglicol, polipropilglicol, e copolímeros de etileno e propilenoglicol (*por exemplo,* Pluronics, PF68, etc); etc. Em outra modalidade, o tensoativo em questão é o polissorbato 20. Em outra modalidade, ainda, o tensoativo em questão é o poloxâmero 188.

[0076] O termo "sequencial", conforme usado neste documento em relação à cromatografia, refere-se a ter uma primeira cromatografia seguida por uma segunda cromatografia. As etapas adicionais podem ser incluídas entre a primeira cromatografia e a segunda cromatografia.

[0077] O termo "contínuo", conforme usado neste documento em relação à cromatografia, refere-se a ter um primeiro material de cromatografia e um segundo material de cromatografia quer diretamente ligado ou algum outro mecanismo que permita o fluxo contínuo entre os dois materiais de cromatografia.

[0078] "Densidade de carga" refere-se à quantidade, *por exemplo*, gramas, da composição colocada em contato com um volume de material de cromatografia, *por exemplo*, litros. Em alguns exemplos, a densidade de carregamento é expressa em g/l.

[0079] O termo "interferência", conforme usado neste documento com respeito à quantificação de uma espécie (*por exemplo*, tensoativo não iônico), refere-se à contribuição de algum componente diferente da espécie (*por exemplo,* polipeptídeo) para a quantificação. Por exemplo, um sinal de ELSD para uma fração cromatográfica contendo polissorbato 20 e polipeptídeo terá contribuições tanto do polissorbato 20 quanto do polipeptídeo, e a quantificação do polissorbato 20 na fração terá interferência do polipeptídeo.

[0080] Conforme usado neste documento, "essencialmente o mesmo" indica que um valor ou parâmetro não foi alterado por um efeito significativo. Por exemplo, uma força iônica de uma fase móvel de cromatografia na saída da coluna é essencialmente a mesma que a força iônica inicial da fase móvel, se a força iônica não tiver mudado significativamente. Por exemplo, uma força iônica na saída da coluna que está dentro de 10%, 5% ou 1% da força iônica inicial é essencialmente a mesma que a força iônica inicial.

[0081] Referência a "cerca de" um valor ou parâmetro neste documento inclui (e descreve) variações que são dirigidas a esse valor ou parâmetro per se. Por exemplo, a descrição, que se refere a "cerca de X" inclui a descrição de "X".

[0082] Conforme usado neste documento e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "ou" e "o/a" incluem referentes plurais a menos que o contexto dite claramente o contrário. Entende-se que os aspectos e variações da invenção aqui descrita incluem aspectos e variações de "que consiste em" e/ou "que consiste essencialmente em".

II. Métodos de Cromatografia

[0083] Em alguns aspectos, a invenção fornece métodos de análise de composições compreendendo um polipeptídeo e um tensoativo não iônico (*por exemplo*, polissorbato 20 ou PS20), compreendendo a ligação do polipeptídeo e do tensoativo não iônico a um material de cromatografia por troca iônica de modo misto usando um tampão de carga, e eluindo o polipeptídeo e tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia usando tampões de modo que o polipeptídeo e o tensoativo não iônico eluam a partir do material de cromatografia em frações distintas. Em algumas modalidades, os métodos de cromatografia são adequados para composições compreendendo múltiplos polipeptídeos (*por exemplo*, produtos polipeptídicos), incluindo polipeptí-

deos com pIs variável. Por exemplo, os métodos podem ser usados para analisar composições compreendendo um tensoativo não iônico e vários produtos de anticorpos diferentes, tais como produtos de anticorpos com pIs entre 6,0 e 9,5. Em outras modalidades, os métodos de cromatografia incluem o uso de condições ideais (*por exemplo*, material de cromatografia, tampões, gradientes, duração da etapa, vazão, carregamento da amostra) identificadas pelos métodos descritos neste documento.

[0084] Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos neste documento, o material de cromatografia é um material de modo misto compreendendo grupos funcionais capazes de uma ou mais das seguintes funcionalidades: troca aniônica, troca catiônica, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Em algumas modalidades, o material de modo misto é um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o material de modo misto é um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o material de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o ma-

terial de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas das modalidades acima, o material de modo misto é uma coluna ou um cartucho de cromatografia de modo misto, tal como uma coluna ou um cartucho de cromatografia por troca aniônica de modo misto, ou uma coluna ou um cartucho de cromatografia por troca catiônica de modo misto. Em algumas modalidades, o material de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

[0085] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos neste documento, o material de troca iônica pode utilizar um material de cromatografia convencional ou um material de cromatografia convectivo. Os materiais de cromatografia convencionais incluem, por exemplo, materiais perfusivos (*por exemplo*, resina de poli(estireno-divinilbenzeno)) e materiais difusivos (*por exemplo*, resina de agarose reticulada). Em algumas modalidades, a resina de poli(estireno-divinilbenzeno) pode ser resina Poros®. Em algumas modalidades, a resina de agarose reticulada pode ser resina de Fluxo Rápido de Sulfopropil-Sepharose® ("SPSFF"). O material de cromatografia convectivo pode ser uma membrana (*por exemplo*, polietersulfona) ou material monolítico (*por exemplo*, polímero reticulado). A membrana de polietersulfona pode ser Mustang. O material de monólito polimérico reticulado pode ser poli(dimetacrilato de glicidil metacrilato-co-etileno) reticulado.

[0086] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos da invenção, o material de cromatografia está em uma coluna ou um cartucho de cromatografia; por exemplo, uma coluna ou um cartucho de cromatografia por troca catiônica de modo misto ou uma coluna ou um cartucho de cromatografia por troca aniônica de modo misto. Em algumas modalidades, a coluna ou o cartucho de cromatografia é usada(o) para cromatografia líquida. Em algumas modalidades, a coluna ou o cartucho de cromatografia é usada(o) para cromatografia lí-

quida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, a coluna ou o cartucho de cromatografia é uma coluna ou um cartucho de cromatografia HPLC; por exemplo, uma coluna ou um cartucho de HPLC por troca catiônica de modo misto ou uma coluna ou um cartucho de HPLC por troca aniônica de modo misto.

[0087] Por exemplo, em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas

modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 30:70 e cerca de 50:50 (tal como qualquer uma das 32:68, 34:66, 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44: 56, 46:54 e 48:52, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido em metanol. Em algumas modalidades, o ácido é ácido fórmico. Em algumas modalidades, o ácido é ácido acético. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4

ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é poloxâmero (P188) ou um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de tensoativo não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algu-

mas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[0088] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fa-

se móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c), em que a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 30:70 e cerca de 50:50 (tal como qualquer uma das 32:68, 34:66, 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44: 56, 46:54 e 48:52, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100:0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92:8, 94:6, 96:4 e 98:2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, in-

cluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido em metanol. Em algumas modalidades, o ácido é ácido fórmico. Em algumas modalidades, o ácido é ácido acético. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é poloxâmero (P188) ou um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de tensoativo não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL

(tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantifica-

do por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[0089] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c), em que o eluato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 30:70 e cerca de 50:50 (tal como qualquer uma das 32:68, 34:66, 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44: 56, 46:54 e 48:52, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18,

84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido em metanol. Em algumas modalidades, o ácido é ácido fórmico. Em algumas modalidades, o ácido é ácido acético. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é poloxâmero (P188) ou um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de tensoativo não iônico na composição está na faixa de

cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo

misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[0090] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalida-

des, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 30:70 e cerca de 50:50 (tal como qualquer uma das 32:68, 34:66, 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44: 56, 46:54 e 48:52, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido acético em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido acético em metanol. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo

menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é poloxâmero (P188) ou um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de tensoativo não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano,

um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[0091] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A com-

preende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 35:65 e cerca de 45:55; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0 e d) quantificar o tensoativo no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a segunda razão é de cerca de 40:60. Em algumas modalidades, a terceira razão é de cerca de 100:0. Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido em metanol. Em algumas modalidades, o ácido é ácido fórmico. Em algumas modalidades, o ácido é ácido acético. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7,

1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é poloxâmero (P188) ou um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de tensoativo não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tam-

pão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[0092] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o po-

lissorbato e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 30:70 e cerca de 50:50 (tal como qualquer uma das 32:68, 34:66, 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44: 56, 46:54 e 48:52, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão

está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido em metanol. Em algumas modalidades, o ácido é ácido fórmico. Em algumas modalidades, o ácido é ácido acético. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a

1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de croma-

tografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[0093] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar polissorbato no eluato da etapa c), em que a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de

90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 30:70 e cerca de 50:50 (tal como qualquer uma das 32:68, 34:66, 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44: 56, 46:54 e 48:52, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido em metanol. Em algumas modalidades, o ácido é ácido fórmico. Em algumas modalidades, o ácido é ácido acético. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1

e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo tera-

pêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glicomanipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[0094] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreenden-

do uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar polissorbato no eluato da etapa c), em que o eluato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 30:70 e cerca de 50:50 (tal como qualquer uma das 32:68, 34:66, 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44: 56, 46:54 e 48:52, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido em metanol. Em algumas modalidades, o ácido é ácido fórmico. Em algumas modalidades, o ácido é ácido acético. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto.

Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em al-

gumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[0095] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca

aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende ácido acético em água e a fase móvel B compreende ácido acético em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 30:70 e cerca de 50:50 (tal como qualquer uma das 32:68, 34:66, 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44: 56, 46:54 e 48:52, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, inclu-

indo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido acético em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido acético em metanol. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1

mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente

não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[0096] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 35:65 e cerca de 45:55; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0 e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a segunda razão é de cerca de 40:60. Em algumas modalidades, a terceira razão é de cerca de 100:0. Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especifica-

mente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido em metanol. Em algumas modalidades, o ácido é ácido fórmico. Em algumas modalidades, o ácido é ácido acético. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato

não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cro-

matografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[0097] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A compreende ácido acético em água e a fase móvel B compreende ácido acético em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 35:65 e cerca de 45:55; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0; e d) quantificar o polissorbato na avaliação da etapa c), em que a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B

para a fase móvel A é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a segunda razão é de cerca de 40:60. Em algumas modalidades, a terceira razão é de cerca de 100:0. Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido acético em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido acético em metanol. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas mo-

dalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase

reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[0098] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A compreende ácido acético em água e a fase móvel B compreende ácido acético em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 35:65 e cerca de 45:55; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c), em que o eluato da etapa c) compreendendo menos do que 10% (tal como menos do cerca de 9%, 8%, 7%, 6%,

5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a segunda razão é de cerca de 40:60. Em algumas modalidades, a terceira razão é de cerca de 100:0. Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de ácido acético em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de ácido acético em metanol. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração de polis-

sorbato não iônico na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cro-

matografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[0099] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato 20 em uma composição compreendendo o polissorbato 20 e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma razão de cerca de 10:90 de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende 2% de ácido acético em água e a fase móvel B compreende 2% de ácido acético em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo uma razão de cerca de 40:60 da fase móvel B para a fase móvel A; c) eluir o polissorbato 20 a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma razão de cerca de 100:0 da fase móvel B para a fase móvel A; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3,

1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia é de cerca de 1,25 mL/min. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicado ao material de cromatografia é de cerca de 20 µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 1 (tal como pelo menos cerca de 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3 ou mais) min. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato 20 na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um es-

tabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00100] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreen-

dendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em um solvente orgânico; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a

segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio no solvente orgânico (*por exemplo*, metanol ou acetonitrila). Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algu-

mas modalidades, o tensoativo não iônico é um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um poloxâmero. Em algumas modalidades, o poloxâmero é um poloxâmero P188. Em algumas modalidades, a concentração do tensoativo não iônico (*por exemplo*, polissorbato ou poloxâmero) na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente N-acetil triptofano (também referido como N-acetil-DL-triptofano) e/ou metionina. Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um po-

lipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00101] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução com-

preendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c), em que a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca

de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio no solvente orgânico (*por exemplo*, metanol ou acetonitrila). Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é

um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um poloxâmero. Em algumas modalidades, o poloxâmero é um poloxâmero P188. Em algumas modalidades, a concentração do tensoativo não iônico (*por exemplo*, polissorbato ou poloxâmero) na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente N-acetil triptofano e/ou metionina. Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anti-

corpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[00102] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma se-

gunda razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c), em que o eluato da etapa c) compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio no solvente orgânico (*por exemplo*, metanol ou acetonitrila). Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está en-

tre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um poloxâmero. Em algumas modalidades, o poloxâmero é um poloxâmero P188. Em algumas modalidades, a concentração do tensoativo não iônico (*por exemplo*, polissorbato ou poloxâmero) na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente N-acetil triptofano e/ou metionina. Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100

mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glicomanipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempe-

nho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00103] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c)

compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio em metanol. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1,

1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um poloxâmero. Em algumas modalidades, o poloxâmero é um poloxâmero P188. Em algumas modalidades, a concentração do tensoativo não iônico (*por exemplo*, polissorbato ou poloxâmero) na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente N-acetil triptofano e/ou metionina. Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8,

5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%

ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00104] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em acetonitrila; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas ra-

zões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio em acetonitrila. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algu-

mas modalidades, o tensoativo não iônico é um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um poloxâmero. Em algumas modalidades, o poloxâmero é um poloxâmero P188. Em algumas modalidades, a concentração do tensoativo não iônico (*por exemplo*, polissorbato ou poloxâmero) na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente N-acetil triptofano e/ou metionina. Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína te-

rapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00105] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase

móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em um solvente orgânico; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 40:60 e cerca de 50:50; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0 e d) quantificar o tensoativo no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e

98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio no solvente orgânico (*por exemplo*, metanol ou acetonitrila). Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um poloxâmero. Em algumas modalidades, o poloxâmero é um poloxâmero P188. Em algumas modalidades, a concentração do tensoativo não iônico (*por exemplo*, po-

lissorbato ou poloxâmero) na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente N-acetil triptofano e/ou metionina. Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas

modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do tensoativo não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00106] Quando um produto contendo N-acetil triptofano (NAT) na formulação é testado usando condições de HPLC-ELSD, há uma interferência significativa observada na região PS20. Portanto, em algumas circunstâncias, condições alternativas são necessárias para eliminar tanto NAT quanto a proteína relacionada à interferência.

[00107] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico, um polipeptídeo e N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B pa-

ra uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em um solvente orgânico; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o tensoativo não iônico no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 5% (tal como menor que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48:

52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio no solvente orgânico (*por exemplo*, metanol ou acetonitrila). Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um polissorbato. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato

80. Em algumas modalidades, o tensoativo não iônico é um poloxâmero. Em algumas modalidades, o poloxâmero é um poloxâmero P188. Em algumas modalidades, a concentração do tensoativo não iônico (*por exemplo*, polissorbato ou poloxâmero) na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multies-

pecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do detergente não iônico compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00108] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em um solvente orgânico; b) eluir o

polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de

0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio no solvente orgânico (*por exemplo*, metanol ou acetonitrila). Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente N-acetil triptofano e/ou metionina. Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM

a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades,

o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00109] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato, um polipeptídeo e N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c), em que a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de

9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo e do NAT. Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 5% (tal como menor que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B

compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio no solvente orgânico (*por exemplo*, metanol ou acetonitrila). Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição va-

ria de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material

de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[00110] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato, um polipeptídeo e N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c), em que o eluato a partir da etapa c) compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do polipeptídeo total na composição e menos do que cerca de 5% (tal como menos do que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a

fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio no solvente orgânico (*por exemplo*, metanol ou acetonitrila). Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de

0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anti-

corpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo e do NAT.

[00111] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato, um polipeptídeo e N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase

móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 5% (tal como menor que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14,

88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio em metanol. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano

na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades,

o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo e do NAT.

[00112] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato, um polipeptídeo e N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em acetonitrila; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda da fase móvel B para a fase móvel A, em que a segunda razão é maior do que a primeira razão; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A, em que a terceira razão é maior do que a segunda razão; e d) quantificar o polissorbato no elua-

to da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 5% (tal como menor que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A está entre cerca de 0:100 e cerca de 20:80 (tal como cerca de qualquer uma das 2:98, 4:96, 6:94, 8:92, 10: 90, 12:88, 14:86, 16:84 e 18:82, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a segunda razão está entre cerca de 35:65 e cerca de 55:45 (tal como cerca de 36:64, 38:62, 40:60, 42:58, 44:56, 46:54, 48: 52, 50:50, 52:48 e 54:46, incluindo qualquer faixa entre essas razões). Em algumas modalidades, a terceira razão está entre cerca de 80:20 e cerca de 100: 0 (tal como qualquer uma das 82:18, 84:16, 86:14, 88:12, 90:10, 92: 8, 94: 6, 96: 4 e 98: 2, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio em acetonitrila. Em algumas modalidades, a vazão da cro-

matografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal

como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um De-

tector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo e do NAT.

[00113] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato, um polipeptídeo e um N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em um solvente orgânico; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 40:60 e cerca de 50:50; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0 e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na

composição. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 5% (tal como menor que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol. Em algumas modalidades, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a segunda razão é de cerca de 45:55. Em algumas modalidades, a terceira razão é de cerca de 100:0. Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio no solvente orgânico (*por exemplo*, metanol ou acetonitrila). Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4,

0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado,

um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo e do NAT.

[00114] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato, um polipeptídeo e um N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A

compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 40:60 e cerca de 50:50; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c), em que a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo e do NAT. Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 5% (tal como menor que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a segunda razão é de cerca de 45:55. Em algumas modalidades, a terceira razão é de cerca de 100:0. Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de

amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio em metanol. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composi-

ção varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material

de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[00115] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato, um polipeptídeo e um N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 40:60 e cerca de 50:50; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c), em que o eluato da etapa c) compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do polipeptídeo total na composição e menos do que cerca de 5% (tal como menos do que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a segunda razão é de cerca de 45:55. Em algumas modalidades, a terceira razão é de cerca de

100:0. Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio em metanol. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como

cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compre-

ende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00116] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato, um polipeptídeo e um N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em acetonitrila; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 40:60 e cerca de 50:50; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c), em que a quantificação do polissorbato compre-

ende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo e do NAT. Em algumas modalidades, o polipeptídeo se liga especificamente e não especificamente ao material de cromatografia, e pelo menos cerca de 90% (tal como pelo menos cerca de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) dos eluatos de polipeptídeo na etapa b). Em algumas modalidades, o eluato a partir da etapa c) compreende o polipeptídeo ligado não especificamente. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 5% (tal como menor que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a segunda razão é de cerca de 45:55. Em algumas modalidades, a terceira razão é de cerca de 100:0. Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio em acetonitrila. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2,

7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[00117] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar um polissorbato em uma composição compreendendo o polissorbato, um polipeptídeo e um N-acetil triptofano, em que o método

compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma primeira razão de uma fase móvel B para uma fase móvel A entre cerca de 5:95 e cerca de 15:85, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em acetonitrila; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma segunda razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 40:60 e cerca de 50:50; c) eluir o polissorbato a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma terceira razão da fase móvel B para a fase móvel A entre cerca de 90:10 e cerca de 100:0; e d) quantificar o polissorbato no eluato da etapa c), em que o eluato da etapa c) compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do polipeptídeo total na composição e menos do que cerca de 5% (tal como menos do que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, a primeira razão da fase móvel B para a fase móvel A é de cerca de 10:90. Em algumas modalidades, a segunda razão é de cerca de 45:55. Em algumas modalidades, a terceira razão é de cerca de 100:0. Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre estes valores) de hidróxido de amônio em água. Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 5% (v/v) (tal como cerca de 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% e 4,5%, incluindo qualquer faixa entre esses valores) de hidróxido de amônio em acetonitrila. Em algumas modalidades, a vazão da croma-

tografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em certas modalidades, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80. Em algumas modalidades, a concentração do polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal

como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um De-

tector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo.

[00118] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar o polissorbato 20 em uma composição compreendendo um polissorbato 20, um polipeptídeo e um N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma razão de cerca de 10:90 de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende cerca de 1,5% de hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende cerca de 1,5% de hidróxido de amônio em metanol; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma razão de cerca de 45:55 da fase móvel B para a fase móvel A; c) eluir o polissorbato 20 a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma razão de cerca de 100:0 da fase móvel B para a fase móvel A; e d) quantificar o polissorbato 20 no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 5% (tal como menor que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto.

Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia é de cerca de 1,40 mL/min. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicado ao material de cromatografia é de cerca de 25 µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato 20 na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60,

80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em

algumas modalidades, a quantificação do polissorbato compreende menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo e do NAT.

[00119] Em algumas modalidades, há fornecido um método para quantificar o polissorbato 20 em uma composição compreendendo um polissorbato 20, um polipeptídeo e um N-acetil triptofano, em que o método compreende as etapas de a) aplicar a composição a um material de cromatografia por troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma razão de cerca de 10:90 de uma fase móvel B para uma fase móvel A, em que a fase móvel A compreende cerca de 1,5% de hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende cerca de 1,5% de hidróxido de amônio em acetonitrila; b) eluir o polipeptídeo a partir do material de cromatografia por troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo uma razão de cerca de 45:55 da fase móvel B para a fase móvel A; c) eluir o polissorbato 20 a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo uma razão de cerca de 100:0 da fase móvel B para a fase móvel A; e d) quantificar o polissorbato 20 no eluato da etapa c). Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 10% (tal como menor que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do polipeptídeo total na composição. Em algumas modalidades, o eluato da etapa c) compreende menos de cerca de 5% (tal como menor que cerca de 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, ou menos) do NAT total na composição. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia está entre cerca de 0,5 e 2,5 (tal como cerca de 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,3, incluindo qualquer faixa entre esses valores) mL/minuto. Em algumas modalidades, a vazão da cromatografia é de cerca de

1,40 mL/min. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicada ao material de cromatografia é dentre cerca de 1 e cerca de 50 (tal como cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45, incluindo qualquer faixa entre esses valores) µL. Em algumas modalidades, o volume da composição aplicado ao material de cromatografia é de cerca de 25 µL. Em algumas modalidades, a etapa b) começa pelo menos cerca de 0,5 (tal como pelo menos cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, ou mais) min após a etapa a) ser iniciada e continua por pelo menos cerca de 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a etapa c) começa pelo menos cerca de 0,05 (tal como pelo menos cerca de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2 ou mais) min após a etapa b) ser terminada e continua por pelo menos 2 (tal como pelo menos cerca de 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,1, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,5, 5 ou mais) min. Em algumas modalidades, a concentração de polissorbato 20 na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v) (tal como cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9%, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de N-acetil triptofano na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente metionina. Em algumas modalidades, a concentração de metionina na composição varia de cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM (tal como cerca de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL (tal como cerca de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/mL, incluindo qualquer

faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5 (tal como qualquer um dos 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, incluindo qualquer faixa entre esses valores). Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade. Em algumas modalidades, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™, um conjugado de THIOMAB™-fármaco. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna. Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, o material de cromatografia por troca catiônica é um material de cromatografia Oasis® MCX. Em algumas modalidades, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD). Em algumas modalidades, a quantificação do polissorbato compreende

menos do que cerca de 10% (tal como menos do que cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% ou menos) de interferência a partir do polipeptídeo e do NAT.

[00120] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o tensoativo não iônico é quantificado na composição compreendendo o tensoativo não iônico antes da adição do polipeptídeo à composição. Em algumas modalidades, a concentração de tensoativo não iônico na composição será maior antes da adição do polipeptídeo (*por exemplo*, o tensoativo não iônico na composição é diluído mediante adição do polipeptídeo). Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o tensoativo não iônico é quantificado na composição compreendendo o tensoativo não iônico antes, porém sem a adição do polipeptídeo à composição. Tais quantificações podem ser usadas como controles ou comparadores para as composições compreendendo o tensoativo não iônico e o polipeptídeo.

[00121] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, as amostras das composições a serem analisadas são adicionadas a um amostrado automático de um instrumento de cromatografia (*por exemplo*, um instrumento de HPLC). Em algumas modalidades, as amostras no amostrador automático são refrigeradas (*por exemplo*, 5 ± 3°C). Em algumas modalidades, uma ou mais colunas compreendendo o material de cromatografia são colocadas em um compartimento de coluna do instrumento de cromatografia. Em algumas modalidades, um recurso de controle de temperatura pode ser empregado para manter a temperatura do compartimento de coluna dentro de uma faixa estreita (*por exemplo*, ±1°C) a partir do ponto de ajuste durante a análise. Em algumas modalidades, o efluente da coluna é monitorado a 280 nm.

[00122] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos

métodos descritos acima, as amostras das composições a serem analisadas são diluídas com um tampão de carregamento para uma concentração de polipeptídeo alvo entre cerca de 0,1 mg/mL e cerca de 75 mg/mL (tal como cerca de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou 70 mg/mL, incluindo qualquer faixa entre esses valores).

[00123] Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos acima, o instrumento de cromatografia inclui uma bomba de gradiente (por exemplo, uma bomba de gradiente quaternária de baixa pressão), um amostrador automático (por exemplo, um amostrador automático com capacidade de controle de temperatura), um compartimento de coluna (por exemplo, um compartimento de coluna com controle térmico), um detector de UV (por exemplo, um detector de UV de arranjo de diodos) e um detector de espalhamento de luz por evaporação (ELSD). Em algumas modalidades, o instrumento de cromatografia compreende ainda um monitor de pH e condutividade (por exemplo, PCM-3000) para coletar dados de pH e condutividade em tempo real. O controle do instrumento, a aquisição de dados e a análise de dados são realizados usando software apropriado (por exemplo, JMP10).

[00124] Em algumas modalidades da invenção, a força iônica da fase móvel, *por exemplo*, o tampão de eluição, é medida pela condutividade da fase móvel. Condutividade refere-se à capacidade de uma solução aquosa para conduzir uma corrente elétrica entre dois eletrodos. Em solução, a corrente flui pelo transporte iônico. Portanto, com uma quantidade crescente de íons presentes na solução aquosa, a solução terá uma maior condutividade. A unidade básica de medida para a condutividade é o Siemen (mS/cm) ou ohms (mho) e pode ser medida usando um medidor de condutividade, como vários modelos de medidores de condutividade Orion. Como a condutividade eletrolítica é a capacidade dos íons em uma solução para transportar corrente elétri-

ca, a condutividade de uma solução pode ser alterada pela alteração da concentração de íons. Por exemplo, a concentração de um agente tamponante e/ou a concentração de um sal (*por exemplo*, cloreto de sódio, acetato de sódio ou cloreto de potássio) na solução pode ser alterada de modo a atingir a condutividade desejada. Preferencialmente, a concentração de sal dos vários tampões é modificada para alcançar a condutividade desejada.

[00125] Em algumas modalidades, a fase móvel da cromatografia tem uma condutividade inicial superior a cerca de 0,0 mS/cm, 0,5 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17,0 mS/cm, 18,0 mS/cm, 19,0 mS/cm ou 20,0 mS/cm. Em algumas modalidades, a condutividade da fase móvel é aumentada ao longo da cromatografia, *por exemplo*, por um gradiente de força iônica. Em algumas modalidades, a condutividade da fase móvel na conclusão da eluição é superior a qualquer um de cerca de 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17,0 mS/cm 18,0 mS/cm, 19,0 mS/cm ou 20,0 mS/cm. Em algumas modalidades, a condutividade da fase móvel é aumentada por um gradiente linear. Em algumas modalidades, a condutividade da fase móvel é aumentada por um gradiente degrau compreendendo uma ou mais etapas.

[00126] Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos neste documento, a composição compreendendo um polipeptídeo e um agente tensoativo não iônico é carregada no material

de cromatografia em uma quantidade do polipeptídeo superior a qualquer um de cerca de 1, 2, 3, 4, 5 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 ou 10000 µg. Em algumas modalidades, a composição é carregada no material de cromatografia em uma concentração superior a qualquer um de cerca de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ou 150 mg/mL. Em algumas modalidades, a composição é diluída antes de ser carregada no material de cromatografia; por exemplo, diluída a 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ou mais de 1:10. Em algumas modalidades, a composição é diluída na fase móvel da cromatografia. Em algumas modalidades, a composição é diluída em um tampão de carga.

[00127] Em algumas modalidades dos métodos descritos neste documento, o material de cromatografia está em uma coluna ou cartucho. Em algumas modalidades, a coluna é uma coluna ou cartucho de HPLC. A coluna ou cartucho pode ter qualquer dimensão compatível com o instrumento de cromatografia. Por exemplo, em algumas modalidades, a coluna ou cartucho tem qualquer uma das seguintes dimensões: 2,1 x 20 mm, 4 x 50 mm, 4 x 100 mm, 4 x 150 mm, 4 x 200 mm, 4 x 250 mm ou 2 × 250 mm.

III. Polipeptídeos

[00128] Os polipeptídeos são fornecidos para utilização em qualquer um dos métodos de cromatografia de troca iônica em que as condições de separação são otimizadas conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades da invenção, as composições de um polipeptídeo são analisadas por cromatografia de troca iônica. Tais métodos são úteis na identificação de variantes de carga do polipeptídeo dentro da composição. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo ou um fragmento do mesmo. Em algumas modalidades, os polipeptídeos têm um pI variando entre cerca de 6,0 e cerca de 9,5.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo com um pI variando entre cerca de 6,0 e cerca de 9,5. Em algumas modalidades, o Ponto de Inflexão (IP) em uma curva de carga versus pH do polipeptídeo é proporcionado pelos métodos da invenção. Em algumas modalidades, a alteração no IP com uma alteração na temperatura (dIP/dT) é proporcionada pelos métodos da invenção.

[00129] Em algumas modalidades, o polipeptídeo é uma proteína terapêutica. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é uma imunoadesina.

[00130] Em algumas modalidades, o polipeptídeo tem um peso molecular superior a cerca de 5.000 Daltons, 10.000 Daltons, 15.000 Daltons, 25.000 Daltons, 50.000 Daltons, 75.000 Daltons, 100.000 Dalton, 125.000 Daltons ou 150.000 Daltons. O polipeptídeo pode ter um peso molecular entre cerca de 50.000 Daltons a 200.000 Daltons ou 100.000 Daltons a 200.000 Daltons. Alternativamente, o polipeptídeo para uso neste documento pode ter um peso molecular de cerca de 120.000 Daltons ou cerca de 25.000 Daltons.

[00131] pI é o ponto isoelétrico e é o pH no qual uma molécula ou superfície particular não possui carga elétrica. Em algumas modalidades, o método da invenção pode ser utilizado para várias composições compreendendo um polipeptídeo em que o pI do polipeptídeo na composição, *por exemplo*, um anticorpo, varia de cerca de 6,0 a cerca de 9,5. Em algumas modalidades, o polipeptídeo tem um pI superior a cerca de 9,5; *por exemplo*, cerca de 9,5 a cerca de 12. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos neste documento, o pI do polipeptídeo, *por exemplo*, um anticorpo, pode ser inferior a cerca de 7; *por exemplo*, cerca de 4 a cerca de 7.

[00132] Em modalidades de qualquer um dos métodos descritos neste documento, o um ou mais contaminantes em uma composição compreendendo um polipeptídeo e um ou mais contaminantes são va-

riantes de carga polipeptídicas. Em algumas modalidades, a variante de carga polipeptídica é um polipeptídeo que foi modificado a partir do seu estado nativo de tal modo que a carga do polipeptídeo seja alterada. Em algumas modalidades, as variantes de carga são mais ácidas do que o polipeptídeo precursor; *ou seja*, têm um pI inferior ao do polipeptídeo precursor. Em outras modalidades, as variantes de carga são mais básicas do que o polipeptídeo precursor; *ou seja*, têm um pI superior ao do polipeptídeo precursor. Em algumas modalidades, as variantes de carga polipeptídica são manipuladas. Em algumas modalidades, a variante de carga polipeptídica é o resultado de processos naturais; por exemplo, oxidação, desamidação, processamento C-terminal de resíduos de lisina, formação de piroglutamato N-terminal e glicação. Em algumas modalidades, a variante de carga polipeptídica é uma glicoproteína em que o glicano ligado à proteína é modificado de tal modo que a carga da glicoproteína é alterada em comparação com a glicoproteína precursora; por exemplo, por adição de ácido siálico ou seus derivados. Em algumas modalidades, a variante de carga polipeptídica é uma variante de carga de anticorpo.

[00133] Os polipeptídeos a serem analisados usando os métodos descritos neste documento são produzidos geralmente usando técnicas recombinantes. Os métodos para produzir proteínas recombinantes são descritos, *por exemplo*, nas Patentes US n. 5,534,615 e 4,816,567, incorporadas a este documento especificamente por referência. Em algumas modalidades, a proteína de interesse é produzida em uma célula CHO (*ver, por exemplo,* WO 94/11026). Em algumas modalidades, o polipeptídeo de interesse é produzido em uma célula de *E. coli*. *Ver, por exemplo*, Pat. US n. 5,648,237; Pat. US n. 5,789,199 e Pat. US n. 5,840,523 (Simmons et al.), que descreve a região de inicialização da tradução (TIR) e sequências de sinal para otimizar a expressão e a secreção. *Ver* também Charlton, Methods in Molecular Biology,

Vol. 248 (B.K.C. Lo, *ed*., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que descreve a expressão de fragmentos de anticorpo em *E. coli*. Ao se usar técnicas recombinantes, os polipeptídeos podem ser produzidos intracelularmente, no espaço periplasmático, ou secretados diretamente no meio.

[00134] Os polipeptídeos podem ser recuperados a partir de meio de cultura ou a partir de lisados de células hospedeiras. As células empregadas na expressão dos polipeptídeos podem ser interrompidas por vários meios físicos ou químicos, tais como ciclos de congelamento-descongelamento, sonicação, ruptura mecânica ou agentes de lise celular. Se o polipeptídeo for produzido intracelularmente, como uma primeira etapa, os detritos particulados, células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Carter *et al*., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) descrevem um procedimento para isolar anticorpos que são secretados para o espaço periplásmico da *E. coli*. Resumidamente, a pasta celular é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA, e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) por cerca de 30 min. Os detritos celulares podem ser removidos por centrifugação. Onde o polipeptídeo é secretado para o meio, os sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente primeiramente concentrados utilizando um filtro de concentração de polipeptídeo comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease, tal como PMSF, pode ser incluído em qualquer uma das etapas anteriores para inibir a proteólise e antibióticos podem ser incluídos para prevenir o crescimento de contaminantes adventícios.

[00135] Em algumas modalidades, o polipeptídeo na composição que compreende o polipeptídeo e um ou mais contaminantes foi purificado ou parcialmente purificado antes da análise por meio dos métodos da invenção. Por exemplo, o polipeptídeo dos métodos está em

um eluente de uma cromatografia de afinidade, uma cromatografia de permuta catiônica, uma cromatografia de permuta aniônica, uma cromatografia de modo misto e uma cromatografia de interação hidrofóbica. Em algumas modalidades, o polipeptídeo está em um eluente a partir de uma cromatografia de Proteína A.

[00136] Exemplos de polipeptídeos que podem ser analisados pelos métodos da invenção incluem, mas não estão limitados a imunoglobulinas, imunoadesinas, anticorpos, enzimas, hormônios, proteínas de fusão, proteínas contendo Fc, imunoconjugados, citocinas e interleucinas.

Anticorpos

[00137] Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos neste documento, o polipeptídeo para uso em qualquer dos métodos de análise de polipeptídeos e formulações compreendendo os polipeptídeos por meio dos métodos descritos neste documento é um anticorpo.

[00138] Alvos moleculares para detecção de anticorpos incluem (i) as proteínas CD e seus ligantes, tais como, mas não limitado a: CD3, CD4, CD8, CD19, CD11a, CD20, CD22, CD27, CD28, CD34, CD40, CD79α (CD79a), CD79β (CD79b), CD122 e CD137; (ii) citocinas tais como, mas não limitado a: IL-13, IL-17, IL-22 e IL-33; (iii) os membros da família de receptores ErbB, tais como o receptor EGF ou o receptor HER2, HER3 ou HER4; (iv) moléculas de adesão celular, tais como LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina αv/β3, incluindo subunidades alfa ou beta das mesmas (*por exemplo*, anticorpos anti-CD11a, anti-CD18 ou anti-CD11b); (v) fatores de crescimento como o VEGF; TGFβ, IgE; antígenos do grupo sanguíneo; receptor flt3/flk2; receptor de obesidade (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C, BR3, c-met, fator tecidual, β7 etc.; (vi) proteínas imunomoduladoras, tais como OX40, GITR, ICOS, PD-1 PD-L1, PD-L2, LAG3, TIM-3 e

VISTA; e (vii) antígenos associados a tumor de transmembrana e superfície celular (TAA), tais como aqueles descritos na Patente US n. 7,521,541, incluindo, sem limitação, NaPi2b.

[00139] Outros anticorpos exemplares incluem aqueles selecionados dentre, e sem limitação, anticorpo anti-receptor de estrogênio, anticorpo anti-receptor de progesterona, anticorpo anti-p53, anticorpo anti-HER-2/neu, anticorpo anti-EGFR, anticorpo anti-TGFβ, anticorpo anti-OX40, anticorpo anti-GITR, anticorpo anti-ICOS, anticorpo anti-CTLA-4, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, anticorpo anti-PD-L2, anticorpo anti-TIM-3, Anticorpo anti-VISTA, anticorpo anti-catepsina D, anticorpo anti-Bcl-2, anticorpo anti-E-caderina, anticorpo anti-CA125, anticorpo anti-CA15-3, anticorpo anti-CA19-9, anticorpo anti-c-erbB-2, anticorpo anti-P-glicoproteína, anticorpo anti-CEA, anticorpo anti-proteína de retinoblastoma, anticorpo anti-oncoproteína ras, anticorpo anti-Lewis X, anticorpo anti-Ki-67, anticorpo anti-PCNA, anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD4, anticorpo anti-CD5, anticorpo anti-CD7, anticorpo anti-CD8, anticorpo anti-CD9/p24, anticorpo anti-CD10, anticorpo anti-CD11a, anticorpo anti-CD11c, anticorpo anti-CD13, anticorpo anti-CD14, anticorpo anti-CD15, anticorpo anti-CD19, anticorpo anti-CD20, anticorpo anti-CD22, anticorpo anti-CD23, anticorpo anti-CD27, anticorpo anti-CD28, anticorpo anti-CD30, anticorpo anti-CD31, anticorpo anti-CD33, anticorpo anti-CD34, anticorpo anti-CD35, anticorpo anti-CD38, anticorpo anti-CD40, anticorpo anti-CD41, anticorpo anti-LCA/CD45, anticorpo anti-CD45RO, anticorpo anti-CD45RA, anticorpo anti-CD39, anticorpo anti-CD100, anticorpo anti-CD95/Fas, anticorpo anti-CD99, anticorpo anti-CD106, anticorpo anti-CD122, anticorpo anti-CD137, anticorpo anti-ubiquitina, anticorpo anti-CD71, anticorpo anti-StaphA, anticorpo anti-FcRH5, anticorpo anti-Ly6E, anticorpo anti-STEAP, anticorpo anti-FluB, anticorpo anti-VEGF, anticorpo anti-Ang2, anticorpo anti-FGFR1, anticorpo anti-KLB, anticorpo anti-c-myc,

anticorpo anti-citoqueratinas, anticorpo anti-vimentina, anticorpo anti-proteínas do HPV, anticorpo anti-cadeias leves kappa, anticorpo anti-cadeias leves lambda, anticorpo anti-melanossoma, anticorpo anti-antígeno específico de próstata, anticorpo anti-S-100, anticorpo anti-antígeno de tau, anticorpo anti-fibrina, anticorpo anti-queratinas, anticorpo anti-antígeno Tn e MetMab.

(i)Anticorpos monoclonais

[00140] Em algumas modalidades, os anticorpos são anticorpos monoclonais. Anticorpos monoclonais são obtidos a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, *isto é*, os anticorpos individuais compreendendo a população que são idênticos e/ou que se ligam ao mesmo epítopo, exceto por possíveis variantes que podem surgir durante a produção do anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estando presentes em quantidades menores. Assim, o modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos discretos e policlonais.

[00141] Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando o método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler *et al., Nature* 256:495 (1975), ou podem ser feitos pelos métodos de DNA recombinante (Patente US n. 4,816,567).

[00142] No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro adequado, tal como um hamster, é imunizado como descrito neste documento, para provocar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente ao polipeptídeo utilizado para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principies and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

[00143] As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e cultivadas em um meio de cultura adequado que preferencialmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma precursoras não possuírem a enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias estas que evitam o crescimento de células deficientes em HGPRT.

[00144] Em algumas modalidades, as células de mieloma são aquelas que se fundem eficientemente, suportam a produção estável de alto nível de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio, tal como o meio HAT. Entre estas, em algumas modalidades, as linhagens celulares de mieloma são linhagens de mieloma murino, tais como as derivadas de tumores de camundongo MOPC-21 e MPC-11 disponíveis pelo Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponível pela American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Linhagens celulares de mieloma humano e de heteromieloma camundongo-humano também foram descritas quanto à produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol*. 133:3001 (1984); Brodeur *et al*., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova York, 1987)).

[00145] O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas passa por ensaios para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Em algumas modalidades, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação in vitro, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA).

[00146] A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada por meio da análise Scatchard de Munson *et al*., *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

[00147] Depois de identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e cultivados por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura adequados para esse fim incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas in vivo como tumores de ascites em um animal.

[00148] Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascites, ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais, tais como, por exemplo, polipeptídeo A-Sepharose®, cromatografia em hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

[00149] O DNA que codifica o anticorpo monoclonal é facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (*por exemplo*, usando sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesadas e leves de anticorpos murinos). Em algumas modalidades, as células de hibridoma servem como uma fonte desse DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras, tais como células de E. coli, células COS de símio, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), ou células de mieloma que de outro modo não produzem polipeptídeo de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Os artigos de revisão sobre expressão recombinante em bactérias de DNA que codificam o anticorpo

incluem Skerra *et al*., *Curr. Opinion in Immunol*. 5:256-262 (1993) e Plückthun, *Immunol. Revs*., 130:151-188 (1992).

[00150] Em uma outra modalidade, anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos gerados utilizando as técnicas descritas em McCafferty *et al*., *Nature* 348: 552-554 (1990). Clackson *et al*., *Nature* 352:624-628 (1991) and Marks *et al*., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de elevada afinidade (gama nM) pelo embaralhamento ("shuffling") de cadeias (Marks *et al*., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)), bem como infecção combinatória e recombinação in vivo como estratégia para a construção bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse *et al*., *Nuc. Acids. Res*. 21:2265-2266 (1993)). Assim, essas técnicas são alternativas viáveis às técnicas tradicionais de hibridoma de anticorpos monoclonais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

[00151] O DNA pode também ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação por domínios constantes de cadeia pesada e leve humanos em vez das sequências murinas homólogas (Patente US n. 4816567; Morrison *et al*., *Proc. Natl Acad. Sci.* 81:6851 (1984)), ou unindo covalentemente a toda sequência de codificação da imunoglobulina ou parte da sequência de codificação para um polipeptídeo que não é imunoglobulina.

[00152] Tipicamente, tais polipeptídeos não imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo ou são substituídos pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um sítio de combinação de antígeno com especificidade para um antígeno e outro sítio de combinação de antígeno com espe-

cificidade para um antígeno diferente.

[00153] Em algumas modalidades de qualquer dos métodos descritos neste documento, o anticorpo é IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal IgG.

[00154] (ii)Anticorpos humanizados

[00155] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humanizado. Os métodos para humanizar anticorpos não humanos foram descritos na técnica. Em algumas modalidades, o anticorpo humanizado possui um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos nele a partir de uma fonte que é não humana. Esses resíduos de aminoácidos não-humanos são muitas vezes denominados resíduos de "importação", que são tirados normalmente de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones *et al*., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al*., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al*., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), substituindo sequências hipervariáveis pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Por conseguinte, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente US n. 4,816,567) em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são anticorpos tipicamente humanos nos quais alguns resíduos da região hipervariável e possivelmente alguns resíduos FR são substituídos por resíduos de sítios análogos nos anticorpos de roedores.

[00156] A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves como pesados, para serem usados na fabricação de anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o denominado método de "melhor ajuste", a sequência de domínio variável de um anticorpo de roedor é testada contra toda a bibliote-

ca de sequências de domínio variável humanas conhecidas. A sequência humana mais próxima da do roedor é então aceita como a região de framework humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al*., *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia *et al*., *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)). Outro método utiliza uma região de framework particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de regiões variáveis de cadeias leves ou pesadas. O mesmo framework pode ser utilizado para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285 (1992); Presta *et al*., *J. Immunol*. 151:2623 (1993)).

[00157] É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar este objetivo, em algumas modalidades dos métodos, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências parentais e de vários produtos humanizados e manipulados conceituais utilizando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais geralmente encontram-se disponíveis e são familiares àqueles versados na técnica. Os programas de computador disponíveis que ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina do candidato selecionado. A inspeção destas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina do candidato, *ou seja*, a análise dos resíduos que influenciam a capacidade de imunoglobulina do candidato para ligar seu antígeno. Desta forma, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências de recipiente e de importação, de modo que a característica do anticorpo desejado, como maior afinidade para os antígenos alvos, seja alcançada. Em geral, os resíduos da região hipervariável estão diretamente e mais substancial-

mente envolvidos em influenciar a ligação de antígeno.

(iii)Anticorpos humanos

[00158] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humano. Como alternativa à humanização, podem ser gerados anticorpos humanos. Por exemplo, agora é possível produzir animais transgênicos *(por exemplo*, ratos) que são capazes, após a imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção endógena de imunoglobulina. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de união de cadeia pesada de anticorpo (J_H) em camundongos mutantes de linhagem quimérica e germinal resulta em completa inibição da produção de anticorpos endógenos. A transferência da matriz de gene de imunoglobulina de linhagem germinal humana em tais camundongos mutantes de linhagem germinal resultará na produção de anticorpos humanos mediante exposição a antígeno. *Ver*, *por exemplo*, Jakobovits *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al., Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al., Year in Immuno.* 7:33 (1993); e Patente US n. 5,591,669; 5,589,369; e 5,545,807.

[00159] Alternativamente, a tecnologia de exibição de fagos (McCafferty *et al*., *Nature* 348: 552-553 (1990)) pode ser utilizada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos *in vitro*, a partir de repertórios de genes de domínio variável (V) de imunoglobulina de doadores não imunizados. De acordo com esta técnica, os genes de domínio V de anticorpo são clonados in-frame em um gene de polipeptídeo de revestimento principal ou menor de um bacteriófago filamentoso, tal como M13 ou fd, e exibidos como fragmentos de anticorpo funcionais na superfície da partícula de fago. Porque a partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de fita simples do genoma do fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo resultam também na seleção do gene que codifica o anticorpo que

exibe aquelas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exposição de fago pode ser executada em uma variedade de formatos; para revisões, *ver*, *por exemplo*, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Várias fontes de segmentos de genes-V podem ser usadas para exibição de fagos. Clackson *et al*., *Nature* 352:624-628 (1991) isolaram uma disposição diversa de anticorpos anti-oxazolona de uma biblioteca combinatória aleatória pequena de genes V derivados dos baços de camundongos imunizados. Um repertório de genes V dos doadores humanos não-imunizados pode ser construído e anticorpos a uma disposição diversa de antígenos (incluindo antígenos próprios) podem ser isolados essencialmente depois das técnicas descritas por Mark *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), ou Griffith *et al*., *EMBO J*. 12:725-734 (1993). *Ver também* as Patentes US n. 5,565,332 e 5,573,905.

[00160] Os anticorpos humanos também podem ser gerados por células B ativadas *in vitro* (*ver* as Patentes US 5,567,610 e 5,229,275).

(iv) Fragmentos de anticorpo

[00161] Em algumas modalidades, o anticorpo é um fragmento de anticorpo. Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, esses fragmentos eram derivados da digestão proteolítica de anticorpos intactos (*ver*, *por exemplo*, Morimoto *et al*., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) e Brennan *et al., Science* 229:81 (1985)). No entanto, esses fragmentos agora podem ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos também podem ser isolados a partir das bibliotecas de fagos de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e quimicamente acoplados para formar fragmentos de $F(ab')_2$ (Carter *et al*.,

Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos $F(ab')_2$ podem ser isolados diretamente a partir de cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos ficarão evidentes aos versados na técnica. Em outras modalidades, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia simples (scFv). *Ver* WO 93/16185; Patente US n. 5,571,894; e Patente US n. 5,587,458. O fragmento de anticorpo também pode ser um "anticorpo linear", *por exemplo*, como descrito na Patente US 5,641,870, por exemplo. Tais fragmentos de anticorpos lineares podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

[00162] Em algumas modalidades, são providos fragmentos dos anticorpos descritos neste documento. Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo descrito é um fragmento de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, o fragmento de ligação ao antígeno é selecionado a partir do grupo consistindo em um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento $F(ab')_2$, um scFv, um Fv e um diacorpo.

(v) Anticorpos biespecíficos

[00163] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos são anticorpos que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois epítopos diferentes. Os anticorpos biespecíficos exemplares podem se ligar a dois epítopos diferentes. Alternativamente, um braço de ligação de anticorpo biespecífico pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula desencadeante em um leucócito, como uma molécula receptora de célula T *(por exemplo*, CD2 ou CD3), ou receptores Fc para IgG (FcγR), como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), de modo a focar os mecanismos de defesa celular na célula. Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento completo ou fragmentos de anticorpo *(por exemplo*, $F(ab')_2$ anticorpos biespecíficos).

[00164] Os métodos para preparar anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total baseia-se na co-expressão de dois pares de imunoglobulina de cadeia pesada-cadeia leve, onde as duas cadeias têm especificidades diferentes (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Devido ao arranjo aleatório de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem uma mistura em potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais somente uma tem a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é usualmente feita por etapas de cromatografia de afinidade, é bastante trabalhosa e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos semelhantes são divulgados no documento WO 93/08829 e em Traunecker *et al., EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

[00165] De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação anticorpo-antígeno) são fundidos às sequências de domínios constantes de imunoglobulina. Em algumas modalidades, a fusão é realizada com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões de dobradiça CH2 e CH3. Em algumas modalidades, a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) que contém o sítio necessário para a ligação da cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são co-transfectados para um organismo hospedeiro adequado. Isso provê maior flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos polipeptídicos em modalidades quando razões desiguais das três cadeias polipeptídicas utilizadas na construção proveem os rendimentos ótimos. É, no entanto, possível inserir as sequências codificadoras para duas ou para todas as três

cadeias polipeptídicas em um vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em proporções iguais resulta em rendimentos elevados ou quando as proporções não têm significado em particular.

[00166] Em algumas modalidades dessa abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos por uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina híbrida (proporcionando uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Verificou-se que essa estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado das combinações de cadeias de imunoglobulina indesejadas, uma vez que a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em somente uma metade da molécula biespecífica provê uma forma fácil de separação. Esta abordagem é divulgada no documento WO 94/04690. Para mais detalhes da criação de anticorpos biespecíficos *ver*, por exemplo, Suresh *et al., Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[00167] De acordo com outra abordagem descrita na Patente US n. 5,731,168, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser manipulada para maximizar a porcentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura celular recombinante. Em algumas modalidades, a interface compreende pelo menos uma parte do domínio C_H3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais pequenas de aminoácidos da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores *(por exemplo*, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou semelhante à(s) cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo substituindo cadeias laterais grandes de aminoácidos por menores *(por exemplo*, alanina ou treonina). Isso proporciona um mecanismo para au-

mentar o rendimento do heterodímero em relação a outros produtos finais indesejados, como homodímeros.

[00168] Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos "heteroconjugados" ou reticulados. Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado à avidina, e o outro, à biotina. Estes anticorpos foram, por exemplo, propostos para direcionar células do sistema imunitário para células indesejadas (Patente US n. 4676980) e para tratamento de infecção por HIV (ver WO 91/00360, WO 92/200373 e EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser produzidos utilizando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica e são divulgados na Patente US n. 4,676,980, juntamente com várias técnicas de reticulação.

[00169] As técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos também foram descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados utilizando ligação química. Brennan *et al*., *Science* 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são clivados proteoliticamente para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Esses fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante de ditiol, arsenito de sódio, para estabilizar ditióis vicinais e evitar a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab'-TNB é então reconvertido no Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

[00170] Foram também descritas várias técnicas para produzir e isolar fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente de cultura de células recombinantes. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos foram

produzidos utilizando zíperes de leucina. Kostelny *et al*., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão de genes. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região da dobradiça para formar monômeros e depois reoxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Esse método também pode ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpo" descrita por Hollinger *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) proporcionou um mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticorpo biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligante que é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Por conseguinte, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios complementares V_L e V_H de outro fragmento, formando, desse modo, dois sítios de ligação ao antígeno. Relatou-se também outra estratégia para preparar fragmentos de anticorpo biespecíficos pela utilização de dímeros Fv(sFv) de cadeia simples. *Ver* Gruber *et al*., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

[00171] Anticorpos com mais de duas valências são contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt *et al*., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

(vi) Anticorpos Multivalentes

[00172] Em algumas modalidades, os anticorpos são anticorpos multivalentes. Um anticorpo multivalente pode ser internalizado (e/ou catabolizado) mais rapidamente do que um anticorpo bivalente por uma célula que expressa um antígeno ao qual os anticorpos se ligam. Os anticorpos providos neste documento podem ser anticorpos multivalentes (que são diferentes que os da classe IgM) com três ou mais

sítios de ligação ao antígeno (*por exemplo*, anticorpos tetravalentes), que podem ser produzidos facilmente por expressão recombinante de ácido nucleico que codifica as cadeias polipeptídicas do anticorpo. O anticorpo multivalente pode compreender um domínio de dimerização e três ou mais sítios de ligação ao antígeno. O domínio de dimerização preferencial compreende (ou consiste em) uma região Fc ou uma região de dobradiça. Neste cenário, o anticorpo compreenderá uma região Fc e três ou mais sítios de ligação ao antígeno amino-terminal em relação à região Fc. O anticorpo multivalente preferencial neste documento compreende (ou consiste em) três a cerca de oito, mas preferencialmente quatro, sítios de ligação ao antígeno. O anticorpo multivalente compreende pelo menos uma cadeia polipeptídica (e preferencialmente duas cadeias polipeptídicas), em que a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) compreendem dois ou mais domínios variáveis. Por exemplo, a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) pode(m) compreender VD1-(X1)n-VD2-(X2) n-Fc, em que VD1 é um primeiro domínio variável, VD2 é um segundo domínio variável, Fc é uma cadeia polipeptídica de uma região Fc, X1 e X2 representam um aminoácido ou polipeptídeo, e n é 0 ou 1. Por exemplo, a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) pode(m) compreender: cadeia de região VH-CH1-ligante flexível-VH-CH1-Fc; ou cadeia de região VH-CH1-VH-CH1-Fc. O anticorpo multivalente preferencial neste documento compreende adicionalmente pelo menos dois (e preferencialmente quatro) polipeptídeos do domínio variável de cadeia leve. O anticorpo multivalente neste documento pode, por exemplo, compreender de aproximadamente dois a cerca de oito polipeptídeos de domínio variável de cadeia leve. Os polipeptídeos do domínio variável de cadeia leve contemplados neste documento compreendem um domínio variável de cadeia leve e, opcionalmente, compreendem adicionalmente um domínio CL.

[00173] Em algumas modalidades, anticorpo é um anticorpo multi-

específico. Exemplos de anticorpos multiespecíficos incluem, mas não estão limitados a, um anticorpo que compreende um domínio variável de cadeia pesada (V_H) e um domínio variável de cadeia leve (V_L), onde a unidade V_HV_L tem especificidade poliepitópica, anticorpos possuem dois ou mais V_L e V_H com cada unidade V_HV_L ligando-se a um epítopo diferente, anticorpos que possuem dois ou mais domínios variáveis únicos, em que cada domínio variável único se liga a um epítopo diferente, anticorpos de comprimento completo, fragmentos de anticorpo, tais como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacorpos, diacorpos biespecíficos e triacorpos, fragmentos de anticorpo que foram ligados de forma covalente ou não covalente. Em alguma modalidade que o anticorpo possui especificidade poliepitópica; por exemplo, a capacidade de se ligar especificamente a dois ou mais epítopos diferentes no(s) mesmo(s) ou alvo(s) diferente(s). Em algumas modalidades, os anticorpos são monoespecíficos; por exemplo, um anticorpo que liga apenas um epítopo. De acordo com uma modalidade, o anticorpo multiespecífico é um anticorpo IgG que se liga a cada epítopo com uma afinidade de 5 μM a 0,001 pM, 3 μM a 0,001 pM, 1 μM a 0,001 pM, 0,5 μM a 0,001 pM, ou 0,1 μM a 0,001 pM.

(vii) Outras Modificações de Anticorpos

[00174] Pode ser desejável modificar o anticorpo provido neste documento em relação à função efetora, *por exemplo*, de modo a aumentar a citotoxicidade mediada por células dependentes ao antígeno (ADCC) e/ou a citotoxicidade dependente do complemento (CDC) do anticorpo. Isto pode ser alcançado através da introdução de uma ou mais substituições de aminoácidos em uma região Fc do anticorpo. Alternativa ou adicionalmente, os resíduos de cisteína podem ser introduzidos na região Fc, permitindo assim a formação de ligações dissulfeto entre cadeias nesta região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter uma capacidade de internalização melhorada e/ou au-

mento da morte celular mediada pelo complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). *Ver* Caron *et al*., *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, BJ, *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Os anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral melhorada podem também ser preparados utilizando agentes de reticulação heterobifuncionais, tal como descrito em Wolff *et al*., *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo pode ser modificado com duas regiões Fc e pode, assim, ter lise mediada por complemento e capacidades ADCC aprimoradas. *Ver* Stevenson *et al*., *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

[00175] Para aumentar a metade do soro da meia vida sérica do anticorpo, podem ser feitas alterações de aminoácidos no anticorpo como descrito na US 2006/0067930, a qual é incorporada neste documento por referência na sua totalidade.

(B)Variantes e Modificações do Polipeptídeo

[00176] A(s) modificação(ões) da sequência de aminoácidos dos polipeptídeos, incluindo anticorpos, descritos neste documento podem ser usados nos métodos de purificação de polipeptídeos (*por exemplo*, anticorpos) descritos neste documento.

Variantes de Polipeptídeos

[00177] "Variante de polipeptídeo" significa um polipeptídeo, preferencialmente um polipeptídeo ativo, como definido neste documento, possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos com uma sequência nativa de comprimento total do polipeptídeo, uma sequência polipeptídica sem o polipeptídeo do sinal, um domínio extracelular de um polipeptídeo, com ou sem o polipeptídeo do sinal. Tais variantes polipeptídicas incluem, por exemplo, polipeptídeos em que um ou mais resíduos de aminoácidos são adicionados, ou eliminados, no terminal N ou C da sequência de aminoácidos nativo de comprimento total. Normalmente, uma variante de polipeptídeo TAT

terá pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de qualquer identidade de sequência de aminoácidos de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% em relação a uma sequência polipeptídica de sequência nativa completa, uma sequência polipeptídica que não possui o sinal peptídico, um domínio extracelular de um polipeptídeo, com ou sem sinal peptídico. Opcionalmente, os polipeptídeos variantes não terão mais do que uma substituição conservativa de aminoácidos em comparação com a sequência do polipeptídeo nativo, alternativamente não mais do que qualquer uma dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições de aminoácidos conservativos em comparação com a sequência do polipeptídeo nativo.

[00178] O polipeptídeo variante pode ser truncado no terminal N ou terminal C, ou pode carecer de resíduos internos, por exemplo, quando comparado com um polipeptídeo nativo de comprimento total. Certos polipeptídeos variantes podem carecer de resíduos de aminoácidos que não são essenciais para uma atividade biológica desejada. Estes polipeptídeos variantes com truncamentos, deleções e inserções podem ser preparados por qualquer uma das várias técnicas convencionais. Os polipeptídeos variantes desejados podem ser sintetizados quimicamente. Outra técnica adequada envolve isolar e amplificar um fragmento de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo variante desejado, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos que definem os terminais desejados do fragmento de ácido nucleico são empregados nos iniciadores 5 'e 3' na PCR. Preferencialmente, os polipeptídeos variantes partilham pelo menos uma atividade biológica e/ou imunológica com o polipeptídeo nativo divulgado neste documento.

[00179] As inserções de sequência de aminoácidos incluem fusões amino e/ou carbóxi-terminais que variam em comprimento de um resí-

duo a polipeptídeos que contém cem ou mais resíduos, bem como inserções intrassequênciais de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionila do terminal N ou o anticorpo fundido com um polipeptídeo citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao terminal N ou C do anticorpo de uma enzima ou um polipeptídeo que aumenta a meia-vida sérica do anticorpo.

[00180] Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do polipeptídeo. As variantes da sequência do polipeptídeo são preparadas por meio da introdução de alterações de nucleotídeos apropriadas no ácido nucleico do anticorpo ou por síntese de peptídeos. Essas modificações incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em e/ou substituições de resíduos dentro das sequências de aminoácidos do polipeptídeo. Qualquer combinação de exclusão, inserção, e substituição é feita para chegar ao construto final, desde que o construto final possua as características desejadas. As alterações de aminoácidos também podem alterar os processos pós-transladação do polipeptídeo (*por exemplo*, anticorpo), tais como alteração da quantidade ou posição dos sítios de glicosilação.

[00181] A orientação para determinar qual resíduo de aminoácido pode ser inserido, substituído ou eliminado sem afetar adversamente a atividade desejada pode ser encontrada por meio da comparação da sequência do polipeptídeo com aquela das moléculas de polipeptídeo conhecidas homólogas e minimizando o número de alterações de sequência de aminoácidos feitas em regiões de homologia elevada.

[00182] Um método útil para a identificação de certos resíduos ou regiões do polipeptídeo (*por exemplo*, anticorpo) que são locais preferenciais para mutagênese é chamado de "mutagênese de varredura de alanina" como descrito por Cunningham e Wells, *Science* 244:1081-

1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo são identificados (*por exemplo*, resíduos carregados como Arg, Asp, His, Lys e Glu) e substituídos por um aminoácido neutro ou carregado negativamente (mais preferencialmente Alanina ou Polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antígeno. Esses locais de aminoácidos demonstram sensibilidade funcional às substituições são então refinadas por meio da introdução de variantes adicionais ou outras em, ou para, os sítios de substituição. Desta forma, embora o local para introdução de uma variação de sequência de aminoácidos seja predeterminado, a natureza da mutação per se não precisa ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação em um determinado sítio, a varredura Ala ou mutagênese aleatória é conduzida no códon ou região alvo e as variantes de anticorpos são selecionadas para a atividade desejada.

[00183] Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes possuem pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para mutagênese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas as alterações de FR também são contempladas. Substituições conservativas são mostradas na Tabela 1 abaixo sob o título de "substituições conservativas". Se estas substituições resultarem em uma alteração na atividade biológica, então alterações mais substanciais, denominadas "substituições exemplificativas" na Tabela 1, ou como adicionalmente descrito acima em referência a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos, examinados.

Tabela 1

Resíduo Original	Exemplos de Substituições	Substituições Conservativas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

[00184] Modificações substanciais nas propriedades biológicas do polipeptídeo são obtidas por meio de substituições seletivas que se diferem de modo significativo em seus efeitos de manutenção (a) da estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma conformação helicoidal ou de lâmina, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo ou (c) do volume da cadeia lateral. Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com as semelhanças nas propriedades das suas cadeias laterais (em AL Lehninger, *Biochemistry* segunda ed., Pp. 73-75, Worth Publishers, Nova York (1975)):

não polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

polar sem carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

ácido: Asp (D), Glu (E)

básico: Lys (K), Arg (R), His (H)

[00185] Alternativamente, os resíduos de ocorrência natural podem ser divididos em grupos com base em propriedades comuns da cadeia lateral:

hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

ácidos: Asp, Glu;

básicos: His, Lys, Arg;

resíduos que influenciam na orientação de cadeia: Gly, Pro;

aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[00186] As substituições não conservativas implicam a troca de um membro de uma dessas classes por outra classe.

[00187] Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada do anticorpo pode também ser substituído, geralmente por serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir ligação cruzada aberrante. Por outro lado, uma ligação(ões) de cisteína pode(m) ser adicionada(s) ao polipeptídeo para melhorar a sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

[00188] Um tipo de variante substitucional particularmente preferencial envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo de origem (*por exemplo*, um anticorpo humanizado). Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para desenvolvimento posterior terão propriedades biológicas melhoradas em relação ao anticorpo de origem a partir do qual elas são geradas.

Uma maneira conveniente para gerar tais variantes de substituição envolve a maturação por afinidade usando exibição de fagos. Resumidamente, vários sítios de região hipervariáveis (*por exemplo*, 6-7 sítios) sofrem mutações para gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis em cada sítio. As variantes de anticorpos assim geradas são exibidas de uma forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusões para o produto do gene III de M13 embalado dentro de cada partícula. As variantes exibidas no fago são então triadas quanto à sua atividade biológica (*por exemplo*, afinidade de ligação) como divulgado neste documento. De modo a identificar os sítios da região hipervariável candidatos para modificação, a mutagênese de varredura de alanina pode ser realizada para identificar resíduos da região hipervariável que contribuem significativamente para a ligação ao antígeno. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e o alvo. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos à substituição de acordo com as técnicas aqui elaboradas. Uma vez que tais variantes são geradas, o painel de variantes é submetido a rastreio conforme descrito neste documento e anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento posterior.

[00189] Outro tipo de variante de aminoácido do polipeptídeo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. O polipeptídeo pode compreender frações de não aminoácido. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser glicosilado. Tal glicosilação pode ocorrer naturalmente durante a expressão do polipeptídeo na célula hospedeira ou organismo hospedeiro, ou pode ser uma modificação deliberada decorrente de intervenção humana. Por alteração designa-se dizer deletar uma ou mais frações de carboidrato encontradas no polipeptídeo, e/ou adicio-

nar um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no polipeptídeo.

[00190] A glicosilação do polipeptídeo é tipicamente N-ligada ou O-ligada. N-ligada se refere à ligação da fração carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da fração carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Assim, a presença de qualquer uma dessas sequências tripeptídicas em um polipeptídeo cria um local de glicosilação em potencial. A glicosilação de ligação a O se refere à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possam ser usados.

[00191] Adição de locais de glicosilação ao polipeptídeo é realizada convenientemente ao se alterar a sequência de aminoácidos de tal forma que contenha uma ou mais das sequências de tripeptídeo descritas acima (para locais de glicosilação de ligação a N). A alteração também pode ser pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para locais de glicosilação ligada a O).

[00192] A remoção de frações de carboidrato presentes no polipeptídeo pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente ou pela substituição mutacional de códons que codificam para resíduos de aminoácidos que servem como alvos para a glicosilação. A clivagem enzimática de frações carboidrato em polipeptídeos pode ser alcançada pelo uso de uma variedade de endo e exoglicosidases.

[00193] Outras modificações incluem a desamidação de resíduos de glutaminila e asparaginila para os resíduos de glutamila e aspartila correspondentes, respectivamente, a hidroxilação de prolina e lisina,

fosforilação de grupos hidroxila de resíduos de serila ou treonila, metilação dos grupos α-amino de lisina, arginina e cadeias laterais de histidina, acetilação da amina N-terminal e amidação de qualquer grupo carboxila C-terminal.

Polipeptídeos Quiméricos

[00194] O polipeptídeo descrito neste documento pode ser modificado de forma a formar moléculas quiméricas compreendendo o polipeptídeo fundido um com outro, polipeptídeo heterólogo ou sequência de aminoácidos. Em algumas modalidades, uma molécula quimérica compreende uma fusão do polipeptídeo com um polipeptídeo de marcação que provê um epítopo ao qual um anticorpo anti-marcação pode se ligar seletivamente. A marcação do epítopo é geralmente colocada no terminal amino ou carboxila do polipeptídeo. A presença de tais formas marcadas com epítopo do polipeptídeo pode ser detectada usando um anticorpo contra o polipeptídeo marcador. Além disso, a provisão da marcação de epítopo permite que o polipeptídeo seja prontamente purificado por meio de purificação por afinidade usando um anticorpo anti-marcador ou outro tipo de matriz de afinidade que se liga ao marcador de epítopo.

[00195] Em uma modalidade alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão do polipeptídeo com uma imunoglobulina ou uma região particular de uma imunoglobulina. Uma forma bivalente da molécula quimérica é referida como uma "imunoadesina".

[00196] Tal como usado neste documento, o termo "imunoadesina" designa moléculas do tipo anticorpo que combinam a especificidade de ligação de um peptídeo heterólogo com as funções efetoras dos domínios constantes de imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas compreendem uma fusão de uma sequência de aminoácidos com a especificidade de ligação desejada que é outra senão o reconhecimento do antígeno e do local de ligação a um anticorpo (*isto* é,

"heteróloga") e uma sequência de domínio constante de imunoglobulina. A parte de adesina de uma molécula de imunoadesina é tipicamente uma sequência de aminoácidos contígua compreendendo pelo menos o local de ligação de um receptor ou um ligante. A sequência de domínio constante de imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida de qualquer imunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, ou IgG-4, IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM.

[00197] As fusões de Ig incluem preferencialmente a substituição de uma forma solúvel (domínio transmembrana eliminado ou inativado) de um polipeptídeo em lugar de pelo menos uma região variável dentro de uma molécula de Ig. Em uma modalidade particularmente preferencial, a fusão de imunoglobulina inclui a dobradiça, CH_2 e CH_3, ou a dobradiça, regiões CH_1, CH_2 e CH_3 de uma molécula de IgG1.

Conjugados Polipeptídicos

[00198] O polipeptídeo para uso em formulações polipeptídicas pode ser conjugado com um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, um agente inibidor de crescimento, uma toxina (*por exemplo*, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos dos mesmos), ou um isótopo radioativo (*a saber*, um radioconjugado).

[00199] Podem ser utilizados agentes quimioterapêuticos úteis na geração de tais conjugados. Além disso, toxinas enzimaticamente ativas ou fragmentos das mesmas que podem ser usados incluem cadeia A de difteria, fragmentos ativos não ligantes da toxina da difteria, cadeia A de exotoxina (de Pseudomonas aeruginosa), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e o tricotecenos. Uma variedade de radio-

nuclídeos estão disponíveis para a produção de polipeptídeos radioconjugados. Exemplos incluem ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, e ^{186}Re. Os conjugados do polipeptídeo e agente citotóxico são feitos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais, tais como propionato de N-sucinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como, suberato de dissucinimidila), aldeídos (tais como o glutaraldeído), compostos de bis-azido (como bis(p-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenodiamina), di-isocianatos (tais como, di-isocianato de 2,6-tolueno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al*., *Science* 238:1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopenta-acético marcado no carbono 14 (MX-DTPA) é um agente quelante exemplar para a conjugação de radionucleotídeo ao polipeptídeo.

[00200] Os conjugados de um polipeptídeo e uma ou mais toxinas de moléculas pequenas, tais como uma caliqueamicina, maitansinoides, um tricoteno e CC1065, e os derivados destas toxinas que têm atividade de toxina, também são contemplados neste documento.

[00201] Os maitansinoides são inibidores mitóticos que atuam inibindo a polimerização da tubulina. A maitansina foi isolada pela primeira vez a partir do arbusto da África Oriental *Maytenus serrata*. Posteriormente, descobriu-se que certos micróbios também produzem maitansinoides, como os ésteres de maitansinol e maitansinol C-3. Também é contemplado o maitansinol sintético e os derivados e análogos do mesmo. Existem muitos grupos de ligação conhecidos na técnica para fabricar conjugados maitansinoides polipeptídicos, incluindo, por exemplo, aqueles divulgados na Pat. US n. 5,208,020. Os grupos de ligação incluem grupos de dissulfeto, grupos de tioéter, grupos de áci-

dos lábeis, grupos fotolábeis, grupos lábeis de peptidase ou grupos lábeis de esterase, conforme divulgado nas patentes identificadas acima, sendo os grupos dissulfeto e tioéter preferenciais.

[00202] O ligante pode ser anexado à molécula de maitasinoide em várias posições, dependendo do tipo de ligação. Por exemplo, uma ligação de éster pode ser formada pela reação com um grupo hidroxila utilizando técnicas de acoplamento convencionais. A reação pode ocorrer na posição C-3 possuindo um grupo hidroxila, a posição C-14 modificada com hidroximetila, a posição C-15 modificada com um grupo hidroxila, e a posição C-20 com um grupo hidroxila. Em uma modalidade preferencial, a articulação é formada na posição C-3 de maitansinol ou um análogo de maitansinol.

[00203] Outro conjugado de interesse compreende um polipeptídeo conjugado com uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família de antibióticos caliqueamicina é capaz de produzir quebras de DNA de fita dupla em concentrações sub-picomolares. Para a preparação dos conjugados da família da caliqueamicina, *vide*, *por exemplo*, Pat. US n. 5,712,374. Os análogos estruturais da caliqueamicina que podem ser usados incluem, mas não estão limitados a γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-acetil-γ_1^I, PSAG e θ_1^I. Outra fármaco anti-tumoral que o anticorpo pode ser conjugado é QFA, que é um antifolato. Tanto a caliqueamicina quanto o QFA têm sítios de ação intracelulares e não atravessam facilmente a membrana plasmática. Portanto, a absorção celular destes agentes pelo polipeptídeo (*por exemplo*, anticorpo) mediado pela internalização aumenta significativamente seus efeitos citotóxicos.

[00204] Outros agentes antitumorais que podem ser conjugados com os polipeptídeos descritos neste documento incluem BCNU, estreptozoicina, vincristina e 5-fluorouracila, a família de agentes conhecido coletivamente como complexo LL-E33288, bem como esperamicinas.

[00205] Em algumas modalidades, o polipeptídeo pode ser um conjugado entre um polipeptídeo e um composto com atividade nucleolítica (*por exemplo*, uma ribonuclease ou uma endonuclease de DNA tal como uma desoxirribonuclease; DNase).

[00206] Em ainda outra modalidade, o polipeptídeo (*por exemplo*, anticorpo) pode ser conjugado a um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização no pré-direcionamento do tumor, em que o conjugado de anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguido pela remoção do conjugado não ligado da circulação usando um agente depurante e então a administração de um "ligante" (*por exemplo*, avidina) que é conjugado a um agente citotóxico (*por exemplo*, um fármaco ou radionucleotídeo).

[00207] Em algumas modalidades, o polipeptídeo que pode ser conjugado a uma enzima que ativa a pró-fármaco converte uma pró-fármaco (*por exemplo*, um agente quimioterapêutico de peptidil) em umo fármaco anticancerígena. O componente enzimático do imunoconjugado inclui qualquer enzima capaz de atuar sobre um pró-fármaco de forma a convertê-la na sua forma mais ativa e citotóxica.

[00208] As enzimas que são úteis incluem, entre outros, fosfatases alcalinas, que são úteis para a conversão de pró-fármacos que contêm fosfato em fármacos livres; arilsulfatases, úteis para a conversão de pró-fármacos que contêm sulfato em fármacos; citosina deaminase, útil para a conversão de 5-fluorocitosina não tóxica em fármaco anticancerígena, 5-fluorouracil; proteases, como serratia protease, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (como catepsinas B e L), úteis para a conversão de pró-fármacos que contêm peptídeo em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para a conversão de pró-fármacos de conversão que contêm substituintes de D-aminoácido; enzimas que clivam carboidratos como β-galactosidase e neuraminidase, úteis para a conversão de pró-fármacos glicosiladas em fárma-

cos livres; β-lactamase, útil para a conversão de fármacos derivadas com β-lactâmicos em fármacos livres; e penicilina V amidase e penicilina G amidase, úteis para a conversão de fármacos derivatizadas em seus nitrogênios da amina com grupos fenoxiacetil ou fenilacetil, respectivamente, em fármacos livres. Alternativamente, anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como "abzimas", podem ser usados para converter os pró-fármacos em fármacos ativos livres.

Outros

[00209] Outro tipo de modificação covalente do polipeptídeo compreende ligar o polipeptídeo a um de uma variedade de polímeros não proteicos, *por exemplo*, polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos ou copolímeros de polietilenoglicol e polipropileno glicol. Os polipeptídeos também podem ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacilato), respectivamente, em sistemas de distribuição de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas no Remington's Pharmaceutical *Sciences*, 18a edição, Gennaro, AR, Ed., (1990).

IV. Obtenção de Polipeptídeos para Uso nas Formulações e Métodos

[00210] Os polipeptídeos usados nos métodos de análise descritos neste documento podem ser obtidos usando métodos bem conhecidos na técnica, incluindo os métodos de recombinação. As seções a seguir fornecem orientação acerca desses métodos.

Polinucleotídeos

[00211] "Polinucleotídeo" ou "ácido nucleico", conforme usados permutavelmente aqui, referem-se a polímeros de nucleotídeos de

qualquer comprimento e incluem DNA e RNA.

[00212] Os polinucleotídeos que codificam polipeptídeos podem ser obtidos a partir de qualquer fonte incluindo, mas não limitado a uma biblioteca de cDNA preparada a partir do tecido que se acredita possuir o mRNA do polipeptídeo e para expressá-lo a um nível detectável. Consequentemente, os polinucleotídeos que codificam o polipeptídeo podem ser obtidos convenientemente a partir de uma biblioteca de cDNA preparada a partir de tecido humano. O gene que codifica o polipeptídeo também pode ser obtido a partir de uma biblioteca genômica ou por procedimentos sintéticos conhecidos (*por exemplo*, síntese automatizada de ácido nucleico).

[00213] Por exemplo, o polinucleotídeo pode codificar uma cadeia de moléculas de imunoglobulina inteira, tal como uma cadeia leve ou uma cadeia pesada. Uma cadeia pesada completa inclui não apenas uma região variável de cadeia pesada (V_H), mas também uma região constante de cadeia pesada (C_H), que tipicamente compreenderá três domínios constantes: C_H1, C_H2 e C_H3; e uma região de "dobradiça". Em algumas situações, a presença de uma região constante é desejável.

[00214] Outros polipeptídeos que podem ser codificados pelo polinucleotídeo incluem fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno tais como anticorpos de domínio único ("dAbs"), Fv, scFv, Fab' e $F(ab')_2$ e "minicorpos." Os minicorpos são (tipicamente) fragmentos de anticorpos bivalentes dos quais o domínio C_H1 e C_K ou C_L foi excisado. Como os minicorpos são menores do que os anticorpos convencionais, eles devem alcançar uma melhor penetração do tecido em uso clínico/diagnóstico, mas sendo bivalentes eles devem reter afinidade de ligação maior do que fragmentos de anticorpos monovalentes, como dAbs. Por conseguinte, a menos que o contexto dite o contrário, o termo "anticorpo", tal como utilizado neste documento, abrange não ape-

nas moléculas de anticorpo completas, mas também fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno do tipo discutido acima. Preferencialmente, cada região de framework presente no polipeptídeo codificado compreenderá pelo menos uma substituição de aminoácido em relação ao framework humano aceptor correspondente. Assim, por exemplo, as regiões de framework podem compreender, no total, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, catorze ou quinze substituições de aminoácidos em relação às regiões de framework aceptoras.

V. Modalidades Exemplares

[00215] Modalidade 1. Em algumas modalidades, é proporcionado um método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que a interferência entre o tensoativo não iônico e o polipeptídeo durante a quantificação é reduzida, em que o método compreende as etapas de

aplicação da composição a um material de cromatografia de troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma fase móvel A e uma fase móvel B, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol, em que o polipeptídeo se liga ao material de cromatografia especificamente e não especificamente;

eluição do polipeptídeo especificamente ligado a partir do material da cromatografia de troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada em comparação à etapa a);

eluição do tensoativo não iônico e do polipeptídeo não especificamente ligado a partir do material de cromatografia com uma so-

lução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada em comparação à etapa c);

quantificação do tensoativo não iônico, em que a interferência entre o tensoativo não iônico e o polipeptídeo durante a quantificação é reduzida.

[00216] Modalidade 2. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 1, a razão da fase móvel B para a fase móvel A na etapa a) é de cerca de 10:90.

[00217] Modalidade 3. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 1 ou 2, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 40:60 na etapa b).

[00218] Modalidade 4. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-3, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 100:0 na etapa c).

[00219] Modalidade 5. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-4, a fase móvel A compreende cerca de 2% de ácido em água.

[00220] Modalidade 6. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-5, a fase móvel B compreende cerca de 2% de ácido em metanol.

[00221] Modalidade 7. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-6, o ácido é o ácido fórmico.

[00222] Modalidade 8. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-6, o ácido é ácido acético.

[00223] Modalidade 9. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-8, a vazão da cromatografia é de cerca de 1,25 mL/minuto.

[00224] Modalidade 10. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 9, a etapa b) começa cerca de 1 min após a cromatografia

ser iniciada e termina cerca de 3,4 min após a cromatografia ser iniciada.

[00225] Modalidade 11. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 9 ou 10, a etapa c) começa cerca de 3,5 min após a cromatografia ser iniciada e termina cerca de 4,6 min após a cromatografia ser iniciada.

[00226] Modalidade 12. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-11, o agente tensoativo não iônico é poloxâmero (P188) ou um polissorbato.

[00227] Modalidade 13. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 12, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80.

[00228] Modalidade 14. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-13, a concentração de tensoativos não iônicos na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v).

[00229] Modalidade 15. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-14, a concentração de proteína na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL.

[00230] Modalidade 16. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-15, a formulação tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5.

[00231] Modalidade 17. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-16, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão, um tensoativo e um agente de tonicidade.

[00232] Modalidade 18. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-17, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito.

[00233] Modalidade 19. Em algumas modalidades adicionais de

qualquer uma das modalidades 1-18, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico.

[00234] Modalidade 20. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 16, o polipeptídeo terapêutico é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco.

[00235] Modalidade 21. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-20, o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa.

[00236] Modalidade 22. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-21, o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto compreende uma fração amina quaternária.

[00237] Modalidade 23. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-22, o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto compreende um suporte sólido.

[00238] Modalidade 24. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-23, o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto está contido em uma coluna.

[00239] Modalidade 25. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-24, o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

[00240] Modalidade 26. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-25, o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis®

MAX.

[00241] Modalidade 27. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 1-26, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[00242] Modalidade 28. Em algumas modalidades, é proporcionado um método para quantificação de um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que o método compreende as etapas de

aplicação da composição e um material de cromatografia de troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma fase móvel A e uma fase móvel B, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em um solvente orgânico;

eluição do polipeptídeo a partir do material da cromatografia de troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada em comparação à etapa a);

eluição do tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada em comparação à etapa c);

quantificação do tensoativo não iônico.

[00243] Modalidade 29. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 28, o solvente orgânico da fase móvel B é metanol.

[00244] Modalidade 30. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 28 ou 29, a razão da fase móvel B para a fase móvel A na etapa a) é de cerca de 10:90.

[00245] Modalidade 31. Em algumas modalidades adicionais de

qualquer uma das modalidades 28-30, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 45:55 na etapa b).

[00246] Modalidade 32. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-31, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 100:0 na etapa c).

[00247] Modalidade 33. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-32, a fase móvel A compreende cerca de 2% de hidróxido de amônio em água.

[00248] Modalidade 34. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-33, a fase móvel B compreende cerca de 2% de hidróxido de amônio em metanol.

[00249] Modalidade 35. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-34, a vazão da cromatografia é de cerca de 1,4 mL/minuto.

[00250] Modalidade 36. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 35, a etapa b) começa cerca de 1 min após a cromatografia ser iniciada e termina cerca de 4,4 min após a cromatografia ser iniciada.

[00251] Modalidade 37. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 35 ou 36, a etapa c) começa cerca de 4,5 min após a cromatografia ser iniciada e termina cerca de 7,6 min após a cromatografia ser iniciada.

[00252] Modalidade 38. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das formas de realização 28-37, o agente tensoativo não iônico é um polissorbato.

[00253] Modalidade 39. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 38, o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80.

[00254] Modalidade 40. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 38 ou 39, a concentração de polissorbato na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v).

[00255] Modalidade 41. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 28, o solvente orgânico da fase móvel B é acetonitrila.

[00256] Modalidade 42. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 41, a razão da fase móvel B para a fase móvel A na etapa a) é de cerca de 10:90.

[00257] Modalidade 43. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 41 ou 42, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 40:60 na etapa b).

[00258] Modalidade 44. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 41-43, a razão da fase móvel B para a fase móvel A é aumentada para cerca de 100:0 na etapa c).

[00259] Modalidade 45. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 41-44, a fase móvel A compreende cerca de 2% de hidróxido de amônio em água.

[00260] Modalidade 46. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 41-45, a fase móvel B compreende cerca de 2% de hidróxido de amônio em acetonitrila.

[00261] Modalidade 47. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 41-46, o tensoativo não iônico é um poloxâmero.

[00262] Modalidade 48. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 48, o poloxâmero é poloxâmero P188.

[00263] Modalidade 49. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 48 ou 49, a concentração de poloxâmero na composição está na faixa de cerca de 0,001% a 1,0% (p/v).

[00264] Modalidade 50. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-49, a composição compreende ainda N-acetil triptofano e/ou metionina.

[00265] Modalidade 51. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 50, a concentração de N-acetil triptofano na composição

varia entre cerca de 0,1 mM e cerca de 10 mM.

[00266] Modalidade 52. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 50, a concentração de metionina na composição varia entre cerca de 0,1 mM e cerca de 100 mM.

[00267] Modalidade 53. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-52, a concentração de polipeptídeo na composição é de cerca de 1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL.

[00268] Modalidade 54. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-53, a formulação tem um pH de cerca de 4,5 a cerca de 7,5.

[00269] Modalidade 55. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-54, a composição compreende adicionalmente um ou mais excipientes selecionados dentre o grupo que consiste em um estabilizador, um tampão e um agente de tonicidade.

[00270] Modalidade 56. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-55, a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito.

[00271] Modalidade 57. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-56, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico.

[00272] Modalidade 58. Em algumas modalidades adicionais da modalidade 57, a proteína terapêutica é um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo glico-manipulado ("glycoengineered"), um fragmento de anticorpo, um conjugado de anticorpo-fármaco, um THIOMAB™ ou um conjugado de THIOMAB™-fármaco.

[00273] Modalidade 59. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-58, o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca ca-

tiônica forte de fase reversa.

[00274] Modalidade 60. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-59, o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto compreende uma fração de ácido sulfônico.

[00275] Modalidade 61. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-60, o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido.

[00276] Modalidade 62. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-61, o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna.

[00277] Modalidade 63. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-62, o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

[00278] Modalidade 64. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-63, o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia Oasis® MAX.

[00279] Modalidade 65. Em algumas modalidades adicionais de qualquer uma das modalidades 28-64, o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou ao usar um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

[00280] Todas as características divulgadas neste relatório descritivo podem ser combinadas em qualquer combinação. Cada característica divulgada neste relatório descritivo pode ser substituída por uma característica alternativa servindo a mesma, equivalente ou semelhante finalidade. Assim, a menos que expressamente indicado em contrário, cada característica divulgada é apenas um exemplo de uma série genérica de características equivalentes ou semelhantes.

[00281] Mais detalhes da invenção são ilustrados pelos seguintes

exemplos não limitativos. As divulgações de todas as referências na especificação são expressamente incorporadas neste documento por referência.

EXEMPLOS

[00282] Os exemplos abaixo pretendem ser puramente exemplares da invenção e, portanto, não devem ser considerados para limitar a invenção de forma alguma. Os seguintes exemplos e descrição detalhada são oferecidos a título de ilustração e não a título de limitação.

Materiais e Métodos para os Exemplos

[00283] Os seguintes materiais e métodos foram utilizados para os exemplos, salvo indicação em contrário.

Materiais

[00284] Todos os mAb (A1-A20) foram fabricados utilizando linhas celulares de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou células de *Escherichia coli* estáveis.

[00285] Cartuchos Waters Oasis® MAX (2,1 x 20 mm, tamanho de partícula de 30 µm, PN# 186002052) e cartuchos Waters Oasis® MCX (2,1 x 20 mm, tamanho de partícula de 30 µm, PN # 186002051) foram adquiridos da Waters. O polissorbato 20 foi obtido da Sigma (P/N T2700-100ML). O ácido fórmico foi obtido da Fluka (P/N 94318-250ML-F). O ácido acético glacial de grau de HPLC foi obtido de JT Baker (P/N 9515-03). O isopropanol (P/N PX1834-1) e o metanol (P/N MX0488-1) de grau HPLC foram obtidos a partir de OmniSolv. A água de grau HPLC foi obtida da Honeywell (Cat. n. 365-4). A solução de amônia, 27-31%, foi obtida da Spectrum Chemicals (P/N AM180).

Exemplo 1. Otimização

[00286] Uma solução mais robusta é necessária para eliminar a interferência de proteínas e produzir quantificação consistente de PS20 em todos os lotes de cartuchos de HPLC. Como ponto de partida, utilizou-se uma formulação de conjugado de fármaco de anticorpo (ADC)

para avaliar a eficácia das modificações dos métodos anteriores antes de avaliar outras moléculas com os métodos da presente invenção. Os objetivos dos experimentos foram desenvolver um ensaio PS para permitir a quantificação robusta de PS20 em múltiplas formulações de produto minimizando ou removendo completamente a interferência de proteínas, para demonstrar que o ensaio da invenção melhora a precisão e reprodutibilidade da quantificação de PS20 em comparação com ensaios anteriores, incluindo robustez em vários lotes de cartuchos e para realizar estudos de qualificação para avaliar precisão, precisão, especificidade, repetibilidade e precisão intermediária do PS20 em formulações selecionadas de produtos.

Métodos

[00287] Para todos os experimentos, as seguintes configurações do ELSD foram usadas:

[00288] A intensidade da fonte de luz (LED) foi definida para 75%

[00289] O ganho do detector (PMT) foi definido como 1

[00290] No ensaio de HPLC, os ésteres de PS20 retêm-se no cartucho enquanto outros excipientes, proteínas e espécies PS20 não esterificadas eluem nas etapas de passagem ou de lavagem. Após a etapa de lavagem, o detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD) é colocado em linha utilizando uma válvula de desvio e as espécies de polissorbato esterificado são eluídas com um gradiente degrau de uma % de fase orgânica mais elevada. As espécies de PS20 não esterificadas constituem cerca de 20% da composição total de PS20 (Hewitt, D. *et al.*, 2011, *J. Chromatography A*, 1218: 2138-2145). O ensaio HPLC-ELSD quantifica apenas ésteres PS20, o que é suficiente, desde que o lote de PS20 utilizado para a preparação de padrões contenha quantidades semelhantes de ésteres de PS20 em comparação com o PS20 na amostra. Uma composição de ésteres de PS20 semelhante aos padrões pode ser assegurada por um protocolo

de equivalência (Hewitt, D. *et al.*, 2011, *J. Cromatography A*, 1215: 156-160), ou combinando o lote de PS20 utilizado para fazer padrões para o lote usado na amostra.

[00291] As condições HPLC-ELSD para o método original, também referidas como Método 0, foram as seguintes: Agilent 1200 HPLC e Varian 380 ELSD; O cartucho era um cartucho on-line Waters Oasis MAX; A fase móvel A foi 2% de ácido fórmico em água; A fase móvel B foi 2% de ácido fórmico em isopropanol; a vazão foi de 1 mL/min; e o volume de injeção foi de 20 µl. O gradiente é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Gradiente do Método 0

Tempo (min)	**% da Fase móvel A**	**% da Fase móvel B**	**Descrição da Etapa**
0	90	10	Carga
1	80	20	Lavagem
3,4	80	20	Lavagem
3,5	0	100	Eluição
4,6	0	100	Eluição
4,7	90	10	Equilibrar
6,6	90	10	Equilibrar

[00292] O método final, também referido como Método 1, com modificações do original em negrito/sublinhado é resumido abaixo. A Tabela 3 mostra o gradiente de LC e a Tabela 4 mostra uma sequência típica de injeções para este ensaio. As condições de HPLC-ELSD foram as seguintes: Agilent 1200 HPLC e Varian 380 ELSD; O cartucho era um cartucho on-line Waters Oasis MAX; A fase móvel A foi 2% de ácido fórmico em água ou 2% de ácido acético em água; A fase móvel B foi 2% de ácido fórmico em isopropanol ou 2% de ácido acético em metanol; a vazão foi de 1,25 mL/min; e o volume de injeção foi de 20 µL (faixa de concentração de PS20 dependente). Embora o ácido acético tenha sido escolhido para as condições finais, inicialmente foi realizado algum trabalho de qualificação e robustez usando 2% de ácido fórmico na fase móvel.

Tabela 3: Gradiente do Método 1

Tempo (min)	% da Fase móvel A	% da Fase móvel B	Descrição da Etapa
0	90	10	Carga
1	**60**	**40**	Lavagem
3,4	**60**	**40**	Lavagem
3,5	0	100	Eluição
4,6	0	100	Eluição
4,7	90	10	Equilibrar
6,6	90	10	Equilibrar

Tabela 4: Sequência Típica

Número de injeções:	Amostra:
~5	Água
2	Padrão 1
2	Padrão 2
2	Padrão 3
1	Controle na concentração do PS20 alvo
2	Tampão de formulação livre de PS20
2	Proteína livre de PS20
3	PS20 a 50% de concentração adicionada a proteína livre de PS20
1	Controle na concentração do PS20 alvo

Otimização de Método

[00293] Condições Tentadas Inicialmente:

[00294] Durante o curso do desenvolvimento do Método 1, uma série de diferentes condições experimentais foram avaliadas antes que a fase móvel final baseada em metanol fosse selecionada, com o objetivo de minimizar o impacto da interferência de proteína. Estes experimentos estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5: Breve Resumo de outras soluções tentadas (ácido fórmico na fase móvel, salvo indicação em contrário)

Solução Tentada	Resultados
Cartucho de proteção de troca aniônica fraca de modo misto (WAX) aclamado	Nenhuma maneira de otimizar rapidamente o método para este cartucho - o método de gradiente multidegrau (consulte a próxima seção) pode ter sido uma abordagem adequada, mas essa técnica não foi desenvolvida no momen-

Solução Tentada	Resultados
	to da avaliação do cartucho WAX.
Digestão com Pepsina para clivar o anticorpo - testar se os peptídeos seriam menos hidrofóbicos que as proteínas e reduzir a interferência de proteínas	A digestão com pepsina foi adicionada à preparação da amostra e não houve redução da interferência mostrada
Digestão com papaína para clivar o fármaco do ligante e o anticorpo em fragmentos - testar se a remoção do fármaco do ligante tornaria a proteína ADC menos hidrofóbica e reduziria a interferência de proteína	Digestão com papaína adicionada à preparação da amostra e sem redução da interferência mostrada
Método de precipitação abreviado - precipitar proteína com solvente orgânico, mas sem remover solvente orgânico antes da análise do sobrenadante	Observou-se interferência significativa quando o solvente orgânico permaneceu na amostra injetada.
Coluna POROS® A Proteína A em linha com o cartucho Oasis MAX para reter firmemente a proteína a montante da coluna de análise PS20 e eliminar a coeluição	O PS20 também é retido na coluna POROS® A e não pode ser eluído sem também eluir a proteína sob condições testadas
A coluna POROS® HS CEX em linha com o cartucho Oasis® MAX retém firmemente a proteína a montante da coluna de análise PS20 e elimina a coeluição	Sem alterar o método, a proteína liga-se à coluna POROS® HS e o PS20 pode ser analisado com precisão. No entanto, a proteína não pode ser eluída da coluna CEX com sal volátil - a coluna CEX não pode ser regenerada. Método não reprodutível. O uso de sal não volátil eluiu algumas proteínas do cartucho, mas resultou em contaminação significativa do detector.

Experimentos de Robustez do Método

[00295] A Tabela 6 e a Tabela 7 descrevem os produtos e cartuchos usados para testar a robustez do método em vários produtos.

TABELA 6: PRODUTOS TESTADOS AO COMPARAR A PRECISÃO DO MÉTODO EM NOVE CARTUCHOS

Produto (concentração de proteína)	Concentração alvo PS20 mg/ml	Concentração de PS20 testada (50% da meta)	Concentração dos padrões de PS20 usados (mg/ml)
A1 ADC (20 mg/mL)	0,4	0,2	0,2, 0,4, 0,6
A2 (60 mg/mL)	0,4	0,2	0,2, 0,4, 0,6
A3 (18,5 mg/mL)	0,2	0,1	0,1, 0,2, 0,3
A4 (21 mg/mL)	0,1	0,05	0,05, 0,1, 0,15

TABELA 7: LOTE SORVENTE E LOTES USADOS PARA TESTE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO

Número do Cartucho	Lote Sorvente#	Lote de Cartucho#	Sistema HPLC/ELSD
1	57	57333161	Águas/Varian
2	56	56331621	Agilent/Agilent
3	57	57333161	Agilent/Agilent
4	56	56331621	Agilent/Agilent
5	49	49321291	Agilent/Agilent
6	9	T30841	Agilent/Agilent
7	56	56330931	Águas/Varian
8	53	53323111	Águas/Varian
9	40	40390631	Águas/Varian
11	57	57333161	Agilent/Agilent

[00296] Robustez do Método nos Cartuchos:

[00297] A Tabela 8 descreve os cartuchos usados para avaliar a robustez do método em 12 padrões de referência (mostrados na Tabela 9) usando dois cartuchos diferentes: um que forneceu especificidade aceitável no Método 0 e outro que forneceu especificidade inaceitável no Método 0. Os números dos cartuchos fornecidos na Tabela 8 correspondem aos números fornecidos na Tabela 7.

TABELA 8: CARTUCHOS USADOS PARA ILUSTRAR A ROBUSTEZ DO MÉTODO EM VÁRIOS PRODUTOS

Cartucho	Desempenho	Lote Sorvente	# do lote	Sistema HPLC/ELSD
1	Aceitável	57	57333161	Agilent/Agilent
5	Inaceitável	49	49321291	Agilent/Agilent

TABELA 9: PAINEL PADRÃO DE REFERÊNCIA (INJEÇÕES DE 20 µL)

Produto	Padrões de PS20 usados (mg/ml)
A5	0,20, 0,40, 0,60
A2	0,20, 0,40, 0,60
A6 ADC	0,10, 0,20, 0,30

A7 ADC	0,10, 0,20, 0,30
A8 ADC	0,10, 0,20, 0,30
A1 ADC	0,10, 0,20, 0,30
A9 ADC	0,10, 0,20, 0,30
A10 ADC	0,05, 0,10, 0,15
A1	0,05, 0,10, 0,15
A10	0,05, 0,10, 0,15
A6	0,05, 0,10, 0,15
A8	0,05, 0,10, 0,15

Qualificação do Método

[00298] A qualificação do método foi concluída pela avaliação da linearidade, exatidão, precisão (incluindo precisão intermediária) e especificidade. A Tabela 10 descreve os instrumentos e cartuchos usados para precisão intermediária.

TABELA 10: CONDIÇÕES PARA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Dia	**Sistema (HPLC/ELSD)**	**Número do Cartucho (Tabela 7)**	**Analista**
1	Agilent 1200/ Agilent 380	1	1
2	Águas 2695/ Varian 380	5	1
3	Agilent 1200/ Agilent 380	7	2

RESULTADOS:

Otimização de Método

[00299] Experimentos com Gradiente Multidegrau:

[00300] Durante a avaliação das diferentes fases móveis, foi necessário um método para determinar se o polissorbato poderia ser completamente separado dos outros constituintes de uma formulação proteica típica. Para realizar esta análise, realizaram-se experimentos com gradiente multidegrau (Figura 1). Estes experimentos consistiram em equilibrar o cartucho com a fase móvel consistindo em ácido volátil a 2% (ácido fórmico, trifluoroacético ou acético) em 10% de solvente

orgânico, aumentando a concentração de solvente orgânico na fase móvel em etapas de 5% e mantendo a cada concentração durante 1 minuto para simular a etapa de lavagem do método de quantificação de PS20. Estas etapas de 5% foram repetidas até que 98% da fase móvel orgânica (+2% de ácido volátil) fosse alcançada. Um fluxo constante de 1 mL/min foi mantido durante este método. Estes experimentos foram realizados com uma amostra de proteína livre de PS20 para determinar a composição da fase móvel que eluiu completamente todos os constituintes da formulação diferente de PS20 e um padrão de PS20 em água para determinar a composição da fase móvel que começou a eluir as espécies de éster PS20. Estas duas concentrações de solvente orgânico de fase móvel foram comparadas para determinar se poderíamos encontrar uma composição de fase móvel ideal que separasse completamente os constituintes da matriz de proteína e os ésteres de polissorbato. Esta composição de fase móvel ideal seria utilizada durante a etapa de lavagem do modo analítico para remover qualquer proteína que possa ter sido retida no cartucho. O gradiente multidegrau era desejável em um gradiente linear por dois motivos. Primeiro, um gradiente linear não simula a etapa de lavagem do método, e segundo, é difícil determinar a composição discreta da fase móvel que causa a eluição de cada constituinte durante um gradiente linear.

[00301] Os experimentos com gradiente multidegrau revelaram que a concentração ideal de metanol para lavar a proteína do cartucho, mas reter as espécies de éster PS20, estava entre 40% e 50% (FIG. 1 e FIG. 2). Nota-se que 2% de ácido fórmico ainda estava em fase móvel. Ambas as etapas de 40% e 50% de metanol foram testadas e ambas eliminaram a interferência de proteína do A1 ADC. A área do pico de PS20 com lavagem de 40% de metanol foi em média 38% maior (n = 8) do que o pico de PS20 com lavagem de 50% de metanol. Portan-

to, 40% de metanol foi escolhido para melhorar a sensibilidade do PS20. A área do pico inferior com a lavagem a 50% pode indicar que alguns dos ésteres de PS20 menos hidrofóbicos eluíram durante a etapa de lavagem de proteína, mas esta possibilidade não foi investigada mais a fundo.

[00302] A FIG. 1 mostra um exemplo de uma sobreposição típica de gradiente degrau (produto livre de PS20 e padrão de PS20). Esta sobreposição ilustra que toda a proteína é eluída com 40% - 50% de metanol e os ésteres de PS20 começam a eluir a 50% de metanol. Observe que a válvula entre o HPLC e o ELSD está no modo de desvio durante o primeiro minuto da amostra de proteína para evitar a saturação do detector. Os múltiplos picos mostrados no padrão de PS20 podem muito provavelmente ser atribuídos às diferentes espécies de polissorbato que eluem do cartucho por ordem crescente de hidrofobicidade. Os diferentes picos de proteína que eluem a cada mudança de etapa não foram caracterizados. Esta sobreposição fornece uma maneira rápida de encontrar a concentração ideal de metanol para lavar a proteína do cartucho enquanto retém os ésteres de PS20.

[00303] O experimento com gradiente multidegrau foi repetida utilizando isopropanol para comparar a eluição das regiões da proteína e PS20 ao metanol. A FIG. 2 ilustra os diferentes perfis de eluição multidegrau de metanol e isopropanol para A1 ADC livre de PS20 e padrão de PS20 em dois cartuchos diferentes. O primeiro cartucho (traço 1) foi previamente avaliado; o primeiro cartucho funcionou normalmente com o Método 0 (traço 1), no entanto, o segundo cartucho não foi ideal (traço 2). O experimento com gradiente multidegrau com isopropanol mostrou que a concentração ideal de isopropanol na etapa de lavagem era de 20%. Isto é consistente com o Método 0, que utiliza uma lavagem de 20% de isopropanol entre 1 e 3,4 minutos. No entanto, a separação de proteína e de ésteres de PS20 com uma lavagem de isopropanol não foi consistente

em diferentes cartuchos e ilustra a variabilidade da interferência de proteína de cartucho para cartucho. Em certos cartuchos (por exemplo, o cartucho usado na FIG. 2), uma porção da proteína eluiu à mesma concentração de isopropanol que os ésteres de PS20. Este comportamento indicou que estes cartuchos particulares exibem uma quantidade significativa de interferência de proteína quando se quantifica PS20 com o método isopropanol e este efeito foi confirmado experimentalmente.

[00304] Em contraste com o painel inferior da FIG. 2, o painel superior demonstrou que o gradiente multidegrau de metanol em diferentes cartuchos eluiu consistentemente todas as proteínas pela etapa de metanol a 40% e ésteres de PS20 a partir de metanol a 50%, ilustrando uma janela de separação mais ampla da região de proteína para a região PS20 em comparação ao gradiente degrau de isopropanol. Este resultado indicou que a utilização de uma lavagem de 40% de metanol consistentemente separaria a proteína dos ésteres de PS20 e, assim, diminuiria a variabilidade da quantificação de PS20 entre os cartuchos.

[00305] Os experimentos com gradiente multidegrau foram utilizadas para avaliar rapidamente a separação de PS20 e proteína em diferentes cartuchos e composições de fase móvel (FIG. 1 e FIG. 2).

[00306] Esta abordagem determinou com sucesso as condições de lavagem para o ensaio PS20 e poderia potencialmente ser utilizada para avaliar a eficácia de uma etapa de lavagem para a separação de outros analitos utilizando diferentes cartuchos e fases móveis.

[00307] Planejamento da Experimento:

[00308] Um Planejamento de Experimento (DoE) fatorial completo de 2 níveis foi utilizado para otimizar o método PS20 modificado contendo ácido fórmico. Os parâmetros analisados foram os seguintes:

Concentração de metanol durante a etapa de lavagem (40%, 50%)

Duração da lavagem (1,8 min, 3,0 min)

Vazão (0,75 mL/min, 1,25 mL/min)

Massa de PS20 carregada (4 µg, 12 µg)

[00309] Observe que a etapa de "Lavagem" se refere a uma parte do método de HPLC em que a concentração orgânica é mantida constante para lavar qualquer proteína residual do cartucho. Além das permutações fatoriais completas de 2 níveis, foram testados pontos médios (45% de lavagem orgânica, 2,4 min de duração de lavagem, 1 mL/min de vazão, 8 µg PS20 de carga) no início e no final da sequência. Este experimento foi executado separadamente para três amostras: PS20 em água, A1 ADC livre de PS20 e PS20 em A1 ADC livre de PS20. Para a amostra A1 ADC livre de PS20, o parâmetro de carga PS20 não se aplica.

[00310] Os critérios utilizados para otimização foram os seguintes:

[00311] Minimizar a interferência de proteína no tempo de retenção do PS20 (somente para amostra A1 ADC livre de PS20)

[00312] Maximize a resolução entre a proteína e o pico do PS20 (para a amostra PS20 + A1 ADC)

[00313] Minimizar a largura do pico do PS20 a 10% da altura do pico (PS20 na amostra de água)

[00314] Maximizar a área do pico PS20 (PS20 na amostra de água)

[00315] Os resultados do DoE mostraram que todas as condições testadas eliminaram a interferência de proteínas. Nenhuma interferência de proteína foi observada ao injetar A1 ADC livre de PS20. Da mesma forma, verificou-se que a resolução entre os picos de proteína e PS20 foi maior que 3 para todos os casos, onde a resolução foi calculada pela seguinte equação (Equação 1):

Equação 1: Resolução

$$R = 1{,}18 * \left| \frac{t_{RefPico} - t_R}{W_{50\%,RefPico} + W_{50\%,R}} \right|$$

[00316] Onde t é o tempo de retenção de cada pico e $W_{50\%}$ é a lar-

gura do pico a 50% de altura.

[00317] Como nenhum efeito na interferência ou resolução de proteína foi observado para todas as condições testadas, a área e a largura do pico do PS20 foram otimizadas para sensibilidade e formato do pico. Um resumo do efeito da vazão, concentração de lavagem de metanol e tempo de lavagem na área e largura do pico PS20 é ilustrado na FIG. 3. O aumento da vazão diminuiu a largura do pico do PS20 e a diminuição da concentração de metanol de 50% para 40% na etapa de lavagem aumentou a área do pico de PS20 em 38%. Com uma lavagem de 50% de metanol, um pico de PS20 adicional eluiu durante a etapa de lavagem, em um tempo de retenção posterior às espécies PS20 não esterificadas, e suspeita-se que este pico adicional seja devido à eluição anterior dos ésteres PS20 menos hidrofóbicos. Os achados mais relevantes foram que a área do pico do PS20 diminui com o aumento da concentração de MeOH na fase de lavagem, e o aumento da vazão diminui a largura do pico.

[00318] Uma comparação entre as lavagens de 40% e 50% de metanol é ilustrada na FIG. 4. Este pico adicional de aproximadamente 1,8-3,5 minutos não estava presente com uma lavagem de 45% de metanol. Verificou-se que as cargas do PS20 testadas não tiveram efeito em nenhum dos critérios de avaliação. A menor concentração de lavagem de metanol (40%), maior vazão (1,25 ml/min) e tempo médio de lavagem (2,4 min) foram escolhidos como os parâmetros ideais para o Método 1. As condições finais escolhidas são mostradas na Tabela 3.

Experimentos de Robustez do Método

[00319] Uma vez determinada a concentração ideal de lavagem de metanol utilizando os experimentos de gradiente multidegrau, o Método 1 (ácido fórmico + metanol) foi testado quanto a melhorias relativamente ao Método 0 (ácido fórmico + isopropanol).

[00320] Robustez do Método nos Produtos

[00321] Para comparar ainda mais o impacto da interferência de proteínas entre o Método 1 (ácido fórmico + metanol) e o Método 0 (ácido fórmico + isopropanol), o PS20 foi quantificado em 12 padrões de referência diferentes usando 2 cartuchos. Os cartuchos foram escolhidos de modo que um cartucho (cartucho 1) fosse considerado aceitável, produzindo resultados precisos com o Método 0, e um cartucho (cartucho 5) foi considerado inaceitável devido aos altos níveis de interferência de proteína com o Método 0. O objetivo deste experimento foi demonstrar até que ponto o Método 1 diminuiu a variabilidade entre cartuchos "aceitáveis" e "inaceitáveis" para múltiplos produtos. A consistência da quantificação de PS20 utilizando cada método foi comparada nos cartuchos e nos padrões de referência descritos nos métodos da Tabela 8 e da Tabela 9, respectivamente.

[00322] Os padrões de referência e suas concentrações medidas de PS20 para cada método estão listados na Tabela 11. A precisão de cada método não foi calculada porque a concentração de PS20 listada no C de A para cada padrão de referência não pode ser tratada como um valor teórico como é feito no caso de amostras enriquecidas. Assim, a precisão de cada método não pode ser avaliada para esses padrões de referência.

TABELA 11: COMPARAÇÃO DE MÉTODOS: DIFERENÇAS ENTRE CARTUCHOS EM CONCENTRAÇÕES MEDIDAS DE PS20 PARA VÁRIOS PADRÕES DE REFERÊNCIA

	Número de cartucho 1 (Tabela 7)		**Número de cartucho 5 (Tabela 7)**		**Diferença em % absoluta do Método MeOH/FA* na quantificação de PS20**	**Diferença em % absoluta do Método IPA/FA* na quantificação de PS20**
Produto	**Método MeOH/FA* (mg/ml)**	**Método IPA/FA* (mg/ml)**	**Método MeOH/FA* (mg/ml)**	**Método IPA/FA* (mg/ml)**		
A5	0,168	0,164	0,161	0,940	3,93%	474,98%
A2	0,406	0,435	0,421	0,426	3,70%	2,04%
A6 ADC	0,211	0,235	0,207	0,259	1,89%	10,12%
A7 ADC	0,155	0,171	0,150	0,200	3,10%	16,90%
A8 ADC	0,146	0,169	0,141	0,190	3,76%	12,35%
A1 ADC	0,154	0,176	0,148	0,200	3,84%	13,65%
A9 ADC	0,210	0,238	0,203	0,263	2,91%	10,50%
A10 ADC	0,106	0,112	0,105	0,130	1,32%	16,24%
A1	0,084	0,087	0,085	0,094	1,08%	8,55%
A10	0,092	0,103	0,095	0,105	3,17%	2,14%
A6	0,093	0,105	0,091	0,105	2,58%	0,85%
A8	0,097	0,106	0,092	0,108	4,94%	2,08%

FA = Ácido fórmico

** A diferença em % absoluta na quantificação de PS20 para cada método é calculada pela Equação 2

[00323] Os dados na Tabela 11 mostram que a diferença na quantificação de PS20 entre os dois cartuchos utilizando metanol na fase móvel é consistentemente inferior a 5%. Em contraste, as diferenças na quantificação de PS20 ao usar isopropanol na fase móvel mostram um grau muito maior de variabilidade entre os cartuchos. O método 0 (ácido fórmico + isopropanol) é mais sensível à variação do cartucho. Os dados da Tabela 11 mostram que o uso de ácido fórmico + metanol na fase móvel produz quantificação mais consistente de PS20 em diferentes cartuchos para todos os produtos, independentemente de como o cartucho funciona no Método 0. A diferença em % absoluta na quantificação de PS20 foi calculada usando a Equação 2:

Equação 2: Diferença em % absoluta na quantificação de PS20

| 100*([Concentração no Cartucho 5] – [Concentração no Cartucho 1])/ [Concentração no Cartucho 1] |

Robustez do Método nos Cartuchos

[00324] O Método 0 e o Método 1 (ácido fórmico + metanol) foram comparados testando ambas as condições em nove cartuchos com quatro produtos. O PS20 foi adicionado à matriz de proteína livre de PS20 a 50% da concentração de formulação alvo de cada produto. Esta abordagem representou a menor concentração de PS20 que o ensaio precisaria quantificar para cada produto com base no certificado de aceitação de análise. Padrões e controles foram preparados adicionando PS20 à água. Dois sistemas HPLC/ELSD (Agilent 1200/Agilent 380 e Waters 2695/Varian 380) foram usados para teste. Os produtos e cartuchos testados são descritos em detalhes na seção de métodos, Tabela 6 e Tabela 7, respectivamente. Os cartuchos testados foram propositadamente escolhidos para cobrir uma ampla gama de lotes, idade e desempenho histórico.

[00325] Uma amostra de produto livre de PS20 e uma amostra enriquecida com PS20 foram testadas para avaliar a interferência de pro-

teína com o ensaio PS20 e a precisão da quantificação de PS20, respectivamente. As amostras A1 ADC, A2, A3 e A4 foram testadas em 9 cartuchos tanto com ácido fórmico + metanol quanto com ácido fórmico + isopropanol (Método 0). As recuperações médias, desvios padrão relativos e faixas em todos os cartuchos usando ambos os métodos são mostrados na Tabela 12.

TABELA 12: RECUPERAÇÃO E %RSD DA PS20 CONTAMINADOS COM PROTEÍNA LIVRE DE PS20 EM NOVE CARTUCHOS WATERS OASIS® MAX.

Amostra		**2% de ácido fórmico + MeOH**	**2% de ácido fórmico + IPA**
0,2 mg/ml de PS20 em 20 mg/ml de A1 ADC	Recuperação Média (%)	96%	127%
	% de RSD	3,0%	39,4%
	Faixa (recuperação mínima - recuperação máxima)	92% - 101%	100% - 257%
0,2 mg/ml de PS20 em 60 mg/ml de A2	Recuperação Média (%)	103%	145%
	% de RSD	6,7%	35,6%
	Faixa (recuperação mínima - recuperação máxima)	86% - 110%	110% - 264%
0,05 mg/ml de PS20 em 20 mg/ml de A4	Recuperação Média (%)	110%	168%
	% de RSD	10,6%	64,2%
	Faixa (recuperação mínima - recuperação máxima)	87% - 133%	98% - 449%
0,1 mg/ml de PS20 em 18,5 mg/ml de A3	Recuperação Média (%)	122%	161%
	% de RSD	10,6%	30%
	Faixa (recuperação mínima - recuperação máxima)	95% - 144%	105% - 272%

[00326] A Tabela 12 ilustra que o uso de metanol na fase móvel melhora a precisão da quantificação de PS20 (recuperações médias estão mais próximas de 100%) e reduz a variabilidade entre cartuchos (%RSD são reduzidas). Estes dados mostram que o uso de metanol em vez de isopropanol na fase móvel funciona particularmente bem para quantificação de PS20 em formulações A1 ADC e A2. Excessivas recuperações de PS20 na formulação A4 podem ser devidas a uma diminuição da relação sinal/ruído com apenas 1 µg de PS20 carregado no cartucho (20 µL de injeção, 0,05 mg/mL de concentração de PS20). As cargas aumentadas de PS20 (injeção de 50 µL) foram usadas durante a qualificação do método de R&D (ácido fórmico + metanol), e não foi observada recuperação excessiva.

[00327] A recuperação excessiva de A3 foi observada quando se utilizou metanol na fase móvel, no entanto, esta ainda era uma melhoria em relação à fase móvel de isopropanol. Tem-se a hipótese de que o baixo pI desta molécula, que é devido, em parte, à abundância aumentada de grupos de ácido siálico em suas glicanos, causa retenção da proteína por atração eletrostática no grupo amina quaternário positivamente carregado da fase estacionária.

Otimização de Método Adicional

Seleção de ácido de fase móvel

[00328] As experiências foram realizadas usando gradientes degrau com a fase móvel à base de metanol e diferentes ácidos orgânicos de fase móvel para determinar o melhor aditivo para o método no que diz respeito a minimizar a interferência da proteína. Foram efetuados experimentos com gradiente degrau de metanol com A1 ADC livre de PS20 e A10 ADC livre de PS20 utilizando ácidos fórmico, acético ou trifluoroacético com detecção de ELSD para monitorar o impacto do ácido na eluição da proteína. Padrões de PS20 em água foram usados para monitorar a retenção de PS20.

[00329] A alteração do aditivo da fase móvel forneceu informações sobre como a proteína é retida no cartucho. As FIGS. 5, 6 e 7 mostram sobreposições de gradiente multidegrau de metanol de ADC livre de PS20 e padrões de PS20 com ácido trifluoroacético, ácido fórmico e ácido acético, respectivamente, na fase móvel. Para todos os aditivos de fase móvel, os ésteres de PS20 começam a eluir a 50% de metanol. A FIG. 5 mostra o A10 ADC livre de PS20 e o padrão de PS20 com ácido trifluoroacético na fase móvel. A eluição da proteína foi completada a aproximadamente 80% de metanol. Assim, muito da proteína iria co-eluir com os ésteres PS20 e interferir com a quantificação de PS20. A FIG. 6 mostra o A1 ADC livre de PS20 e o padrão de PS20 com ácido fórmico na fase móvel. A proteína eluiu completamente a cerca de 40% de metanol, indicando que uma lavagem de metanol a 40% separaria a proteína do polissorbato. Este resultado foi consistente com o Método 1 que foi desenvolvido. A FIG. 7 mostra o A1 ADC livre de PS20 e o padrão de PS20 com ácido acético na fase móvel. Neste caso, a proteína foi completamente eluída com 15% de metanol. Esta descoberta indica que a proteína pode ser separada dos ésteres de PS20 por qualquer lavagem de metanol variando entre 15% e 50%. A força de emparelhamento de íons destes aditivos da fase móvel foi a seguinte: ácido trifluoroacético > ácido fórmico > ácido acético. Correspondentemente, a proteína foi retida mais fortemente com o aumento da força do agente de emparelhamento de íons na fase móvel, como seria esperado se a proteína estivesse se ligando via interações hidrofóbicas com a fase estacionária de fase reversa.

[00330] Sem estar limitado pela teoria, o baixo pH da fase móvel ácida cria uma carga líquida positiva na proteína. A interação da proteína positivamente carregada com a fase estacionária Oasis® MAX carregada positivamente deve ser desfavoravelmente de forma coulomb, levando a proteína a não ser retida pela fase estacionária. Em contras-

te, o aditivo da fase móvel de emparelhamento de íons pode interagir com a proteína para efetivamente fazer a proteína mais hidrofóbica (Xindu, G., & Regnier, FE *Journal of Chromatography A*, 296: 15-30, 1984). Essa interação faria com que a proteína se retivesse no cartucho por um mecanismo de interação hidrofóbica com um agente de emparelhamento de íons suficientemente forte (*por exemplo*, como o TFA). A redução da força do agente de emparelhamento de íons na fase móvel reduziria subsequentemente a interação entre a proteína e a fase estacionária. Como o agente de emparelhamento de íons mais fraco dos três testados, o ácido acético na fase móvel parece reduzir significativamente a retenção de proteína no cartucho. Assim, o ácido acético como um aditivo de fase móvel permitiu uma melhor separação entre a proteína e os ésteres de PS20 do que os outros aditivos que foram testados.

[00331] A FIG. 8 mostra uma comparação do desempenho do método analítico entre o ácido acético e o ácido fórmico como aditivos da fase móvel. Como visto na FIG. 8, um aumento muito pequeno (~3 mV) na linha de base é observado para injeções de proteína em comparação com a injeção de água com ácido fórmico como aditivo da fase móvel. Embora essa interferência seja considerada mínima, observa-se que uma injeção de matriz de proteína não aumenta a linha de base do ELSD quando o ácido acético é o aditivo na fase móvel. Além disso, a absorvência a 280 nm foi monitorizada para fins de diagnóstico, a fim de observar a retenção e a eliminação de proteínas. Quando se utiliza ácido acético na fase móvel, a proteína é quase totalmente eliminada no volume vazio, ao passo que a proteína retida é fracamente no cartucho quando o ácido fórmico é utilizado como aditivo e elui a um tempo de retenção entre 1-2 minutos. Como o fluxo de LC é desviado para o ELSD em 2,4 minutos, há uma chance maior de que a proteína não seja completamente eliminada quando o ácido fórmico for o

aditivo, permitindo alguma interferência de proteína.

[00332] Cromatogramas representativos utilizando diferentes cartuchos (consulte a Tabela 7 para pormenores específicos do lote) a partir das condições de eluição do ácido acético + metanol são mostrados na FIG. 9. Embora a forma do pico do cartucho 1 seja típica (traço 1), esses dados demonstram que os perfis de pico do PS20 podem variar entre os diferentes cartuchos. Em certos cartuchos, como o cartucho 4 (traço 2), o pico do PS20 tende a alargar; com o uso adicional deste cartucho, o alargamento pode eventualmente tornar-se uma divisão de pico do PS20 (traço 3). Este comportamento não tem sido comum, uma vez que o cartucho 2 (dados não mostrados) e 4 são os únicos cartuchos testados que exibiram divisão de pico ao longo do desenvolvimento do método. Em outros casos, como o cartucho 5 (traço 4), observa-se um pequeno alargamento de pico. Incidentalmente, os cartuchos que apresentam aumento do alargamento de pico e divisão de pico com a fase móvel de metanol também estão sujeitos a níveis aumentados de interferência de proteína quando o isopropanol é usado na fase móvel. Essa descoberta pode indicar que os cartuchos que mostram aumento no alargamento de pico retêm mais fortemente as moléculas hidrofóbicas. Independentemente da forma do pico, os métodos de quantificação e integração do PS20 não foram afetados.

[00333] Um Método 1 final para quantificação de PS20 será implementado com 2% de ácido acético na fase móvel, já que mostrou que melhora a separação de proteína e PS20 em relação ao ácido fórmico no cartucho Oasis® Max (FIG. 9).

Qualificação do Método

[00334] Depois de usar experimentos com gradiente degrau para otimizar a etapa de lavagem e realizar experimentos de robustez de método, verificou-se que usar 2% de ácido acético em vez de 2% de ácido fórmico na fase móvel melhorou a separação de proteína e éste-

res de PS20. Portanto, este exemplo descreve experimentos de qualificação realizados com uma fase móvel de ácido fórmico/metanol (a partir do desenvolvimento do método inicial) e uma fase móvel de ácido acético/metanol (método final).

[00335] O método usado para qualificar o ensaio foi consistente com o ensaio HPLC-ELSD no Método 0, exceto pelos seguintes parâmetros:

[00336] Vazão = 1,25 mL/min.

[00337] Fase móvel A = 2% de ácido fórmico em água OU 2% de ácido acético em água

[00338] Fase móvel B = 2% de ácido fórmico em metanol OU 2% de ácido acético em metanol

[00339] O gradiente na Tabela 3 foi usado

[00340] O volume de injeção foi ajustado dependendo da concentração de PS20 na formulação para resultar em cargas semelhantes no cartucho. Ver Tabela 13.

[00341] O estudo de qualificação foi realizado com A1 ADC livre de PS20, A1 livre de PS20, A4 livre de PS20, A5 livre de PS20 e A11 livre de PS20. Uma quantidade conhecida de PS20 foi adicionada a cada amostra para determinar a precisão do ensaio. O ensaio (consulte a Tabela 13 quanto ao aditivo usado por produto) foi avaliado quanto à precisão, precisão, especificidade, repetibilidade e precisão intermediária.

[00342] Exatidão e Precisão:

[00343] O PS20 (Lote MKBL2646V) foi misturado em amostras de proteína livres de PS20 em concentrações conhecidas (dependente do produto; ver Tabela 13) para determinar a precisão do ensaio. Este experimento foi realizado utilizando uma solução mãe de PS20 de alta concentração (25 mg/mL), de modo que a diluição da proteína por acréscimo foi minimizada. Para cada concentração, amostras injetadas

com PS20 foram injetadas em triplicado, a menos que indicado de outra forma. A recuperação do PS20 foi usada para determinar a precisão da quantificação do PS20. A faixa de recuperações médias foi usada para determinar a precisão. A linearidade na faixa especificada (Tabela 13) também foi determinada. A Tabela 13 mostra as concentrações de PS20 misturadas em cada produto. Note que foram utilizados 2 faixas de DNIB0600S para cobrir o pior cenário no que se refere à (ou seja, a mais baixa) concentração de PS20 (0,4 mg/ml) e uma concentração mais elevada (0,7 mg/ml) antes do bloqueio da formulação da Fase III. Foram utilizadas duas faixas separadas porque os ajustes do ELSD precisariam ser alterados para quantificar com precisão o PS20 em uma faixa de 0,2 mg/ml - 1 mg/ml de PS20. Para cada faixa, o volume de injeção foi alterado, em vez de alterar as configurações do detector. Após o fechamento da formulação, outra avaliação foi realizada para a formulação final (1,2 mg/mL de PS20) e uma concentração de proteína mais elevada (40 mg/mL) usando uma única faixa.

TABELA 13: PRODUTOS AVALIADOS DURANTE A QUALIFICAÇÃO DO MÉTODO

Produto (Concentração de proteína)	**Faixa de Concentração de PS20 (mg/mL)**	**Volume de Injeção (µL)**	**Faixa de Carga de PS20 (µg)**	**Qualificação com ácido fórmico ou ácido acético**
A1 ADC (20 mg/mL)	0,20 – 0,60	20	4,0 – 12,0	Ácido fórmico
A1 ADC (20 mg/mL)	0,50 – 1,00	10	5,0 – 10,0	Ácido fórmico
A1 ADC (40 mg/mL)	0,60 – 1,60	10	6,0 – 16,0	Ácido Acético
A1 (20 mg/mL)	0,025 – 0,30	50	1,3 – 15,0	Ácido fórmico
A1 (50 mg/mL)	0,025 – 0,30	50	1,3 – 15,0	Ácido Acético
A4 (21 mg/mL)	0,025 – 0,30	50	1,3 – 15,0	Ácido fórmico
A5 (60 mg/mL)	0,20 – 0,60	20	4,0 – 12,0	Ácido Acético
A11 (83 mg/mL)	0,10 – 0,30	25	2,5 - 7,5	Ácido Acético
A4 TAC (65 mg/mL)*	0,10 – 0,30	50	5,0 – 15,0	Ácido Acético
A12/A13 (73 mg/mL)*	0,10 – 0,30	50	5,0 – 15,0	Ácido Acético
A14/A15 (150 mg/mL)*	0,15 – 0,45	20	3,0 - 9,0	Ácido Acético

Injeções duplicadas em três concentrações de PS20

[00344] Padrões para cada conjunto de concentrações foram feitos a partir do PS20 em água. Os padrões foram injetados em duplicado antes das amostras de proteína. Cada 6ª injeção do artigo de teste foi agrupada com uma amostra de controle de PS20 em água. O controle de PS20 foi preparado separadamente dos padrões (do Lote MKBJ7237V do PS20). As concentrações de padrões foram escolhidas para cobrir a faixa de concentrações de PS20 que foram adicionadas a cada produto proteico livre de PS20.

[00345] As concentrações dos controles de PS20 foram escolhidas com base nas concentrações possíveis ou reais de PS20 para a formulação de cada substância farmacêutica de cada produto. A Tabela 14 mostra as concentrações das amostras padrão e de controle PS20 usadas para a análise em cada faixa de concentração.

TABELA 14: CONCENTRAÇÕES DE PS20 USADAS PARA CURVA PADRÃO E CONTROLE PARA CADA PRODUTO

	Concentração de PS20 (mg/ml)			
Produto (concentração de proteína)	**Padrão 1**	**Padrão 2**	**Padrão 3**	**Controle**
A1 ADC (20 mg/mL)*	0,10	0,40	0,70	0,40
A1 ADC (20 mg/mL)*	0,50	0,75	1,00	0,70
A1 ADC (40 mg/mL)**	0,60	1,20	1,60	1,20
A1 (20 mg/mL)	0,05	0,15	0,30	0,10
A1 (50 mg/mL)	0,05	0,15	0,30	0,10
A4 (21 mg/mL)	0,05	0,15	0,30	0,10
A5 (60 mg/mL)	0,20	0,40	0,60	0,40
A11 (83 mg/mL)	0,10	0,20	0,30	0,20
A4 TAC (65 mg/mL)	0,10	0,20	0,30	0,10
A12/A13 (73 mg/mL)	0,10	0,20	0,30	0,10
A14/A15 (150 mg/mL)	0,15	0,30	0,45	0,30

[00346] A exatidão e precisão do Método 1 foram testadas para vários produtos. Resultados aceitáveis para precisão devem mostrar que a recuperação média em cada concentração adicionada é de 80% - 120%. Os resultados para cada produto são mostrados na Tabela 15.

TABELA 15: MÉDIA E FAIXA DE % DE RECUPERAÇÃO

Produto (mg/mL)	**Ácido de Fase Móvel (ácido fórmico ou acético)**	**Inj. Vol. (µL)**	**Faixa de conc, de PS20 (mg/mL)**	**Número de Replicados por conc, (n)**	**% de Recuperação média em todas as concentrações do PS20**	**Faixa de % de Recuperação**
A1 ADC (20)	Ácido fórmico	20	0,20 – 0,60	3	101,6	95,7 – 106,2
A1 ADC (20)	Ácido fórmico	10	0,50 – 1,00	3	101,2	97,7 – 108,3
A1 ADC (40)	Ácido Acético	10	0,60 – 1,60	3	105,0	101,3 – 106,4
A1 (20)	Ácido fórmico	50	0,025 – 0,30	3	92,5	86,4 – 97,3
A1 (50)	Ácido Acético	50	0,025 – 0,30	3	106,1	100,0 – 114,0
A4 (21)	Ácido fórmico	50	0,025 – 0,30	3	93,1	82,4 – 99,2
A5 (60)	Ácido Acético	20	0,20 – 0,60	2	102,5	100,5 – 105,7
A11 (83)	Ácido Acético	25	0,10 – 0,30	2	108,3	100,5 – 114,8
A4 TAC (65)	Ácido Acético	50	0,10 – 0,30	2	107,4	103,0 – 112,8
A12/A13 (73)	Ácido Acético	50	0,10 – 0,30	2	104,7	99,8 – 110,5
A14/A15 (150)	Ácido Acético	20	0,15 – 0,45	2	101,5	95,1 – 110,4

[00347] Como mostra a Tabela 15, a % de Recuperação média para todos os produtos testados, em todas as concentrações, atendeu aos critérios de aceitação (80% - 120%) e variou de 82,4% a 114,8%. Portanto, este ensaio demonstrou exatidão e precisão aceitáveis para todos os produtos nas faixas de PS20 testadas.

[00348] Como os volumes de injeção variaram, a faixa de ensaio também pode ser expressa em termos de massa

de PS20 (ao invés de concentração de PS20 na formulação). Estes resultados mostraram que 1,25 (0,025 µg/µl x 50 µl) - 16 µg (1,60 µg/µl x 10 µl) de PS20 podem ser carregados no cartucho e quantificados com precisão.

Linearidade

[00349] A linearidade foi avaliada pela determinação do coeficiente de correlação de Pearson (r) > 0,99. Estes valores são mostrados na Tabela 16 para cada faixa de concentrações de PS20.

TABELA 16: COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON SOBRE AS FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO DO PS20

Produto	**Ácido de Fase Móvel (ácido fórmico ou acético)**	**Conc, de PS20 Faixa (mg/ml)**	**Correlação de Pearson coeficiente (r)**
A1 ADC	Ácido fórmico	0,20 – 0,60	0,997
A1 ADC	Ácido fórmico	0,50 – 1,00	0,995
A1 ADC	Ácido Acético	0,60 – 1,60	1,000
A1	Ácido fórmico	0,025 – 0,30	1,000
A1	Ácido Acético	0,025 – 0,30	1,000
A4	Ácido fórmico	0,025 – 0,30	1,000
A5	Ácido Acético	0,20 – 0,60	0,999
A11	Ácido Acético	0,10 – 0,30	0,995
A4 TAC	Ácido Acético	0,10 – 0,30	1,000
A12/A13	Ácido Acético	0,10 – 0,30	1,000
A14/A15	Ácido Acético	0,15 – 0,45	0,994

[00350] Todos os valores do coeficiente de correlação de Pearson foram ≥0,99 para as faixas de PS20 testadas. Portanto, a linearidade foi aceitável para este ensaio em vários produtos.

Especificidade:

[00351] A especificidade foi determinada para nove produtos confirmando que injeções de tampão de formulação livre de PS20 e produto livre de PS20 não contribuiriam para o pico de PS20. As injeções para o tampão de formulação e a amostra de proteína livre de PS20 foram realizadas em duplicado. As áreas de pico em tampão de formulação livre de PS20 e matrizes de proteína livre de PS20 foram comparadas com a resposta de um padrão a 50% da concentração de PS20 alvo de cada produto. Os critérios de aceitação são preenchidos se as áreas de pico nas amostras livres do PS20 forem ≤ 10% da área do pico no padrão mais baixo. Quando havia alguma interferência de proteína visível na região PS20, a seguinte equação foi usada para derivar uma estimativa numérica da especificidade:

Equação 3: Cálculo de Especificidade

Especificidade = (área de proteína livre de PS20/área de 50% da especificação PS20)*100

[00352] Como mostrado na FIG. 10 (com A1 ADC), nem o tampão de formulação livre de PS20 nem a amostra de proteína livre de PS20 interferem com o pico de PS20. Os valores de especificidade para todos os outros produtos são fornecidos na Tabela 17. Como a concentração alvo de PS20 foi escolhida para o A1 ADC após os experimentos de qualificação do método do ácido fórmico, utilizou-se uma concentração de PS20 alvo mais baixa para calcular a especificidade para as amostras (denotada com um asterisco). Usar uma concentração alvo de PS20 menor resultará em um valor de especificidade mais alto, mas todos os valores relatados ainda estarão bem abaixo de 10%.

TABELA 17: ESPECIFICIDADE

Produto	**Ácido de Fase Móvel (ácido fórmico ou ácido acético)**	**Concentração alvo de PS20 (mg/ml)**	**Especificidade (%)**
A1 ADC	Ácido fórmico	1,2	0,7
A1 ADC	Ácido fórmico	1,2	0,5
A1 ADC	Ácido Acético	1,2	N/A
A1	Ácido fórmico	0,1	1,1
A1	Ácido Acético	0,1	8,6
A4	Ácido fórmico	0,1	1,6
A5	Ácido Acético	0,4	1,5
A11	Ácido Acético	0,2	5,4
A4 TAC	Ácido Acético	0,2	2,5
A12/A13	Ácido Acético	0,2	8,2
A14/A15	Ácido Acético	0,3	5,6

N/A: Injeção de proteína livre de PS20 é o mesmo que injeção de água.

Repetibilidade:

[00353] As amostras contendo 0,4 mg/mL de PS20 adicionadas a 20 mg/mL de A1 ADC livre de PS20 e 0,3 mg/mL de PS20 adicionadas a 150 mg/mL de A14/A15 livres de PS20 foram injetadas 6 vezes. As áreas de pico do PS20 para essas injeções e concentrações correspondentes são mostradas na Tabela 18. A %RSD para a área e as concentrações para as injeções repetidas demonstraram repetibilidade aceitável da injeção.

TABELA 18: REPETIBILIDADE DA INJEÇÃO

	0,4 mg/mL PS20 em A1 ADC (ácido fórmico)	**0,3 mg/mL de PS20 em mAb biespecífico de A14/A15 (ácido acético)**
Injeção #	**Área (mV * min)**	**Área (mV * min)**
1	73,64	54,90
2	75,17	55,10
3	74,30	55,00
4	73,35	54,60
5	73,65	53,70
6	73,81	54,20

Média	**73,99**	**54,58**
DP	**0,66**	**0,54**
%RSD	**0,89%**	**0,99%**

[00354] A %RSD para a área e as concentrações para as injeções repetidas demonstraram a repetibilidade do teste.

Precisão Intermediária:

[00355] A precisão intermediária (somente ácido fórmico + metanol) foi determinada para três cartuchos, em dois diferentes sistemas HPLC-ELSD, com três preparações de tampão e padrão de PS20 diferentes e por dois analistas diferentes. Para cada amostra em cada dia, a média de 2 injeções é relatada na Tabela 19. A média e o desvio padrão de todas as injeções são relatados na parte inferior da Tabela 19. As amostras injetadas foram 0,4 mg/mL de PS20 adicionadas a 20 mg/mL de A1 ADC livre de PS20, 0,1 mg/mL de PS20 adicionadas a A1 livre de PS20 e 0,1 mg/mL de PS20 adicionadas a A4 livre de PS20. As condições para cada dia são mostradas na Tabela 10 na seção de métodos. A precisão intermediária foi feita usando ácido fórmico antes que o ácido acético fosse finalizado como o modificador do Método 1. A precisão intermediária não foi repetida com o ácido acético na fase móvel, uma vez que todos os outros parâmetros da qualificação foram comparáveis entre os dois modificadores e porque a preparação da amostra era idêntica para ambas as condições.

[00356] A %RSD para todas as três amostras na precisão intermediária de teste de 3 dias foi inferior a 10%. Estes resultados mostram que o ensaio foi consistente para vários cartuchos, preparações de amostras, sistemas HPLC-ELSD e analistas. Houve uma tendência ligeiramente menor observada para as concentrações no Dia 2.

TABELA 19: PRECISÃO INTERMEDIÁRIA (TODAS OS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM ÁCIDO FÓRMICO)

Dia (no. do instrumento)	Número do Cartucho (da Tabela 7)	A1 ADC: 0,4 mg/ml de PS20	A1: 0,1 mg/ml de PS20	A4: 0,1 mg/ml de PS20
1 (instrumento 1)	1	0,418	0,097	0,099
2 (instrumento 2)	5	0,389	0,087	0,092
3 (instrumento 1)	7	0,411	0,100	0,097
Média		**0,406**	**0,095**	**0,096**
DP		**0,0138**	**0,0073**	**0,0058**
%RSD		**3,39%**	**7,74%**	**6,04%**

CONCLUSÕES**:**

[00357] As seguintes modificações foram feitas no ensaio do Método 0 de ELSD durante o desenvolvimento da nova versão do método:

A fase móvel B mudou de isopropanol para metanol

O aditivo mudou de ácido fórmico a 2% para ácido acético a 2%

A concentração de produto orgânico na etapa de lavagem de 1 a 3,4 minutos mudou de 20% para 40% da fase móvel B

A vazão foi alterada de 1,00 ml/min para 1,25 ml/min

[00358] Coletivamente, essas modificações reduziram significativamente a interferência de proteínas e a variabilidade do desempenho do cartucho para o cartucho. A mudança da fase móvel B orgânica de isopropanol para metanol (FIG. 2) melhorou a separação de proteína e PS20 em comparação com as condições anteriores. Os resultados dos experimentos de comparação entre metanol/FA e isopropanol/FA (Tabela 11 e Tabela 12) mostraram que o Método 1 melhorou significativamente a quantificação de PS20 e a reprodutibilidade de cartucho para cartucho. A substituição de ácido fórmico com ácido acético (FIG. 8) como aditivo da fase móvel reduziu ainda mais a retenção de proteína no cartucho. Além disso, mudar a etapa de lavagem orgânica de 20% para 40% minimizou significativamente a interferência de proteína.

[00359] Os resultados da qualificação deste ensaio modificado para múltiplos produtos mostraram que este ensaio foi adequado para quantificar PS20 através de uma variedade de formatos de moléculas,

concentrações de proteína e concentrações de PS20, indicando assim que o Método 1 é um candidato para um ensaio de quantificação de PS20 de plataforma.

Exemplo 2. Desenvolvimento de um Método de Quantificação de Polissorbato 20 HPLC-ELSD para Formulações Contendo N-Acetil Triptofano

[00360] Ao longo da avaliação do método PS20 descrito acima (Método 1), foi descoberto que o N-acetil triptofano (NAT) interfere significativamente com o polissorbato 20 (PS20) quando presente como um excipiente adicional na formulação. Embora o Método 1 do Exemplo 1 tenha mostrado a minimização da interferência de proteínas e a diminuição da variabilidade entre os cartuchos para a maioria das formulações testadas, o N-acetil triptofano foi retido no cartucho sob as condições deste método e eluído no mesmo tempo de retenção que o PS20. Sem estar limitado pela teoria, o NAT pode ser retido no cartucho devido à presença de um grupo carboxilato na molécula que interage com o cartucho de resina de troca aniônica de modo misto (MAX) usado no Método 1.

[00361] Conforme descrito abaixo, o Método 1 foi modificado para eliminar a interferência de NAT ao:

mudar o cartucho da resina MAX para uma resina de troca catiônica de modo misto (MCX)

mudar o aditivo da fase móvel de ácido acético para hidróxido de amônio

[00362] Adicionalmente, a otimização adicional do método, também referida como Método 2, foi realizada aumentando a lavagem orgânica de 40%B para 45%B e aumentando o tempo da etapa de lavagem e o tempo da etapa de eluição em +1 minuto e +2 minutos, respectivamente. O desenvolvimento das condições para permitir a quantificação de PS20 para projetos formulados com NAT é descrito neste exemplo. As

novas condições foram avaliadas utilizando três produtos contendo NAT na formulação, avaliando o Método 2 para exatidão, precisão, linearidade, especificidade, repetibilidade e robustez.

[00363] Ensaios de LC-ELSD anteriores que usaram o cartucho MAX observaram uma maior interferência de proteína com moléculas pI baixas. Portanto, a avaliação de moléculas pI baixas foi realizada no Método 1 e no Método 2 para determinar qual método é mais adequado para a quantificação correta do PS20.

MATERIAIS

Sistema HPLC/ELSD: *por exemplo*, Agilent 1200 HPLC - Varian 380 ELSD

Polissorbato 20: Sigma P/N: T2700-100ML

Ácido Acético Glacial de grau HPLC: JT Baker

Solução Forte de Amônia, 27-31%: Spectrum Chemicals

Água de grau HPLC HoneyWell

Metanol de grau HPLC: OmniSolv

Cartucho Waters Oasis® MAX 2,1 x 20 mm, tamanho de partícula de 30 µm

Cartucho Waters Oasis® MCX 2,1 x 20 mm, tamanho de partícula de 30 µm (Tabela 20)

Produtos contendo NAT (Tabela 21)

TABELA 20: CARTUCHOS MCX USADOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO 2

Número do Cartucho	**Lote Sorvente #**	**Lote de Cartucho #**
1	0093	0093333511
2	0093	0093341961
3	0093	0093341961
4	0093	0093341961
5	0102	0102342141
6	0103	0103342141

TABELA 21: INFORMAÇÕES DO PRODUTO

Produto	**Concentração Nominal de Proteína (mg/mL)**	**Formulação**	**PS20 alvo (mg/mL)**
A16/A17 livre de PS20	80	20mM de His-HCl, 1mM de NAT, 5mM de Met, 240mM de Sacarose, pH 5,5	0,2
A16/A17	80	0,2 mg/mL de PS20, 20 mM de His-HCl, 1 mM de NAT, 5 mM de Met, 240 mM de Sacarose, pH 5,5	0,2
A18/A19 livre de PS20	150	200 mM de ArgSuccinato, 20 mM de His, 0,3 mM de NAT, 5 mM de Met, pH 5,8	0,2
A18/A19	150	0,2 mg/mL de PS20, 20 mM de His-HCl, 1 mM de NAT, 5 mM de Met, 240 mM de Sacarose, pH 5,5	0,2
A14/A20 livre de PS20	150	20 mM de His-Ace, 0,3 mM de NAT, 5 mM de Met, 240 mM de sacarose, pH 6,0	0,2

MÉTODOS:

[00364] A intensidade da fonte de luz (LED) de ELSD foi ajustada para 75% e o ganho do detector (PMT) foi ajustado para 1 para todos os experimentos. Um resumo das modificações finais do método para tornar o ensaio compatível com as formulações contendo NAT é o seguinte:

Agilent 1200 HPLC (ou equivalente) e Varian 380 ELSD (ou equivalente)

Cartucho: Cartucho on-line Waters Oasis® MCX

Fase Móvel A: 1,5% de hidróxido de amônio em água

Fase móvel B: 1,5% de hidróxido de amônio em metanol

Vazão: 1,40 mL/min.

Regulagem da Válvula de Desvio: Fluxo para o ELSD aos

4,00 min

Volume de injeção: 25* µL (*dependente do produto)

TABELA 22: GRADIENTE DO MÉTODO DE PS20 MODIFICADO (MÉTODO 2)

Tempo (min)	% da Fase móvel A	% da Fase móvel B	Descrição da Etapa
0	90	10	Carga
1	55	45	Lavagem
4,4	55	45	Lavagem
4,5	0	100	Eluição
7,6	0	100	Eluição
7,7	90	10	Equilibrar
9,6	90	10	Equilibrar

RESULTADOS:

Determinação de Interferência

[00365] O foco inicial do desenvolvimento do método foi determinar se o NAT era a fonte da interferência observada nos ensaios anteriores. Este trabalho foi conduzido estudando uma série de tampões que continham NAT ou o excluíam (detalhes do tampão fornecidos na seção Materiais (Tabela 21) e na seção Resultados (Tabela 23)).

[00366] O tampão de formulação A16/A17 livre de PS20 (20 mM de histidina-HCl, 1 mM de NAT, 5 mM de metionina, 240 mM de sacarose, pH 5,5) e o A16/A17 livre de PS20 na concentração alvo (nominal = 80 mg/mL), foram inicialmente avaliados usando o Método 1 do Exemplo 1. A composição de cada amostra é fornecida abaixo:

[00367] Tampão de formulação livre de PS20 - 20 mM de histidina-HCl, 1 mM de NAT, 5 mM de metionina, 240 mM de sacarose, pH 5,5.

[00368] Amostra de A16/A17 livre de PS20 - 80 mg/mL (nominal) em 20 mM de histidina-HCl, 1 mM de NAT, 5 mM de metionina, 240 mM de sacarose, pH 5,5.

[00369] A FIG. 11A apresenta os resultados do ELSD desta avaliação, nos quais foi observada interferência significativa no ELSD no tempo de retenção de PS20 (~4,5 minutos) para ambas as amostras.

São apresentadas injeções de água (traço 1), tampão de formulação livre de PS20 (traço 2) e amostra de proteína livre de PS20 (traço 3). Adicionalmente, a FIG. 11B mostra o sinal UV (280 nm) para cada amostra, onde um componente é detectado no tempo de retenção aproximado de PS20. Como a magnitude da interferência observada quando a formulação livre de PS20 foi injetada foi aproximadamente a mesma que a amostra de proteína, ficou aparente que a fonte não poderia ser apenas devido à proteína e nos levou à hipótese de que havia um excipiente no tampão sendo retido pelo cartucho.

[00370] Determinamos que o n-acetil triptofano (NAT) foi o interferente observado nas FIGS. 11A e 11B pelas seguintes razões 1) As formulações contendo NAT não tinham sido testadas anteriormente com o Método 1, por conseguinte isto sobressaiu como uma diferença chave em relação a avaliações anteriores; 2) o NAT tem um pKa aparente de 4,1 e possui um grupo carboxilato que pode fazer com que retenha a resina catiônica de amônio do cartucho MAX na sua forma aniônica desprotonada; e 3) o máximo de absorvência de NAT é próximo de 280 nm (H. Edelhoch, *Biochemistry, vol. 6,* n. 7, julho de 1967), e foi observada absorvência de 280 nm no tempo de retenção de PS20 (~4,3 minutos) com amostras de formulação NAT (FIG. 11B).

[00371] Para confirmar que o NAT estava interferindo com o PS20, como descrito acima, uma série de tampões de formulação A16/A17, com ou sem NAT, foram testados. As FIGS. 12A e 12B mostram os resultados de HPLC-ELSD desta avaliação com tampões que contêm NAT exibido na FIG. 12A e aqueles sem NAT exibidos na FIG. 12B. Cada tampão contendo NAT na FIG. 12A também exibiu um pico no tempo de retenção de PS20. Por contraste, todos os tampões nos quais o NAT foi excluído não exibiam um pico de interferência. Juntos, os dados mostrados nas FIGS. 11A, 11B, 12A e 12B indicam que o NAT foi retido no cartucho Oasis® MAX e co-eluído com PS20, em vez

de a interferência ser causada por proteína ou outros excipientes.

TABELA 23: TAMPÕES TESTADOS COM O MÉTODO 1 E O MÉTODO 2

Tampão	**Contém NAT?**
20mM de His-HCl, 1mM de NAT, 5mM de Met, 240mM de Sacarose, pH 5,5 (formulação de A16/A17 alvo, sem PS20)	Sim
Tampão de formulação sem Met, PS20	Sim
Tampão de formulação sem NAT, PS20	Não
25 mM de Met em 20 mM de His-HCl	Não
5 mM de NAT em 20 mM de His-HCl	Sim
20 mM de His-HCl	Não

[00372] O NAT contém um grupo carboxilato, e pode reter via troca aniônica para a resina encontrada no cartucho. Nós exploramos o uso de um cartucho Oasis® alternativo (Oasis® MCX) para separar melhor o NAT do PS20. Ao contrário do cartucho Oasis® MAX, que contém uma resina catiônica à base de amônio, o cartucho Oasis® MCX contém uma resina de sulfito aniônico. Inicialmente, o cartucho MCX foi avaliado utilizando a mesma fase móvel (metanol + ácido acético) utilizada no Método 1. No entanto, sob estas condições, a interferência da proteína foi considerada elevada a níveis inaceitáveis (dados não mostrados). O método de extração de amostras Waters Oasis® recomenda o uso de hidróxido de amônio como aditivo da fase móvel em procedimentos de extração em fase sólida no formato de placa da resina MCX (Waters, "Oasis Sample Extraction Products," 2011). Portanto, a fase móvel foi modificada pela substituição de ácido acético a 2% por hidróxido de amônio a 1,5%, para melhor mimetizar as condições recomendadas pelo fabricante. Com estas modificações de método, os diferentes derivados dos tampões A16/A17 foram avaliados utilizando o cartucho MCX e os dados são mostrados nas FIGS. 13A e 13B.

[00373] Ao contrário dos resultados obtidos com o Método 1, não foi

observada interferência no tempo de retenção de PS20, com ou sem NAT, e todos os excipientes foram eluídos do cartucho antes de 1 minuto (Figuras 13A e 13B). Adicionalmente, não foi observada interferência na região PS20 no ELSD quando foram injetados 50 de proteína A16/A17 livre de PS20 (FIG. 13A, traço 4), indicando que o método tem o potencial para separar a proteína do PS20. O cartucho MCX, juntamente com o hidróxido de amônio como o aditivo da fase móvel, foi selecionado para uso para avaliar a quantificação de PS20 para formulações contendo NAT.

Modificação do Método

[00374] Uma vez estabelecidas as condições preliminares para analisar as formulações contendo NAT, como descrito acima, os seguintes parâmetros foram examinados em mais detalhes:

% de hidróxido de amônio na fase móvel

%B utilizado na etapa de lavagem (testado 20-60%B)

Tempo de lavagem (2,4 min e 3,4 min) e Volumes de injeção (volumes de injeção de 25 e 50 µL)

Vazão (0,8 ml/min a 1,6 ml/min)

Tempo de eluição (1,1 min, 3,1 min)

% de hidróxido de amônio na fase móvel

[00375] O método de extração de amostras Waters Oasis® recomenda o uso de hidróxido de amônio como aditivo da fase móvel em procedimentos de extração em fase sólida no formato de placa da resina MCX (Waters, "Oasis Sample Extraction Products," 2011). A experiência foi realizada com detecção por ELSD (FIG. 14A) e UV (FIG. 14B). A proteína A16/A17 livre de PS20 foi a amostra utilizada para avaliar a eluição de proteína e NAT do cartucho utilizando 0,15, 0,29, 0,73 ou 1,5% de hidróxido de amônio na fase móvel (FIGS. 14A e 14B, traços 1, 2, 3, e 4, respectivamente). Como o detector de UV está alinhado diante da válvula de desvio, os analitos com um cromóforo (por

exemplo, NAT e proteína) que eluem antes do PS20 podem ser detectados. De modo a avaliar a capacidade de eliminar NAT, também foi injetado tampão de formulação livre de PS20 de A16/A17 (Figuras 14A e 14B, traço 5).

[00376] Quando o efluente do cartucho foi introduzido no ELSD em 2,4 minutos por comutação da válvula de desvio, foi observada uma ligeira interferência com 0,15% de hidróxido de amônio (FIG. 14A, traço 1) na fase móvel, como evidenciado pela linha de base ligeiramente superior; O traço de UV também mostra que a proteína e/ou NAT foram eluídos principalmente do cartucho antes que o efluente entrasse no ELSD. A maioria desses interferentes potenciais eluiu no volume vazio. Como a percentagem de aditivo de hidróxido de amônio foi aumentada (de 0,29 para 1,5%), houve uma diferença mínima na extensão da interferência de proteína ou NAT observada por ELSD (FIG. 14A, traços 2-4). Adicionalmente, o traço de UV mostra que o método eliminou proteína e NAT suficientemente a todos os níveis de hidróxido de amônio testados (FIG. 14B, traços 2-4). Quando a proteína livre de PS20 foi injetada com 1,5% de hidróxido de amônio na fase móvel (Figura 14A, traço 4), pareceu haver menos interferência de proteína quando o efluente foi introduzido em 2,4 minutos na região PS20 (4,0-5,5 minutos) em comparação com a mesma proteína injetada com as porcentagens menores de hidróxido de amônio. O traço de UV do tampão de formulação livre de PS20 (Figura 14B, traço 5) mostra que o NAT é eliminado eficientemente com 1,5% de hidróxido de amônio na fase móvel. Portanto, essa porcentagem de aditivo foi selecionada para uso no método.

[00377] A absorvência a 280 nm (FIG. 14B) mostra que a proteína e NAT foram eliminadas suficientemente quando se utiliza 0,15-1,5% de hidróxido de amônio na fase móvel com algum alargamento destes interferentes presente em ~2,5 min. Devido a essa descoberta, o método

de metanol + hidróxido de amônio foi alterado para desviar o fluxo para o ELSD em 3,0 min, em vez de 2,4 min, a fim de evitar a contaminação do detector e assegurar que a interferência de proteína e NAT no ELSD fosse mínima. Como a eluição do PS20 é de cerca de 4,5 min, essa alteração não deve afetar esse pico.

%B utilizado na etapa de lavagem (testado 20-60%B)

[00378] Anteriormente, para o desenvolvimento do Método 1 em formulações sem NAT, a % de metanol utilizada durante a etapa de lavagem para separar a proteína do PS20 foi otimizada utilizando uma abordagem com gradiente degrau. A % de metanol usada no desenvolvimento do Método 2 foi reconsiderada devido ao impacto desconhecido na retenção de proteína de várias mudanças importantes no método; a fase estacionária foi alterada para uma resina MCX, e o aditivo da fase móvel foi revisado para hidróxido de amônio. Nesta experiência, quatro níveis diferentes em incrementos de 10% (v/v) de %B (metanol + hidróxido de amônio a + 1,5%) foram testados em uma faixa de concentrações de 20-60%. Tanto ELSD quanto detecção UV foram usados para monitorar a eluição de proteínas em cada condição testada. A amostra A16/A17 livre de polissorbato foi usada para a avaliação, e os dados ELSD e UV são mostrados na FIG. 15A e 15B, respectivamente.

[00379] Na FIG. 15B, o cromatograma de absorvência de 280 nm apresenta um pico bem definido no tempo de retenção de PS2- (~4,5 minutos), sugerindo que houve retenção de proteína e/ou NAT no cartucho com 20%B de lavagem (traço 1) quando foram injetados 15 µL de proteína A16/A17 livre de PS20. Um pico muito maior também foi observado no volume vazio, que é provavelmente uma mistura de proteína e NAT. Um pico bem definido foi também detectado no ELSD como interferência na região PS20 (FIG. 15A) para esta mesma condição. Quando a %B para a etapa de lavagem foi aumentada para 30%,

a eliminação de NAT e proteína foi aprimorada (traço 2), como evidenciado pela diminuição do pico na região PS20 em ambos os traços de UV e ELSD. O NAT e a proteína foram eliminados de forma mais eficiente com 40%B, no entanto, ainda havia ligeira interferência presente na região PS20 no ELSD (FIG. 15A). O NAT e a proteína foram mais eficientemente eliminados com 50 e 60%B de lavagem (traços 4 e 5, respectivamente), com interferência mínima presente. 45%B na etapa de lavagem foi selecionado para uso no método. Durante o desenvolvimento anterior do Método 1, também testamos até 50% de metanol como condição de lavagem, mas foi observado que uma pequena porção do PS20 eluiria mais cedo nessas condições (a 45% de metanol esse pequeno pico não foi observado). Estes picos podem ter sido os ésteres de comprimento de cadeia mais curtos, que são menos hidrofóbicos, e eram indicativos de que a condição de metanol a 50% era aproximadamente o ponto em que as espécies esterificadas eluiriam. Devido a esta observação anterior, e o presente resultado mostrando que 40%B foi suficiente para remover a proteína, optamos pela condição de 45%B para a etapa de lavagem para fornecer um meio-termo entre remoção de proteína e retenção de PS20 robustas. Além disso, os dados de UV na FIG. 15B mostram que a proteína eluiu ligeiramente mais cedo na condição de lavagem com 50%B.

Tempo de lavagem (2,4 min e 3,4 min) e Volumes de injeção (volumes de injeção de 25 e 50 µL)

[00380] De modo a minimizar ainda mais a interferência na região PS20, as etapas de lavagem de 2,4 minutos e 3,4 minutos foram avaliadas. Como mostrado na FIG. 16, a região PS20 é semelhante entre as lavagens de 2,4 ou 3,4 minutos (traço 3 e traço 2, respectivamente). Como a especificidade melhorou ligeiramente e não houve impactos negativos aparentes no tempo de lavagem mais longo, foi selecionada uma lavagem de 3,4 minutos para utilização no método. Além disso, o

fluxo foi selecionado para ser desviado para o ELSD em 4,0 minutos, em vez de 2,4 minutos.

[00381] O impacto do volume de injeção na linha de base também foi avaliado diminuindo o volume de amostra de 50 para 25 (FIG. 16, traço 2 e traço 1, respectivamente). A linha de base do traço de injeção de 25 µL parece um pouco mais limpa, o que é esperado, uma vez que há menos proteínas e excipientes a serem removidos do cartucho. Em última análise, o volume de injeção não afetou significativamente o desempenho em relação à especificidade.

Vazão (0,8 ml/min a 1,6 ml/min)

[00382] A vazão foi avaliada para garantir que a proteína e o NAT estavam sendo eliminados eficientemente. A vazão foi variada entre 0,8-1,6 ml/min. As FIGS. 17A e 17B mostram 25 µl de injeções de amostra de proteína A18/A19 livre de PS20 a 150 mg/ml usando vazões de 1,60, 1,40, 1,25, 1,00 e 0,80 ml/min (traços 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente).

[00383] Na vazão mais lenta, 0,8 mL/min (traço 5), havia ainda proteínas e excipientes eluídos na região PS20 como indicado pelo pico no ELSD (FIG. 17A). O traço de UV (FIG. 17B) desta condição também exibiu aumento de interferentes eluindo mais tarde do que com as vazões mais altas. Quando a vazão foi aumentada para 1,00 ml/min (traço 4), a interferência diminuiu e tornou-se quase insignificante, uma vez que a vazão foi aumentada para 1,25 ml/min (traço 3). Quando a vazão foi aumentada para 1,40 e 1,60 mL/min (traços 2 e 1, respectivamente), o traço de UV mostra que a maior parte da proteína e excipientes foram eluídos do cartucho mais completamente em 2,0 minutos do que com as vazões mais baixas, e uma vazão de 1,40 mL/min foi selecionada para uso no método. Não aumentamos para 1,6 mL/min porque o desempenho foi quase equivalente a 1,4 mL/min e porque queríamos minimizar o risco de vazamentos devido à maior

contrapressão a 1,6 mL/min.

Tempo de eluição (1,1 min, 3,1 min)

[00384] A etapa de eluição a 100% B no Método 1 é mantida durante 1,1 minutos. Há um pico de identidade desconhecida que elui em ~6,5 minutos, o que foi observado em todas as injeções, independentemente da amostra e incluindo os ensaios em branco com água. O pico desconhecido parece eluir após a %B da fase móvel voltar às condições de reequilíbrio. Para testar se o pico poderia ser mais bem separado do PS20, o tempo de eluição foi prolongado. A FIG. 18 ilustra a integração do pico do PS20, que começa em ~5,2 minutos e termina aproximadamente quando esse pico desconhecido começa (traço 2). Embora isso não tenha afetado significativamente a quantificação, para evitar potencial interferência deste pico no futuro, a etapa de eluição foi aumentada para um tempo de espera de 3,1 minutos (traço 1), permitindo uma melhor separação e integração da região PS20. A FIG. 19 ilustra os resultados para a água, 150 mg/mL de A18/A19 livres de PS20, 0,2 mg/mL de PS20 adicionados à água e 0,2 mg/mL de PS20 adicionados a A18/A19 (traços 1, 2, 3 e 4, respectivamente) usando o Método 2 com os parâmetros finalizados.

Experiências de Qualificação de Método

Especificidade

[00385] A especificidade foi determinada confirmando que injeções de tampão de formulação livre de PS20 e produto livre de PS20 não contribuem para quaisquer picos que possam interferir na região PS20; estes foram comparados com o padrão de calibração de PS20 mais baixo, que é tipicamente a 50% da concentração de PS20 alvo.

[00386] Cromatogramas típicos para tampão de formulação livre de PS20, proteína livre de PS20 e 0,1 mg/mL de PS20 (alvo de 50%) adicionados à água são mostrados nas FIGS. 20A-20F. Três diferentes produtos livres de PS20 foram avaliados. A18/A19 (Figs. 20A e 20B),

A16/A17 (Figs. 20C e 20D) e A14/A20 (Figs. 20E e 20F) têm concentrações proteicas de 150, 80 e 150 mg/mL, respectivamente. Mais detalhes sobre esses produtos são fornecidos na Tabela 21. Visualmente, todos os produtos tiveram alguma interferência na região PS20 no ELSD quando a amostra de proteína livre de PS20 foi injetada (FIG. 20A, 20C e 20E, traço 2). Contudo, o tampão de formulação livre de PS20 não apresentou interferência visual na região PS20 (FIG. 20A, 20C, e 20E, traço 1), indicando que a interferência era principalmente da proteína.

[00387] Os critérios de aceitação do método são preenchidos se as áreas de pico nas amostras livres do PS20 estiverem ≤ 10% da área do pico no padrão mais baixo. Como havia alguma interferência de proteína visível na região do PS20, a especificidade deve ser determinada usando uma equação. Existem diferentes abordagens usadas para determinar a especificidade. Para este estudo, a seguinte equação foi usada para derivar uma estimativa numérica da especificidade:

Equação 1: Especificidade

Interferência (%) = (área de proteína livre de PS20/área de 50% da especificação PS20)*100

[00388] Usando esta equação, a % de interferência foi calculada para os três produtos (Tabela 24). Foi determinado que A16/A17 livre de PS20 (80 mg/mL) (FIG. 20C) tinha especificidade de 7% quando comparado com PS20 a 0,1 mg/mL em água (alvo de 50%). A18/A19 livre de PS20 (150 mg/mL) (FIG. 20A) tinha apenas 4% de interferência, enquanto A14/A20 (150 mg/mL) (FIG. 20E) tinha 13% de interferência quando comparado com 0,1 mg/mL de PS20 na água (alvo de 50%).

[00389] Os traços de UV a 280 nm (Figs. 20B, 20D e 20F) para todos os produtos mostram que a proteína e NAT foram eficientemente eliminados no momento em que o fluxo foi desviado para o ELSD aos

4,0 minutos. Embora A14/A20 tivesse uma interferência de 13%, a repetibilidade, precisão e linearidade nas avaliações subsequentes para este produto eram aceitáveis.

TABELA 24: ESPECIFICIDADE DOS TRÊS PRODUTOS

	A18/A19	**A16/A17**	**A14/A20**
Área de proteína livre de PS20	0,3	0,5	0,8
Área de 0,1 mg/ml PS20 em água	7,1	7,1	6,2
Especificidade (%)	4	7	13

Precisão

[00390] De modo a determinar a precisão do ensaio, uma quantidade conhecida de PS20 foi adicionada a proteína livre de PS20 e as recuperações para cada concentração foram determinadas (Tabela 25). Os critérios típicos de aceitação de validação exigem que a % de recuperação esteja entre 80 e 120%.

[00391] A18/A19 livre de PS20 (150 mg/mL) e A16/A17 livre de PS20 (80 mg/mL) foram avaliados adicionando PS20 a uma faixa de 0,1-0,6 mg/mL. Os dados de precisão estão resumidos na Tabela 25. Nas concentrações de PS20 testadas, a faixa de recuperações para A16/A17 e A18/A19 foi de 94-100% e 78-100%, respectivamente. A amostra com 78% de recuperação ocorreu com 0,4 mg/mL de PS20 em A18/A19 livre de PS20. As recuperações das concentrações de PS20 em faixas (0,2 e 0,6 mg/mL) estavam dentro da especificação, sugerindo erro na preparação de amostra ou injeção para esta amostra. Se a amostra de 0,4 mg/mL for excluída, a faixa de recuperações é de 88 a 100% para A18/A19.

[00392] A precisão de A14/A20 livre de PS20 (150 mg/mL) foi avaliada pela adição de PS20 na faixa de 0,1-0,3 mg/mL. As recuperações do PS20 para A14/A20 variaram de 92-109%. No geral, os dados de experimentos de recuperação de alta qualidade para todos os três produtos testados demonstram que o método é preciso. Adicionalmente, estes resultados demonstram que 2,5 µg (0,1 µg/µl * 25 µl) - 15 µg

(0,6 µg/µl * 25 µl) de PS20 podem ser carregados no cartucho e quantificados com precisão.

TABELA 25: PRECISÃO

Produto (concentração de proteína)	Volume de Injeção (µL)	Número de Replicados	PS20 adicionado (mg/mL)	Área (mV*min)	Quantidade (mg/mL)	% de Recuperação
A18/A19 (150 mg/mL)	25	1	0,10	9,2	0,09	88
			0,20	26,4	0,19	95
			0,40	51,8	0,31	78
			0,60	125,0	0,60	100
A16/A17 (80 mg/mL)	25	1	0,10	10,0	0,09	94
			0,20	27,3	0,20	98
			0,40	72,5	0,40	100
			0,60	124,3	0,60	99
A14/A20 (150 mg/mL)	25	3	0,10	7,2	0,11	109
			0,15	12,7	0,16	104
			0,20	19,0	0,20	101
			0,25	25,8	0,25	98
			0,30	31,6	0,28	92

Linearidade

[00393] A linearidade foi avaliada pela determinação do coeficiente de correlação de Pearson (r) ≥ 0,99 sobre as faixas testadas para os três produtos. Estes valores são mostrados na Tabela 26 para cada faixa de concentrações de PS20 para cada produto. Todos os valores do coeficiente de correlação de Pearson foram maiores que 0,99 para as faixas de PS20 testadas. Portanto, a linearidade foi aceitável para este ensaio nos três produtos testados.

TABELA 26: LINEARIDADE: COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

Produto	Faixa de Concentração de PS20 (mg/mL)	Coeficiente de correlação de Pearson (r)
A18/A19	0,1 – 0,6	0,9915
A16/A17	0,1 – 0,6	0,9999
A14/A20	0,1 – 0,3	0,9994

Repetibilidade

[00394] A repetibilidade foi avaliada com seis injeções replicadas da amostra A18/A19 (nominal 0,2 mg/mL de PS20) e seis injeções replicadas da amostra A16/A17 (nominal 0,2 mg/mL de PS20) e medindo a %RSD das áreas do pico de PS20. Os resultados desta avaliação são apresentados na Tabela 27 e mostram que a precisão do ensaio foi aceitável para ambos os produtos.

TABELA 27: REPETIBILIDADE DE A18/A19 E A16/A17

	A18/A19		**A16/A17**	
Injeção #	**Área (mV * min)**	**PS20 Conc (mg/mL)**	**Área (mV * min)**	**PS20 Conc (mg/mL)**
1	23,9	0,18	35,4	0,24
2	25,6	0,19	35,1	0,24
3	24,3	0,18	35,0	0,23
4	24,0	0,18	35,1	0,24
5	24,5	0,18	35,2	0,24
6	23,4	0,18	34,9	0,23
Média	24,3	0,18	35,1	0,23
DP	0,7	0,0	0,2	0,0
%RSD	3,1	2,1	0,5	0,3

[00395] A repetibilidade também foi avaliada testando três repetições de cinco concentrações e medindo a %RSD das áreas de pico do PS20. Este experimento foi realizado com 0,10-0,30 mg/mL de PS20

em A14/A20 livres de PS20. Os resultados desta avaliação são apresentados na Tabela 28 e mostram que a precisão do ensaio é aceitável para A14/A20.

TABELA 28: REPETIBILIDADE DE A14/A20

	PS20 adicionado a A14/A20				
PS20 teórico (mg/mL)	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
PS20 Medido Médio (mg/mL)	0,11	0,16	0,20	0,25	0,28
DP (mg/ml)	0,001	0,002	0,002	0,001	0,003
RSD (%)	0,5	1,5	0,9	0,4	1,1

Experimentos de Robustez do Método

Cartucho para Cartucho

[00396] Trabalhos anteriores feitos com o Método 1 do Exemplo 1 mostraram que, mesmo quando o lote sorvente do cartucho seja o mesmo, os cartuchos podem exibir um comportamento diferente em relação à depuração e especificidade da proteína. Três cartuchos MCX foram avaliados para determinar a variabilidade de cartucho para cartucho. Destes, os cartuchos MCX 2 e 4 tinham o mesmo lote sorvente (0093), enquanto 6 era diferente (0103) (Tabela 20).

[00397] Todos os três cartuchos MCX foram avaliados com 0,2 mg/mL de PS20 misturado com água e produtos contendo PS20. As FIGS. 21 e 22 mostram os cromatogramas destas avaliações e a Tabela 29 apresenta um resumo dos resultados. Os traços 3 e 4 na FIG. 21 e o traço 3 na FIG. 22 ilustram as diferenças nas alturas e larguras dos picos para o PS20 de 0,2 mg/mL em amostras de água injetadas através dos três cartuchos. Mais notavelmente, as alturas e áreas dos picos são variáveis de cartucho para cartucho, com a maior diferença observada entre o cartucho 2 (FIG. 21, traço 1 e 3) e o cartucho 6 (FIG. 21, traço 2 e 4). A área do pico com o cartucho 2 foi de aproximadamente 60% da área do pico com o cartucho 6 em ambos os tipos de amostra testados (ou seja, PS20 em água e PS20 em A18/A19).

Dado que a diferença nas áreas de pico foi observada como independente do tipo de amostra (*por exemplo*, com ou sem proteína), a variabilidade não é provavelmente causada por interferência de proteína. Embora as contagens de área fossem muito diferentes entre dois cartuchos testados, a diferença entre os cartuchos 4 e 6 era menor, com a área do cartucho 4 sendo aproximadamente 85% do cartucho 6. A variabilidade na área do pico de PS20 entre os cartuchos não parece ser apenas dependente do lote de resina, uma vez que ambos os cartuchos 2 e 4 compartilhavam o mesmo lote de resina e também produziam diferentes áreas de pico.

[00398] Embora essa variabilidade não seja a ideal, as concentrações de PS20 determinadas a partir da curva de calibração analisada na mesma coluna foram precisas em comparação com as concentrações teóricas em todos os cartuchos, uma vez que os padrões foram implementados para obter a quantidade calculada de PS20. Com base nesses dados, será importante utilizar quantidades de injeção de PS20 que forneçam uma resposta bem dentro da faixa linear do detector ELSD. Por exemplo, uma resposta máxima do detector de 80% da escala total (*por exemplo*, 800 mV) é geralmente recomendada para métodos HPLC-ELSD, mas dada a variabilidade observada de cartucho para cartucho, pode ser aconselhável diminuir essa resposta alvo para o método MCX para fornecer mais garantias de que o detector não saturará certos cartuchos. No geral, a variabilidade de cartucho para cartucho foi mínima em relação à quantidade de PS20 relatada para este método para as amostras e cartuchos testados.

TABELA 29: VARIABILIDADE DE CARTUCHO PARA CARTUCHO

Cartucho MCX	**0,2 mg/mL de PS20 adicionado a água**		**0,1 mg/ml de PS20 adicionado a A18/A19**			**A18/A19 (est. 0,2 mg/ml de PS20)**	
	Área (mv*min)	Quantidade de PS20 (mg/mL)	Área (mv*min)	Quantidade de PS20 (mg/mL)	% de Recuperação	Área (mv*min)	Quantidade de PS20 (mg/mL)
2	15,8	0,19	6,1	0,10	99,6	n/a	n/a
4	22,3	0,20	n/a	n/a	n/a	20,3	0,19
6	26,7	0,19	10,3	0,10	95,2	23,9	0,18

Injeção de 100X da amostra de A18/A19

[00399] Embora os experimentos descritos acima demonstrem que o cartucho OASIS® MCX pode quantificar de forma robusta e precisa o PS20, queríamos testar a durabilidade do cartucho executando sequências longas com amostras contendo proteínas. Um dos produtos para os quais este método foi inicialmente desenvolvido tem uma concentração de proteína alvo muito alta de 150 mg/mL e pode levar à falha de cartucho/sobrepressão devido ao acúmulo de proteína no cartucho. Como de praxe, a pressão foi de ~25-45 bar ao executar o método. Se a pressão aumentar acima desta faixa, o cartucho provavelmente acumulou proteínas e/ou excipientes e deve ser monitorado de perto ou o cartucho deve ser substituído. Se o cartucho começar a vazar, ele deve ser descartado e substituído imediatamente.

[00400] A repetibilidade dos cartuchos e a capacidade de limpar consistentemente a proteína e o NAT foram avaliados pela injeção de proteína (150 mg/mL) cem vezes (ver Tabela 30 para a sequência) usando um novo cartucho. Os controles (n=11) foram agrupados a cada décima injeção de proteína e foram analisados primeiro para garantir que a sequência fosse válida. A FIG. 23 mostra a sobreposição dos controles. Embora tenha havido um aumento (até 5 mV) no início da linha de base (em 4,0-5,0 min e após 8,5 min) e no back-end da linha de base, essas alterações não afetaram a integração ou a quantificação final do PS20 (Tabela 31) com uma quantidade média de PS20 calculada a 0,2±0,005 (2,8% RSD) mg/mL.

TABELA 30: SEQUÊNCIA (TODAS AS INJEÇÕES DE 25 µL)

Amostra	**Replicados**	**Repetição**
água	5	0
padrão 1 (0,1 mg/mL em água)	2	
padrão 2 (0,2 mg/mL em água)	2	
padrão 3 (0,3 mg/mL em água)	2	
Tampão de formulação livre de PS20	1	
A18/A19 livre de PS20	1	
Tampão de Formulação com PS20	1	
água	1	
controle (0,2 mg/mL em água)	1	
A18/A19 (est. 0,2mg/ml de PS20)	10	9
água	1	
controle (0,2 mg/mL em água)	1	
Tampão de formulação livre de PS20	1	0
A18/A19 livre de PS20	1	
Tampão de Formulação com PS20	1	
padrão 1 (0,1 mg/mL em água)	2	
padrão 2 (0,2 mg/mL em água)	2	
padrão 3 (0,3 mg/mL em água)	2	

TABELA 31: QUANTIFICAÇÃO DOS CONTROLES UTILIZADOS NA SEQUÊNCIA PROTEICA DE 100X

Controle (0,2 mg/mL de PS20 em água) a cada 10ª injeção de proteína	**Área de PS20 (mV*min)**	**Quantidade de PS20 (mg/mL)**
Média	18,5	0,2
DP	0,891	0,005
%RSD	4,8	2,8

[00401] Uma vez que os controles foram qualitativa e quantitativamente consistentes ao longo do ensaio, as cem amostras A18/A19 (150 mg/mL) com PS20 nominal de 0,2 mg/mL foram integradas (FIG. 24) e quantificadas (FIG. 26B, Tabela 32). A FIG. 24 ilustra a mesma tendência dos controles, com uma linha de base crescente (~5 mV) antes da região PS20, a 4,0-5,0 min e após 8,5 min. Plotando a área versus número de injeção e quantidade versus número de injeção, a quantificação da proteína teve desvio mínimo, embora tenha havido uma leve tendência de queda para as áreas e quantidades calculadas para as primeiras vinte injeções, o que pode ser devido ao equilíbrio do cartucho (Figuras 26A e 26B). Por fim, as áreas e quantidades médias de PS20 quantificadas para as cem injeções da amostra de A18/A19 foram 18,3±0,76 (4,2%RSD) mV*min e 0,2±0,005 (2,6%RSD) mg/mL, respectivamente (Tabela 32). Observe que 375 mg de proteína foram carregados no cartucho com a centésima injeção. O método limpou consistentemente a proteína e os excipientes suficientemente antes do efluente entrar no ELSD aos 4,0 minutos (FIG. 25A) ao longo da sequência como representada no traço de UV (FIG. 25B).

[00402] Devido à tendência descendente, foram avaliadas cem injeções de tampão de formulação de A18/A19 com valor nominal de 0,2 mg/mL de PS20 com um novo cartucho MCX (cartucho 5) para determinar se este efeito é devido à proteína ou à formulação ou ambas. Curiosamente, houve uma tendência similar de queda nas contagens

de área [n=100, média de 31,3±1,3 (4,1%RSD) mv*min] para as primeiras 49 injeções (FIG. 27A). Este comportamento não teve um grande impacto na quantificação [n=100, média 0,22±0,005 (2,1%RSD)] (FIG. 27B e Tabela 32).

[00403] Quando 0,2 mg/mL de PS20 adicionado à água também foi avaliado em um novo cartucho (cartucho 3), não houve tal tendência de queda. Para esta amostra, a contagem de área [n=100, média de 20,7±0,3 (1,5%RSD) mv*min] (FIG. 28A) permaneceu consistente, juntamente com a quantificação [n=100, média de 0,20±0,002 (0,9%RSD)] (FIG. 28B, Tabela 32). Este resultado da amostra de água + PS20 pode indicar que a tendência descendente observada anteriormente (FIGS. 26A e 27A) está relacionada com os outros excipientes na formulação ou com a presença da proteína. Outra possibilidade é que foi um efeito relacionado ao cartucho específico usado, e não depende dos outros componentes da formulação.

TABELA 32: QUANTIFICAÇÃO DE INJEÇÕES DE 100X DE PS20 MISTURADO COM ÁGUA, TAMPÃO DE FORMULAÇÃO DE A18/A19, AMOSTRA DE A18/A19

Amostra	**Parâmetro**	**Área de PS20 (mV*min)**	**Quantidade de PS20 (mg/mL)**
0,2 mg/mL adicionado a água	Média	20,7	0,20
	DP	0,3	0,002
	%RSD	1,5	0,92
Tampão de formulação de A18/A19 (est. 0,2 mg/ml de PS20)	Média	31,3	0,22
	DP	1,3	0,005
	%RSD	4,1	2,09
150 mg/mL amostra de A18/A19 (est. 0,2 mg/ml de PS20)	Média	18,3	0,18
	DP	0,8	0,005
	%RSD	4,2	2,61

[00404] No geral, os três cartuchos foram capazes de funcionar eficientemente após 100 injeções de PS20, ilustrando que a reprodutibilidade e robustez do cartucho MCX é adequada para uso rotineiro em um ambiente de QC. Mais importante, os perfis de absorvência de cem

injeções de proteínas mostram claramente uma depuração semelhante de ambas as proteínas e NAT ao longo da sequência (FIG. 25B). A quantificação do PS20 permaneceu estatisticamente constante ao longo da sequência.

Avaliação de quantificação do PS20 de três produtos de baixo pI

[00405] Três diferentes produtos de baixo pI, A21, A14/A15 e A14 (Tabela 33), foram avaliados com o Método 1 (descrito no Exemplo 1) e com o Método 2. Os cartuchos usados para essa avaliação estão listados na Tabela 34. As características de desempenho do método testadas foram especificidade, precisão, linearidade e repetibilidade.

TABELA 33. MOLÉCULAS AVALIADAS

Produto	**Tampão**	**Concentração Nominal de Proteína (mg/mL)**	**Concentração nominal de PS20 (mg/mL)**	**pI**
A21	20mM de Cloreto de histidina pH 5	150	0,2	7,2*
A14/A15 bi-específico	20 mM de HisAce, 240 mM de Sacarose, pH 5,8	190	0,3	7,2*
A14	Tampão DF 20 mM de acetato de histidina pH 5,7	160	0,3	6,2**

pI determinado pelo método de abordagem em faixas (curva de calibração)

** pI determinado pelo ensaio do sistema de controle icIEF

TABELA 34. CARTUCHOS USADOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Tipo de cartucho	**Número do Cartucho**	**Lote Sorvente #**	**Lote de Cartucho #**
Cartucho de troca catiônica de modo misto (MCX) para o Método 2	7	0101	0101342141
Cartucho de troca aniônica de modo misto (MAX) para o Método 1	8	0053	0053323111

Especificidade

[00406] A especificidade calculada para as três moléculas é mostrada na Tabela 35. Cromatogramas correspondentes são mostrados nas FIGS. 29A-29F. A21 (150 mg/mL) apresentou 16% de interferência quando avaliado pelo Método 1 (Oasis® MAX com metanol e ácido acético) e 7% de interferência quando avaliado pelo Método 2 (Oasis® MCX com metanol e hidróxido de amônio), comparado a 0,1 mg/mL de PS20 em água (alvo de 50%). Isso pode ser devido a uma interação mais fraca do produto de baixo pI com a resina de troca catiônica (grupo aniônico sulfito), minimizando a interferência da proteína. A14/A15 (192 mg/mL) apresentou 3% de interferência quando avaliado pelo Método 1 e 2% de interferência quando avaliado pelo Método 2, comparado a 0,15 mg/mL de PS20 em água (alvo de 50%). A14 (161 mg/mL) apresentou ~1% de interferência quando avaliado com ambos os métodos, comparado a 0,15 mg/mL de PS20 em água (alvo de 50%). A especificidade desses produtos não foi significativamente afetada pelo método.

TABELA 35. ESPECIFICIDADE DE TRÊS MOLÉCULAS DE BAIXO PI

	Método 1	**Método 2**
Produto	**Especificidade (%)**	**Especificidade (%)**
A21	15,6	7,1
A14/A15	3,4	1,9
A14	0,8	0,6

Precisão

[00407] De modo a determinar a precisão do ensaio, uma quantidade conhecida de PS20 foi adicionada a proteína livre de PS20 e as recuperações para cada concentração foram determinadas (Tabela 36). Os critérios típicos de aceitação de validação exigem que a % de recuperação esteja entre 80 e 120%.

[00408] O A21 livre de PS20 foi avaliado adicionando PS20 na faixa

de 0,10-0,30 mg/mL. Os dados de precisão estão resumidos na Tabela 36. Nas concentrações de PS20 testadas, a faixa de recuperações, quando as amostras foram analisadas usando o Método 1 e o Método 2, foram de 99-108% e 101-110%, respectivamente. As precisões de A14/A15 e A14 livre de PS20 foram avaliadas adicionando PS20 a uma faixa de 0,15-0,45 mg/mL. As recuperações do PS20 para A14/A15, quando as amostras foram analisadas usando o Método 1 e o Método 2, variaram de 97-101% e 92-99%, respectivamente. As recuperações do PS20 para A14, quando as amostras foram analisadas usando o Método 1 e o Método 2, variaram entre 102-108% e 102-110%, respectivamente. No geral, os dados dos experimentos de recuperação de alta qualidade para todos os três produtos testados demonstraram que ambos os métodos são precisos.

TABELA 36. RECUPERAÇÃO DE TRÊS PRODUTOS DE BAIXO PI

	Método 1			Método 2		
Amostra	**Área Média**	**Quantidade Média (mg/mL)**	**% de Recuperação Média**	**Área Média**	**Quantidade Média (mg/mL)**	**% de Recuperação Média**
0,10 mg/mL de PS20 em A21	6,1	0,11	108,4	3,3	0,11	109,6
0,15 mg/mL de PS20 em A21	9,9	0,15	98,9	5,8	0,15	101,3
0,20 mg/mL de PS20 em A21	16,0	0,20	100,8	9,6	0,21	102,8
0,25mg/mL de PS20 em A21	22,9	0,25	101,5	14,0	0,26	102,1
0,30mg/mL de PS20 em A21	30,9	0,31	102,6	19,0	0,31	101,8
0,15mg/mL de PS20 em A14/A15	8,5	0,15	97,2	4,5	0,14	91,7
0,23 mg/mL de PS20 em A14/A15	18,5	0,23	100,9	11,0	0,23	98,4
0,3 mg/mL de PS20 em A14/A15	27,1	0,29	97,1	15,9	0,28	93,1
0,38 mg/mL de PS20 em A14/A15	41,1	0,37	98,4	25,9	0,37	96,7
0,45 mg/mL de PS20 em A14/A15	54,5	0,44	98,4	36,5	0,45	99,3
0,15 mg/mL de PS20 em A14	10,0	0,16	106,8	6,2	0,16	109,6
0,23 mg/mL de PS20 em A14	20,6	0,25	107,6	13,3	0,25	109,6
0,3 mg/mL de PS20 em A14	30,2	0,31	103,7	19,1	0,31	103,2
0,38 mg/mL de PS20 em A14	44,5	0,39	103,3	29,4	0,39	103,8
0,45 mg/mL de PS20 em A14	57,7	0,46	101,9	38,6	0,46	102,4

Triplicado, injeções de 20 µL

Linearidade

[00409] A linearidade foi avaliada pela determinação do coeficiente de correlação de Pearson (r) ≥ 0,99 sobre as faixas testadas para os três produtos com baixo pI avaliados com o Método 1 e o Método 2. Estes valores são mostrados na Tabela 37 para cada faixa de concentrações de PS20 para cada produto. Todos os valores do coeficiente de correlação de Pearson foram maiores que 0,99 para as faixas de PS20 testadas. Portanto, a linearidade foi aceitável para o Método 1 e Método 2 nos três produtos testados.

TABELA 37. LINEARIDADE DE TRÊS PRODUTOS DE BAIXO PI

Produto	**Faixa de Concentração de PS20 (mg/mL)**	**Método**	**Inclinação (m)**	**Interceptação em Y (b)**	**Correlação de Linearidade (r)**	**Soma residual de quadrados (RSS)**
A21	0,10 – 0,30	Método 1	1,4928	2,2566	0,9974	0,00163
		Método 2	1,6173	2,1165	0,9989	0,00083
A14/A15	0,15 – 0,45	Método 1	1,6733	2,3171	0,9994	0,00048
		Método 2	1,8659	2,2018	0,9984	0,00162
A14	0,15 – 0,45	Método 1	1,5917	2,3165	0,9996	0,00025
		Método 2	1,6481	2,1578	0,9993	0,00055

Repetibilidade

[00410] A repetibilidade também foi avaliada testando três repetições de cinco concentrações e medindo a %RSD das áreas de pico do PS20. Este experimento foi realizado com 0,10-0,30 mg/mL de PS20 em A21 livre de PS20 e 0,15-0,45 mg/mL de PS20 em A14/A15 livre de PS20 e A14. Os resultados desta avaliação são apresentados na Tabela 38 e mostram que a precisão do ensaio foi aceitável para o Método 1 e o Método 2 nos três produtos testados.

TABELA 38. REPETIBILIDADE DE TRÊS PRODUTOS DE BAIXO PI

	Método 1	**Método 2**
Amostra	**%RSD (N=3)**	**%RSD (N=3)**
0,10 mg/mL de PS20 em A21	1,41	0,53
0,15 mg/mL de PS20 em A21	1,03	1,97
0,20 mg/mL de PS20 em A21	0,99	0,97
0,25mg/mL de PS20 em A21	0,23	0,68
0,30mg/mL de PS20 em A21	0,86	0,19
0,15mg/mL de PS20 em A14/A15	1,98	0,42
0,23 mg/mL de PS20 em A14/A15	1,14	0,67
0,30mg/mL de PS20 em A14/A15	3,90	0,83
0,38 mg/mL de PS20 em A14/A15	4,86	1,59
0,45 mg/mL de PS20 em A14/A15	0,90	1,06
0,15 mg/mL de PS20 em A14	0,63	1,26
0,23 mg/mL de PS20 em A14	0,93	1,82
0,30 mg/mL de PS20 em A14	0,64	0,99
0,38 mg/mL de PS20 em A14	0,39	1,65
0,45 mg/mL de PS20 em A14	0,25	0,38

Triplicado, injeções de 20 µL

CONCLUSÕES:

[00411] As seguintes modificações do Método 1 do Exemplo 1 foram feitas para o ensaio ELSD atual, Método 2:

[00412] Aditivo de fase móvel mudado de ácido acético a 2% para hidróxido de amônio a 1,5%

[00413] A vazão foi alterada de 1,25 ml/min para 1,40 ml/min

[00414] Fluxo de LC passando de resíduos para o ELSD de 2,4 minutos alterado para 4,0 minutos

[00415] A concentração de B% na etapa de lavagem mudou de 40% para 45% da fase móvel B

[00416] Tempo do produto orgânico na etapa de lavagem de 1,0 - 3,4 minutos mudado para 1,0 - 4,4 minutos

[00417] Tempo da etapa de eluição de 3,5 - 4,6 minutos alterado para 4,5 - 7,6 minutos

[00418] Tempo da etapa de equilíbrio de 4,7 - 6,6 minutos alterado para 7,7 - 9,6 minutos

[00419] Essas modificações eliminaram a interferência de NAT e de proteína e apresentaram uma variabilidade mínima de quantificação de cartucho para cartucho. Os resultados da qualificação deste ensaio modificado para três produtos contendo NAT mostraram que este ensaio era adequado para quantificar o polissorbato 20 nestas formulações.

[00420] Três moléculas de pI baixo foram avaliadas com os Métodos 1 e 2. O único caso de falha em atender aos critérios de aceitação foi a especificidade ao usar o Método 1 com A21. Além disso, ambos os métodos passaram pelos critérios de precisão, linearidade e repetibilidade para todos os três produtos com baixo índice de pI. Estes resultados indicam ainda que o Método 2 é também capaz de quantificar o PS20 e é particularmente útil para produtos que não contenham NAT.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, em que a interferência entre o tensoativo não iônico e o polipeptídeo durante a quantificação é reduzida, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de

a) aplicar a composição a um material de cromatografia de troca aniônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma fase móvel A e uma fase móvel B, em que a fase móvel A compreende ácido em água e a fase móvel B compreende ácido em metanol, em que o polipeptídeo se liga ao material de cromatografia especificamente e não especificamente;

b) eluir o polipeptídeo especificamente ligado a partir do material da cromatografia de troca aniônica de modo misto com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada em comparação à etapa a);

c) eluir o tensoativo não iônico e o polipeptídeo não especificamente ligado a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada em comparação à etapa b);

d) quantificar o tensoativo não iônico, em que a interferência entre o tensoativo não iônico e o polipeptídeo durante a quantificação é reduzida.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A na etapa a) é de 10:90; e/ou

a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada

para 40:60 na etapa b); e/ou

a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada para 100:0 na etapa c).

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a fase móvel A compreende 2% de ácido em água e/ou a fase móvel B compreende 2% de ácido em metanol.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o ácido é o ácido fórmico ou ácido acético.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a vazão da cromatografia é de 1,25 mL/minuto e/ou em que a etapa b) começa 1 min após a cromatografia ser iniciada e termina de 3,4 min após a cromatografia ser iniciada e/ou a etapa c) começa 3,5 min após a cromatografia ser iniciada e termina 4,6 min após a cromatografia ser iniciada.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o tensoativo não iônico é poloxâmero (P188) ou um polissorbato.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que a concentração de tensoativo não iônico na composição está na faixa de 0,001% a 1,0% (p/v).

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto compreende um polímero de troca aniônica forte de fase reversa.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto compreende uma porção de amina quaternária.

11. Método para quantificar um tensoativo não iônico em uma composição compreendendo o tensoativo não iônico e um polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de

a) aplicar a composição a um material de cromatografia de troca catiônica de modo misto, em que a composição é carregada no material de cromatografia em uma solução compreendendo uma fase móvel A e uma fase móvel B, em que a fase móvel A compreende hidróxido de amônio em água e a fase móvel B compreende hidróxido de amônio em um solvente orgânico;

b) eluir o polipeptídeo a partir do material da cromatografia de troca catiônica de modo misto com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada em comparação à etapa a);

c) eluir o tensoativo não iônico a partir do material de cromatografia com uma solução compreendendo a fase móvel A e a fase móvel B, em que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada em comparação à etapa b);

d) quantificar o tensoativo não iônico.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico da fase móvel B é o metanol.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A na etapa a) é de 10:90; e/ou

a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada para 45:55 na etapa b); e/ou

a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada para 100:0 na etapa c).

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que a fase móvel A compreende 2% de hidróxido de amônio em água e/ou a fase móvel B compreende 2%

de hidróxido de amônio em metanol.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de que a vazão da cromatografia é de 1,4 mL/minuto; e/ou a etapa b) começa 1 min após a cromatografia ser iniciada e termina 4,4 min após a cromatografia ser iniciada e/ou a etapa c) começa 4,5 min após a cromatografia ser iniciada e termina 7,6 min após a cromatografia ser iniciada.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, caracterizado pelo fato de que o tensoativo não iônico é um polissorbato.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o polissorbato é polissorbato 20 ou polissorbato 80.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que a concentração de polissorbato na composição está na faixa de 0, 001% a 1,0% (p/v).

19. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a fase móvel A compreende 2% de hidróxido de amônio em água ou em 43% de metanol, e/ou o solvente orgânico da fase móvel B é a acetonitrila.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a fase móvel B compreende 2% de hidróxido de amônio em acetonitrila.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A na etapa a) é de 10:90; e/ou a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada para 40:60 na etapa b); e/ou a razão entre a fase móvel B e a fase móvel A é aumentada para 100:0 na etapa c).

22. Método, de acordo com a reivindicação 19, 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que o tensoativo não iônico é um poloxâmero.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado

pelo fato de que o poloxâmero é o poloxâmero P188.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que a concentração de poloxâmero na composição está na faixa de 0,001% a 1,0% (p/v).

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 24, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda N-acetil triptofano e/ou metionina.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a concentração de N-acetil-triptofano na composição varia de 0,1 mM a 10 mM e/ou a concentração de metionina na composição varia de 0,1 mM a 100 mM.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, caracterizado pelo fato de que a concentração de polipeptídeo na composição é de 1 mg/mL a 250 mg/mL e/ou a formulação possui um pH de 4,5 a 7,5.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em um estabilizante, um tampão, e um agente de tonicidade; e/ou a composição é uma formulação farmacêutica adequada para administração a um sujeito.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é uma proteína de fusão, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo multiespecífico, anticorpo glicomanipulado ("glycoengineered"), fragmento de anticorpo ou um conjugado de anticorpo-fármaco.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o material de cromatografia de

troca catiônica de modo misto compreende um polímero de troca catiônica forte de fase reversa; e/ou o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto compreende uma porção de ácido sulfônico.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado pelo fato de que o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto ou o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto compreende um suporte sólido.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto ou o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto está contido em uma coluna.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que o material de cromatografia de troca aniônica de modo misto ou o material de cromatografia de troca catiônica de modo misto é um material de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, caracterizado pelo fato de que o detergente não iônico é quantificado por Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) ou pelo uso de um Detector de Aerossol Carregado (CAD).

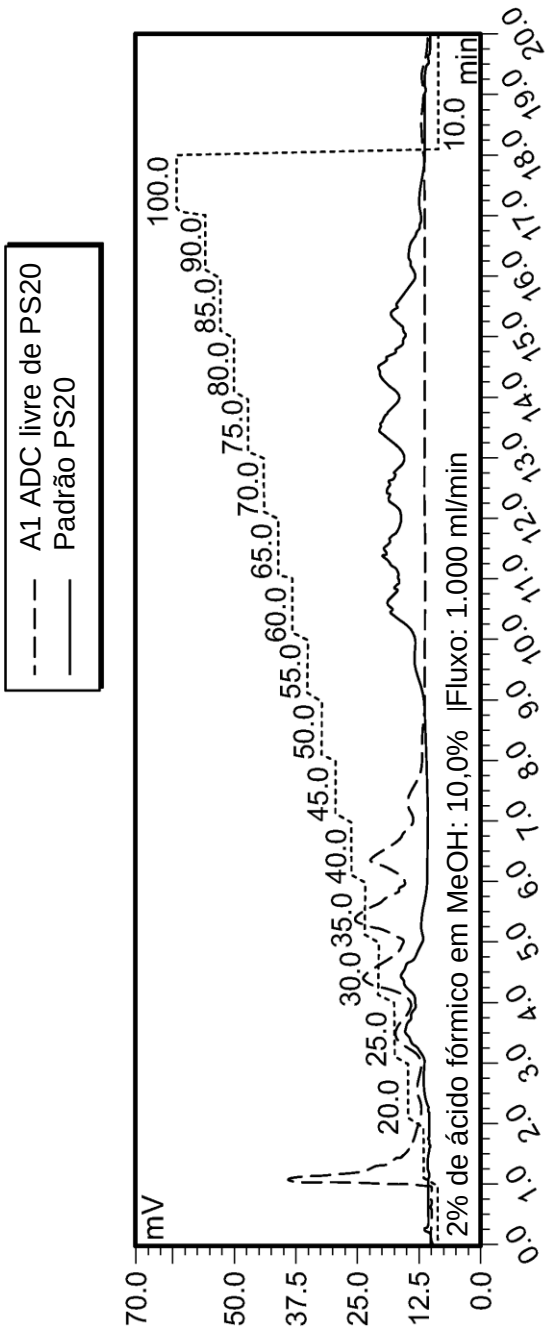

A1 ADC livre de PS20
Padrão PS20
mV
70.0
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
100.0
90.0
85.0
80.0
75.0
70.0
65.0
60.0
55.0
50.0
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
2% de ácido fórmico em MeOH: 10,0% |Fluxo: 1.000 ml/min
10.0 min

FIG. 1

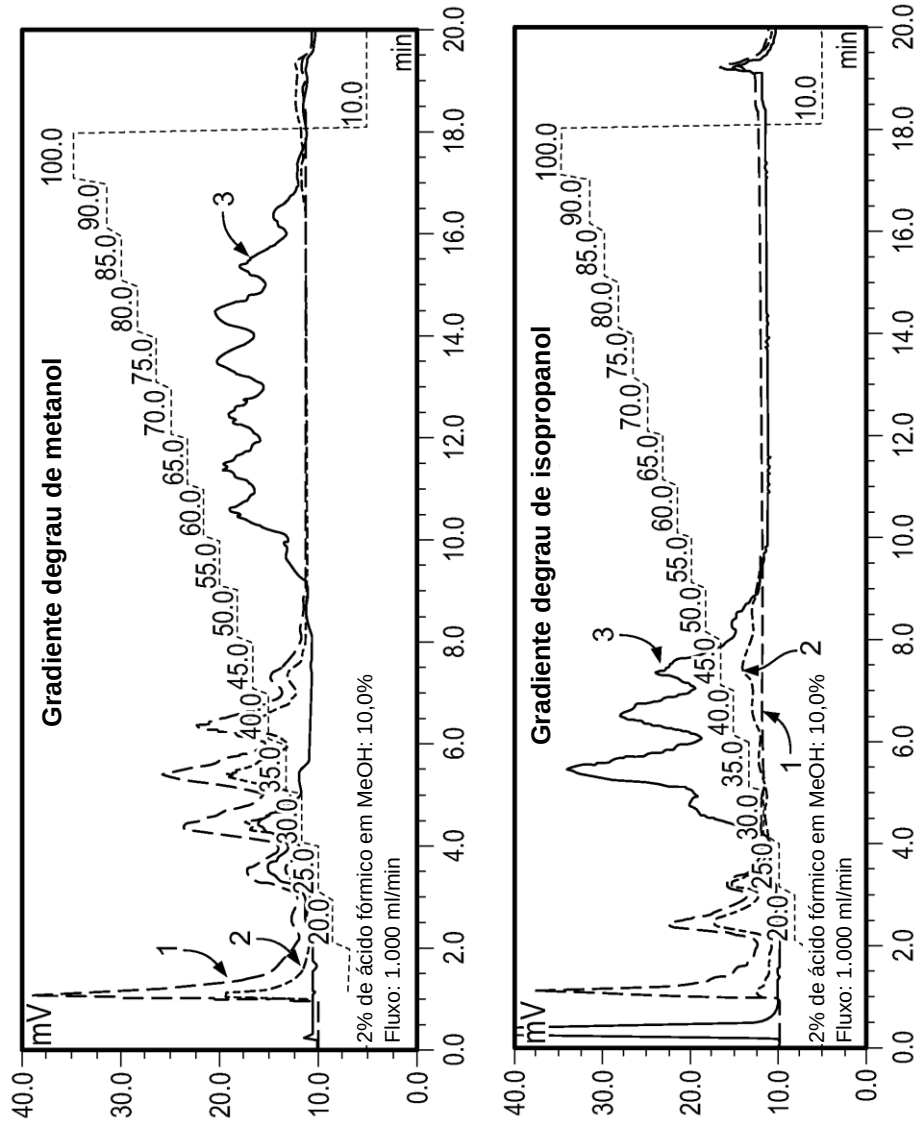

Gradiente degrau de metanol
mV
min
2% de ácido fórmico em MeOH: 10,0%
Fluxo: 1.000 ml/min
Gradiente degrau de isopropanol
mV
min
2% de ácido fórmico em MeOH: 10,0%
Fluxo: 1.000 ml/min

FIG. 2

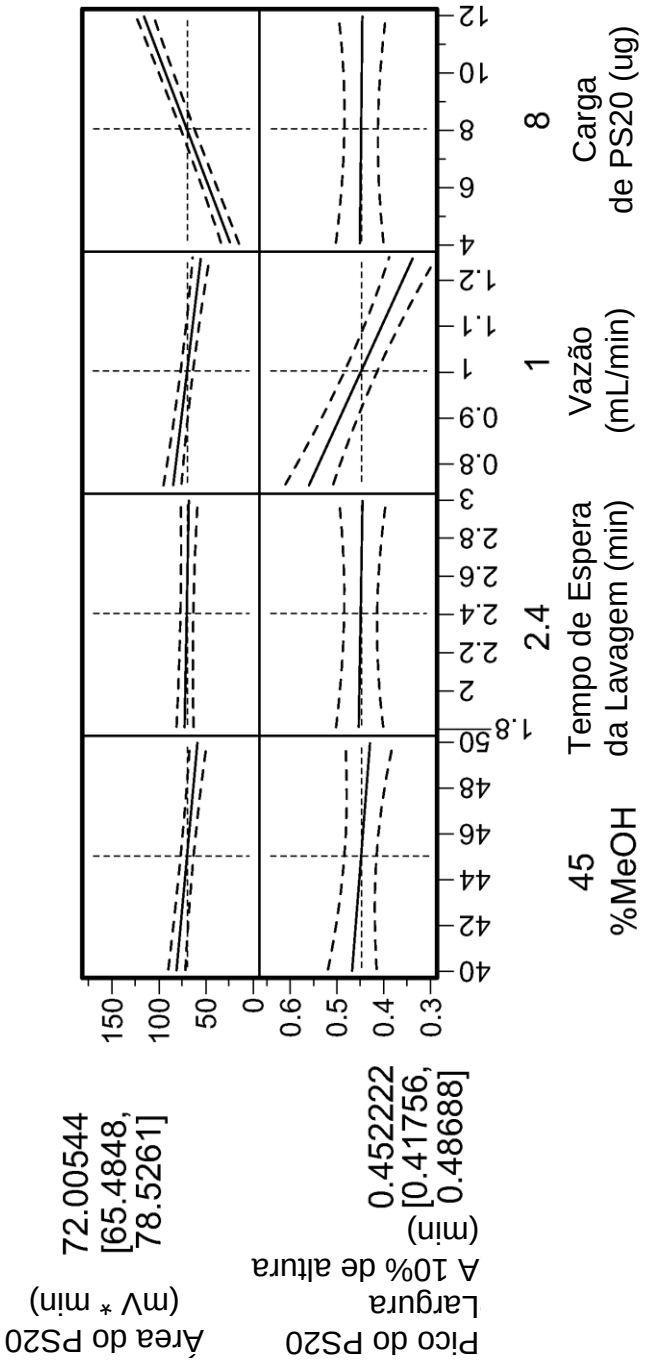

Área do PS20
(mV * min)
72.00544
[65.4848,
78.5261]
Pico do PS20
Largura
A 10% de altura
(min)
0.452222
[0.41756,
0.48688]
%MeOH
45
Tempo de Espera
da Lavagem (min)
2.4
Vazão
(mL/min)
1
Carga
de PS20 (ug)
8

FIG. 3

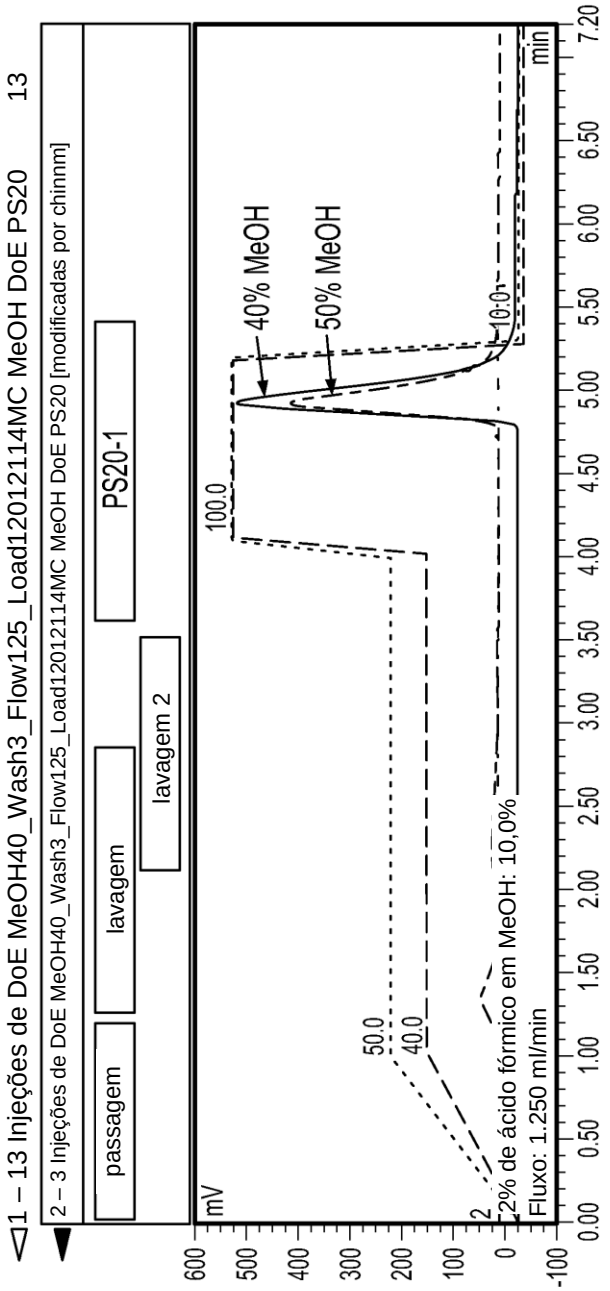

1 – 13 Injeções de DoE MeOH40_Wash3_Flow125_Load12012114MC MeOH DoE PS20 13
2 – 3 Injeções de DoE MeOH40_Wash3_Flow125_Load12012114MC MeOH DoE PS20 [modificadas por chinnm]
passagem
lavagem
lavagem 2
PS20-1
mV
600
500
400
300
200
100
0
-100
100.0
50.0
40.0
2
10:0
40% MeOH
50% MeOH
2% de ácido fórmico em MeOH: 10,0%
Fluxo: 1.250 ml/min
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.20
min

FIG. 4

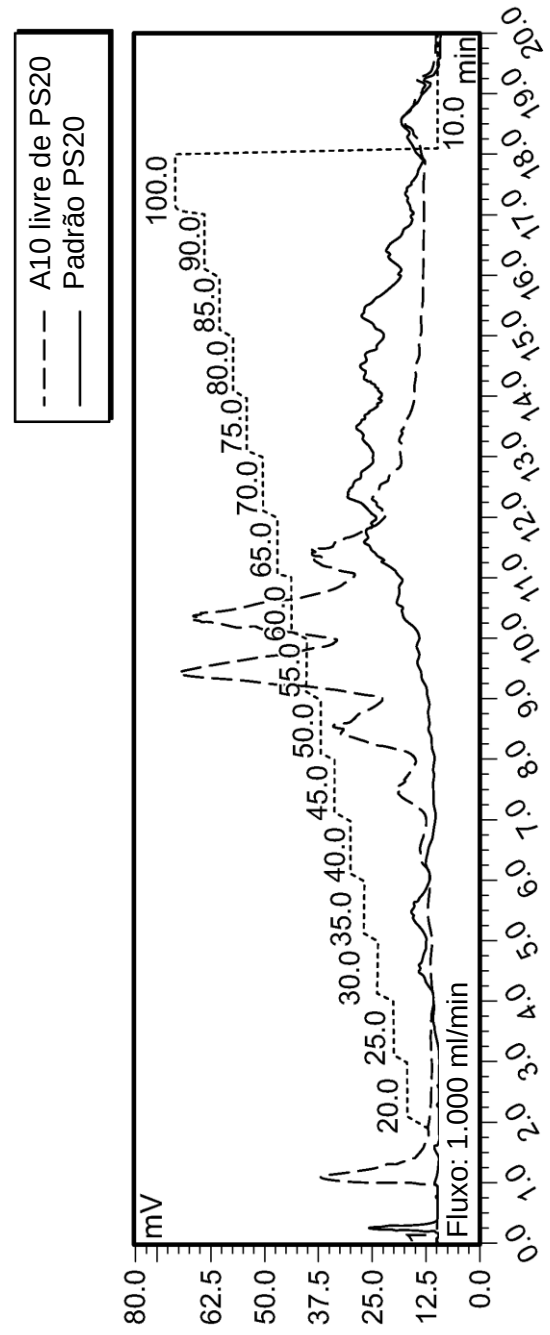

A10 livre de PS20
Padrão PS20
mV
80.0
62.5
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
Fluxo: 1.000 ml/min
min
100.0
90.0
85.0
80.0
75.0
70.0
65.0
60.0
55.0
50.0
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
10.0

FIG. 5

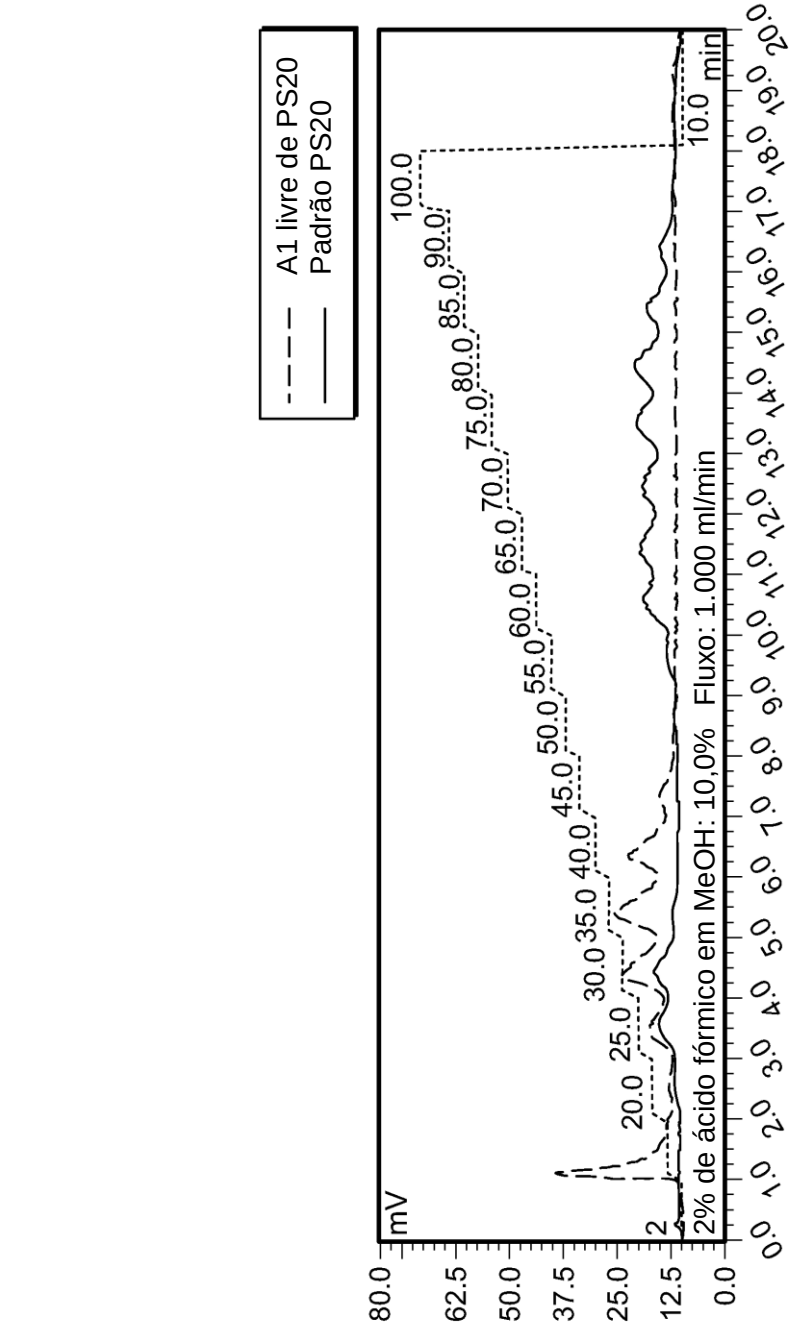

A1 livre de PS20
Padrão PS20
mV
80.0
62.5
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
2% de ácido fórmico em MeOH: 10,0% Fluxo: 1.000 ml/min
10.0 min

FIG. 6

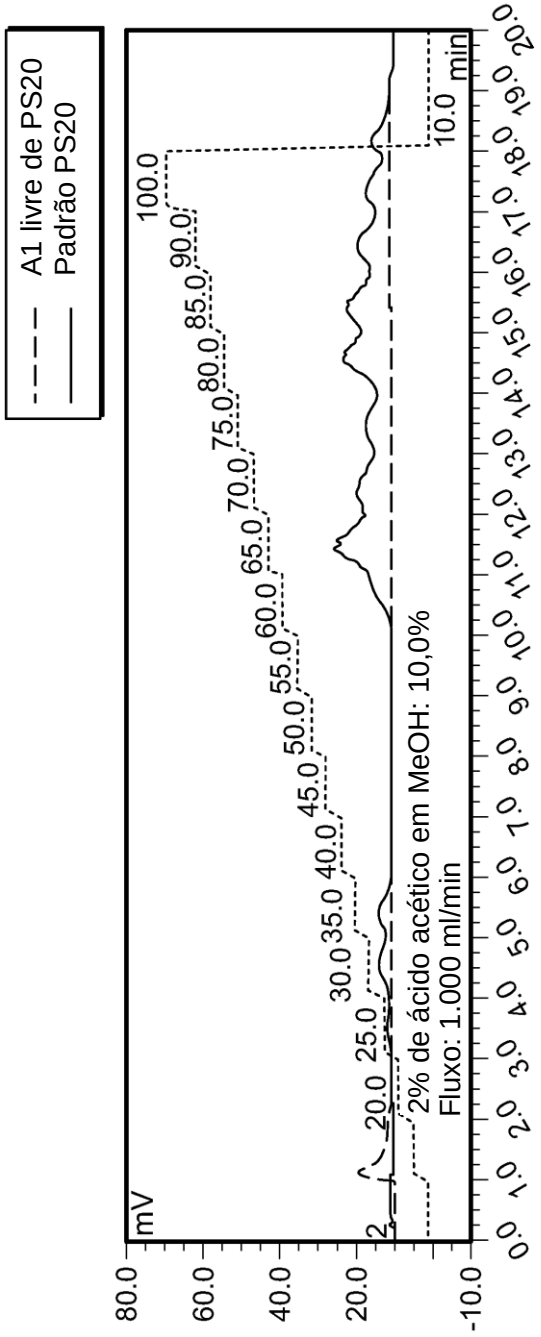

A1 livre de PS20
Padrão PS20
mV
80.0
60.0
40.0
20.0
-10.0
100.0
90.0
85.0
80.0
75.0
70.0
65.0
60.0
55.0
50.0
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
2
2% de ácido acético em MeOH: 10,0%
Fluxo: 1.000 ml/min
10.0 min
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
11.0
12.0
13.0
14.0
15.0
16.0
17.0
18.0
19.0
20.0

FIG. 7

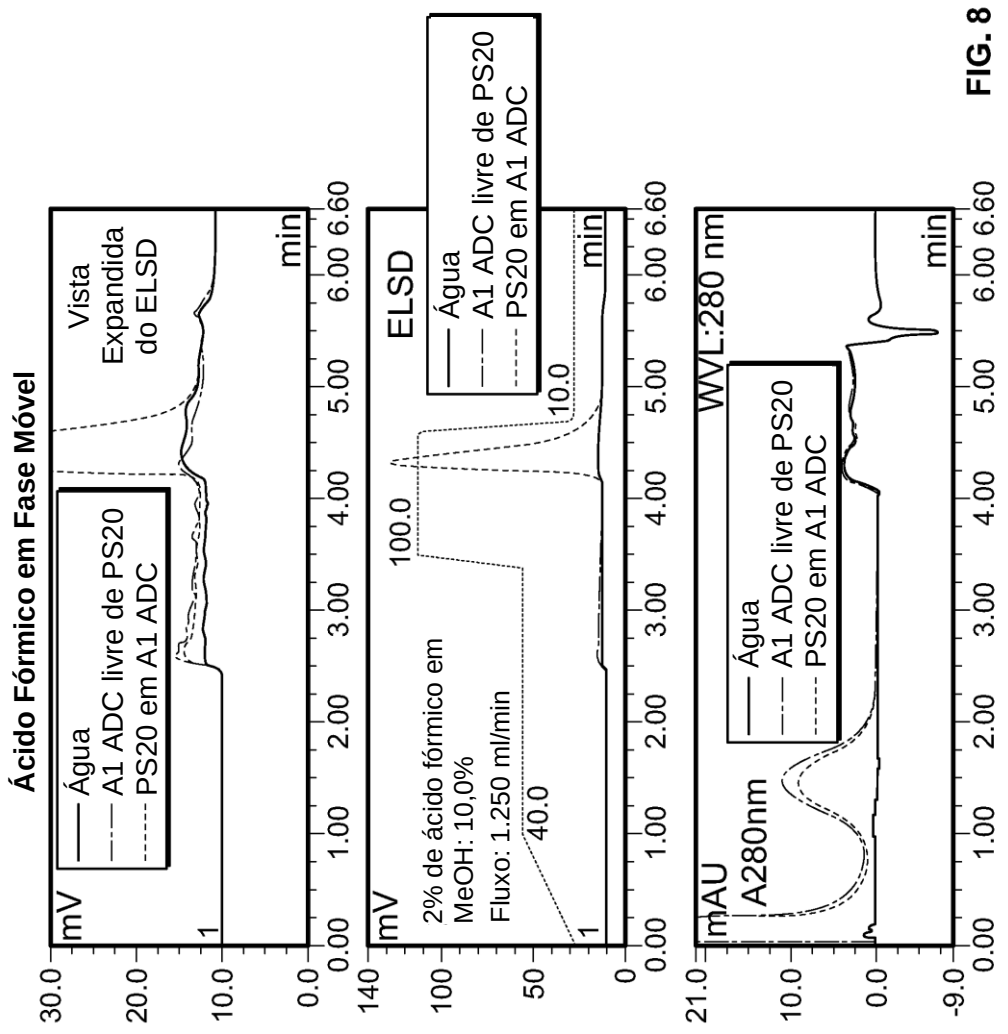

Ácido Fórmico em Fase Móvel
Vista Expandida do ELSD
Água
A1 ADC livre de PS20
PS20 em A1 ADC
mV
min
ELSD
2% de ácido fórmico em MeOH: 10,0%
Fluxo: 1.250 ml/min
100.0
40.0
10.0
mAU
A280nm
WVL:280 nm

FIG. 8

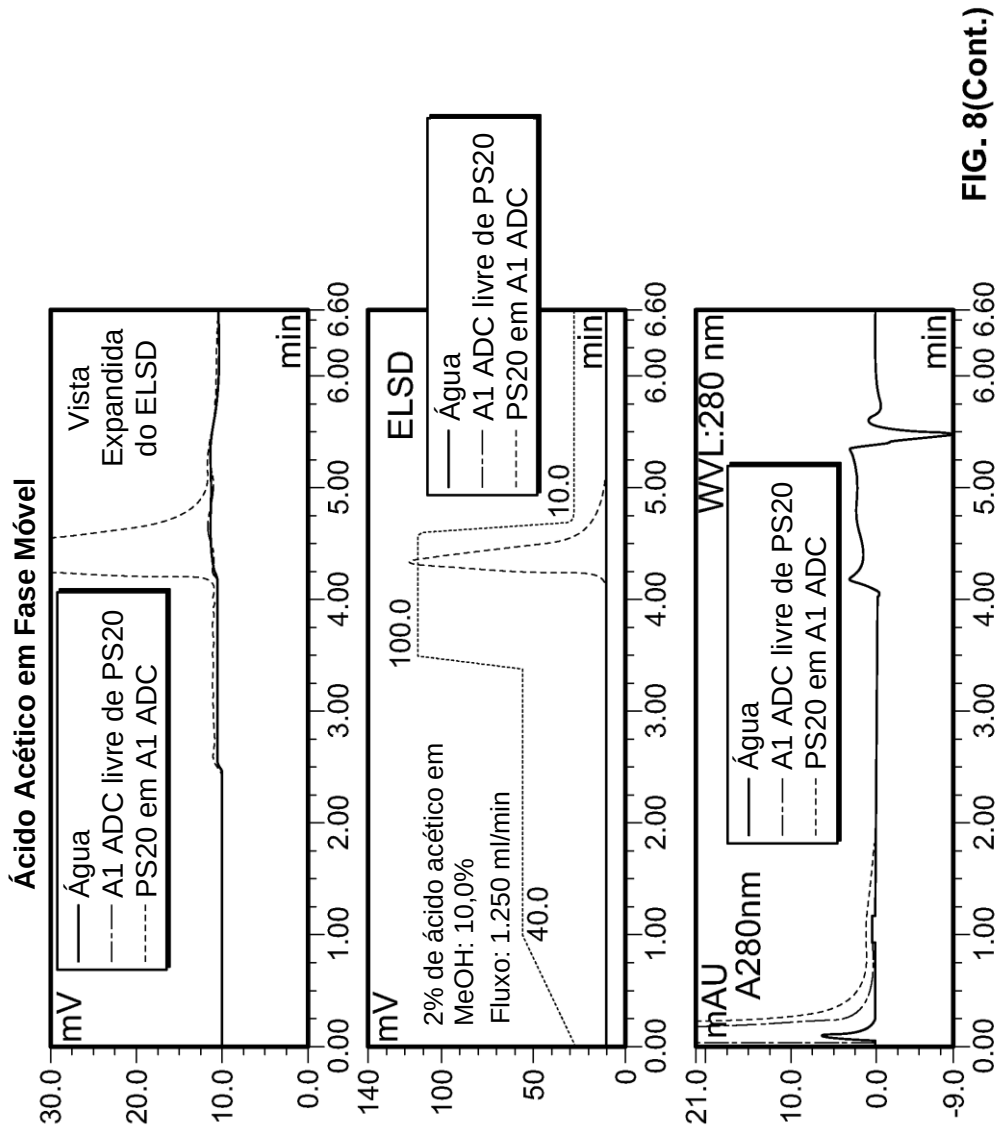

Ácido Acético em Fase Móvel
mV
Água
A1 ADC livre de PS20
PS20 em A1 ADC
Vista Expandida do ELSD
min
ELSD
2% de ácido acético em MeOH: 10,0%
Fluxo: 1.250 ml/min
100.0
40.0
10.0
mAU
A280nm
WVL:280 nm

FIG. 8(Cont.)

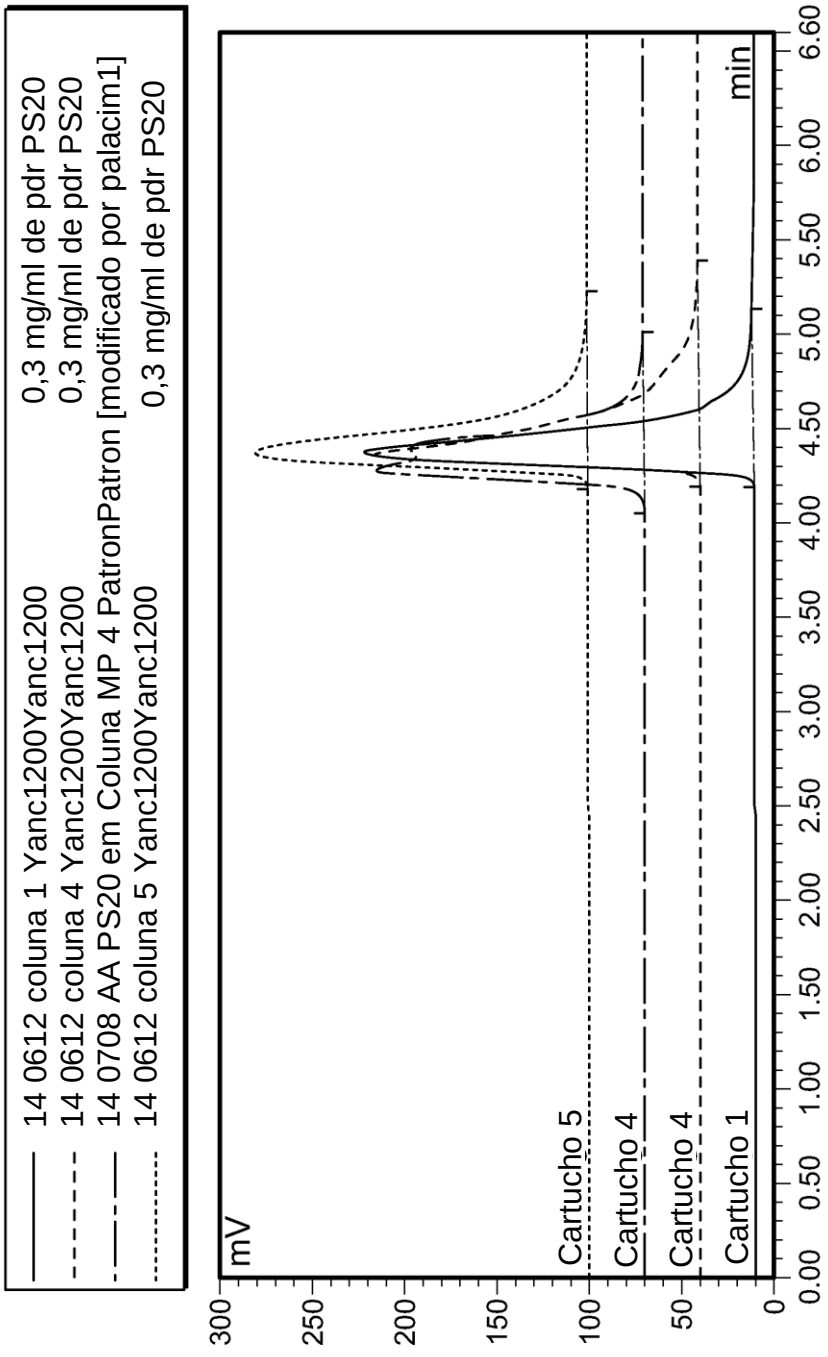

14 0612 coluna 1 Yanc1200Yanc1200 0,3 mg/ml de pdr PS20
14 0612 coluna 4 Yanc1200Yanc1200 0,3 mg/ml de pdr PS20
14 0708 AA PS20 em Coluna MP 4 PatronPatron [modificado por palacim1]
14 0612 coluna 5 Yanc1200Yanc1200 0,3 mg/ml de pdr PS20
mV
min
Cartucho 5
Cartucho 4
Cartucho 4
Cartucho 1
300
250
200
150
100
50
0
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.60

FIG. 9

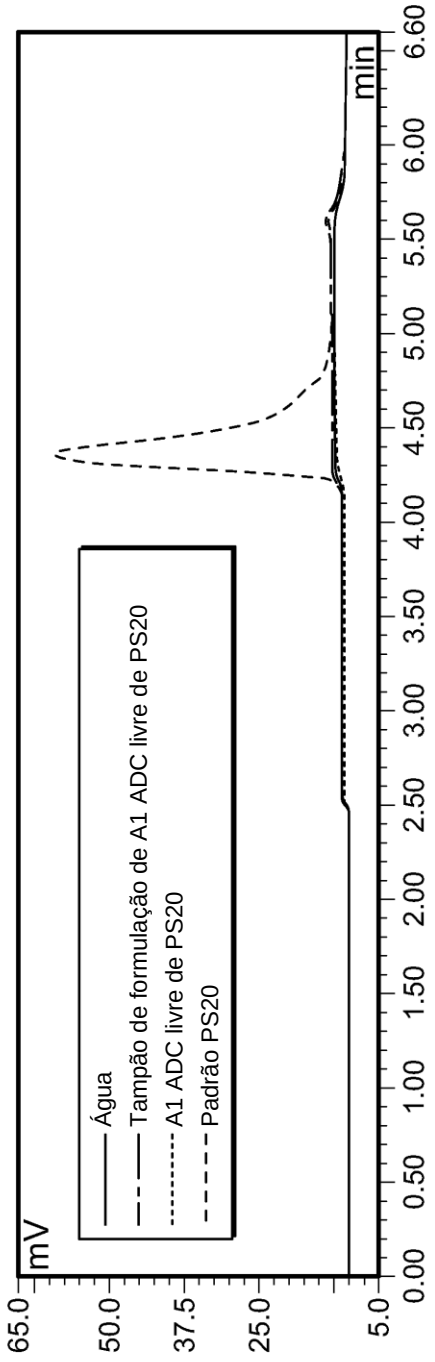

mV
65.0
50.0
37.5
25.0
5.0
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.60
min
Água
Tampão de formulação de A1 ADC livre de PS20
A1 ADC livre de PS20
Padrão PS20

FIG. 10

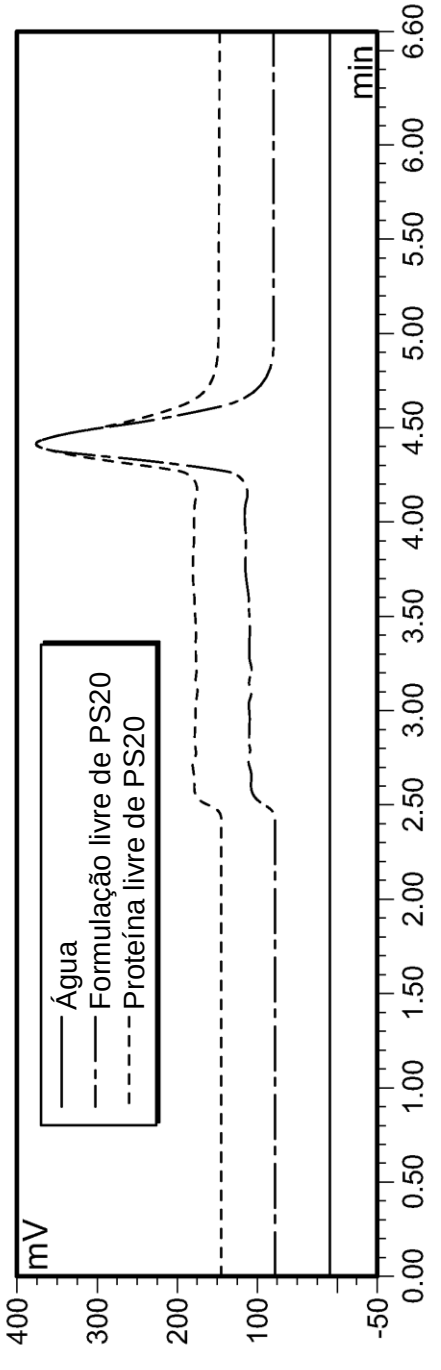


FIG. 11A

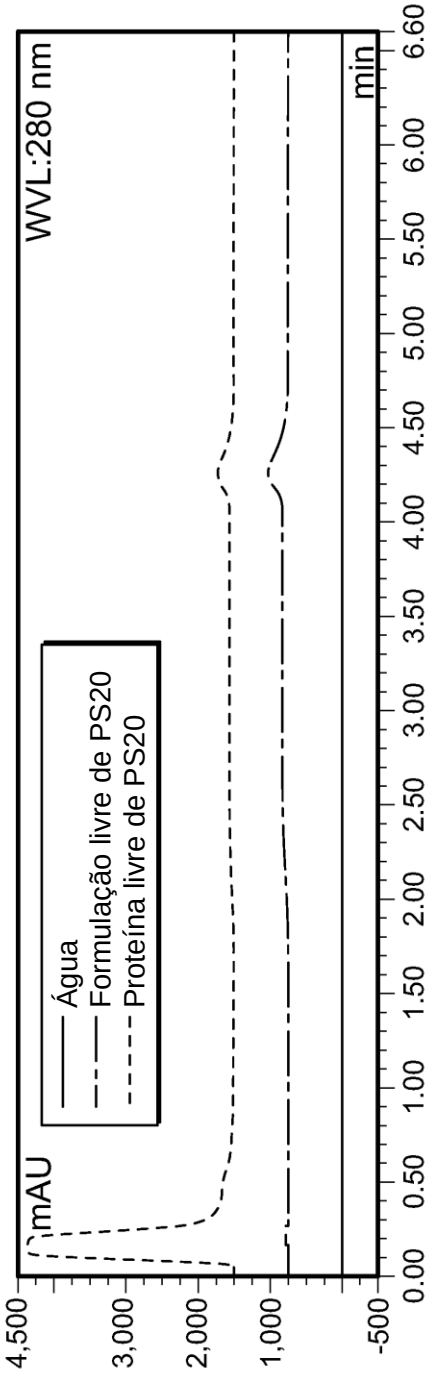


FIG. 11B

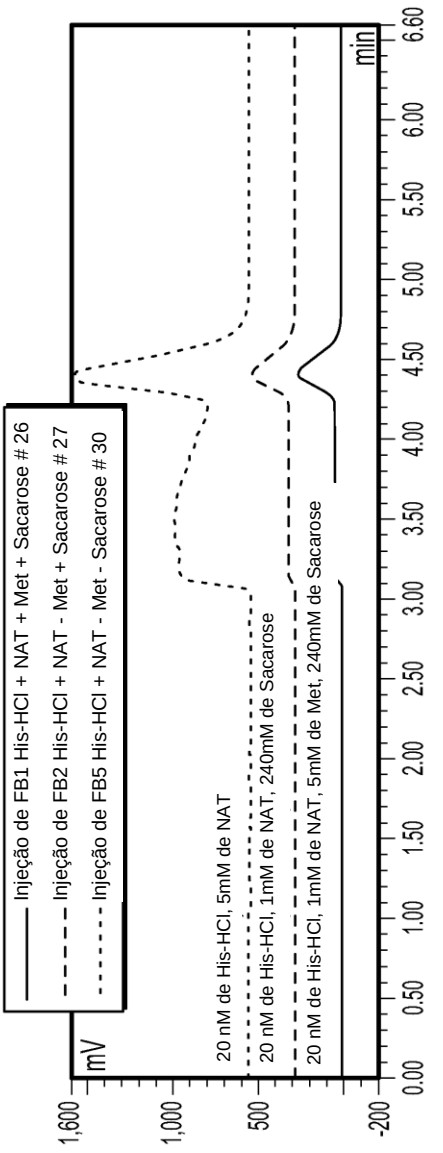


FIG. 12A

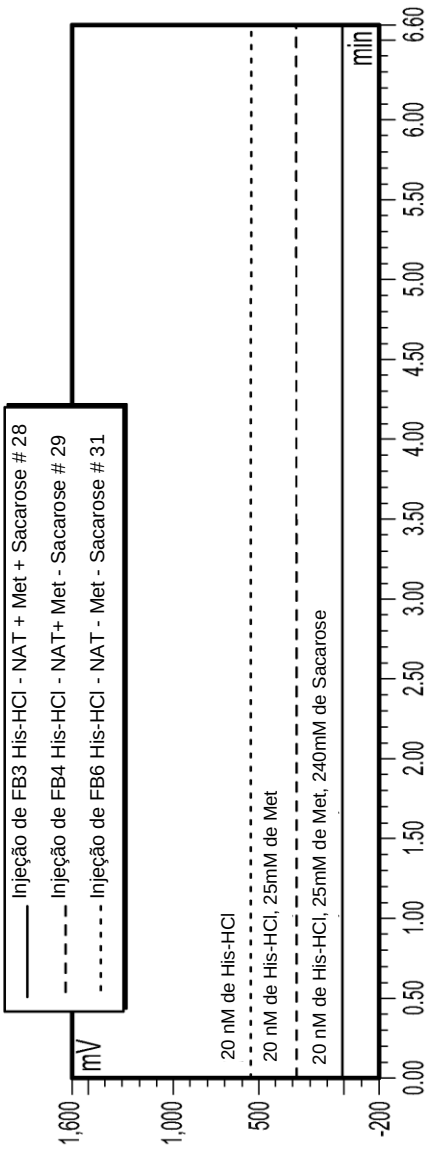


FIG. 12B

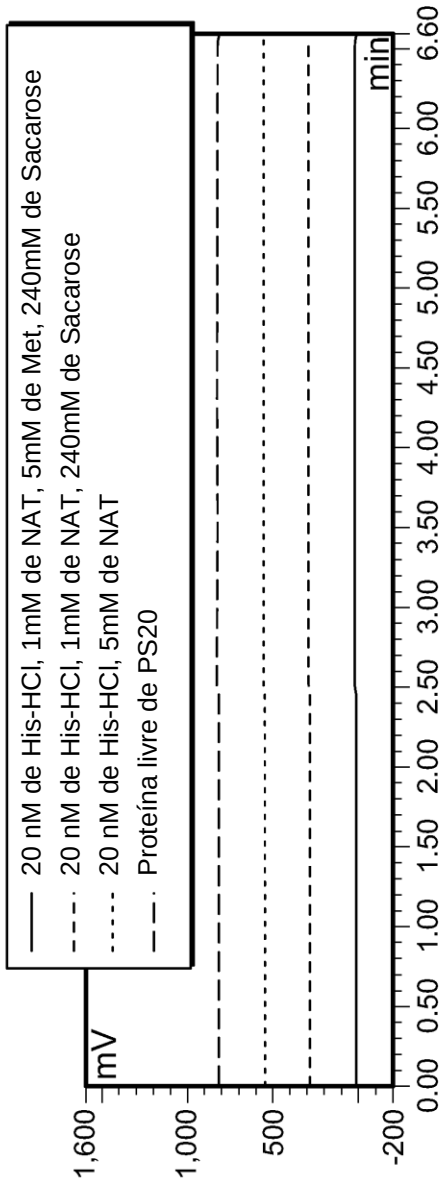


FIG. 13A

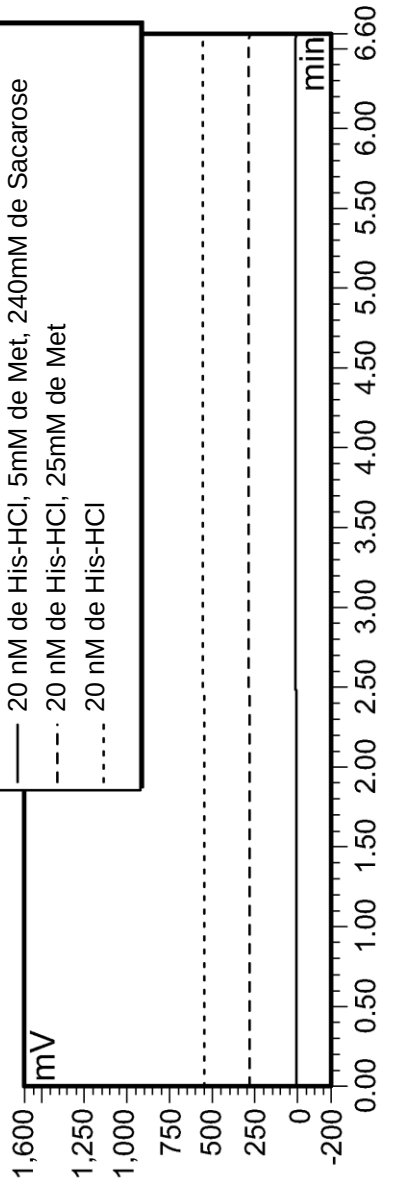


FIG. 13B

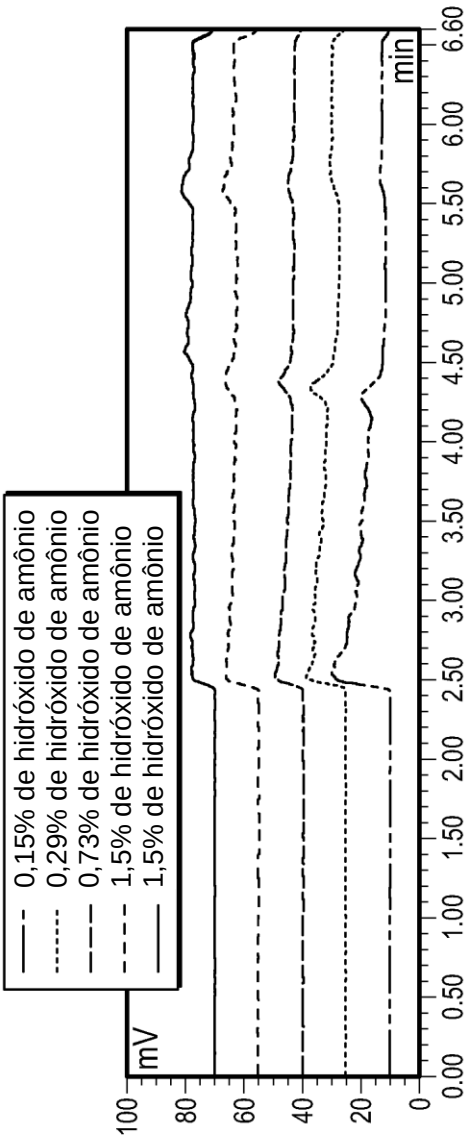


FIG. 14A

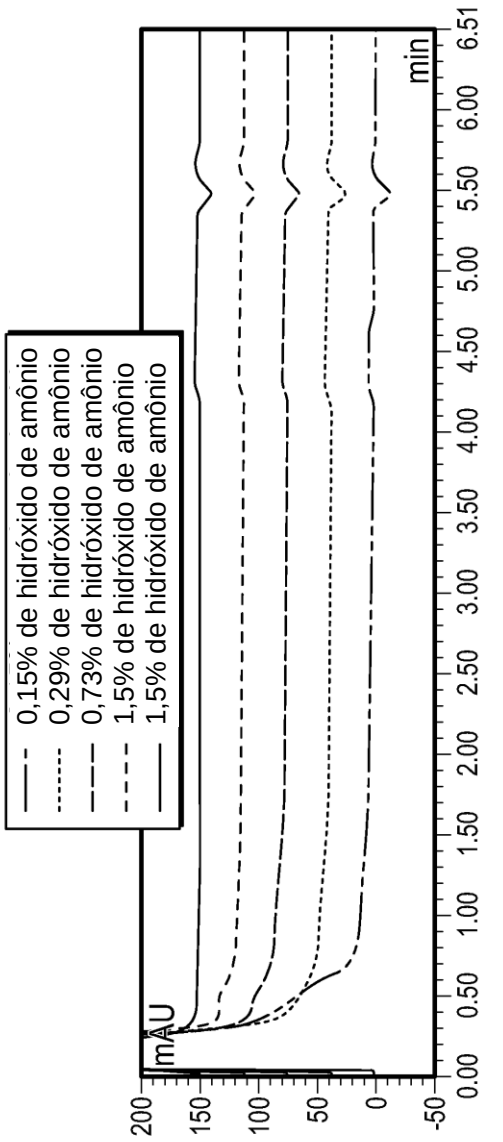


FIG. 14B

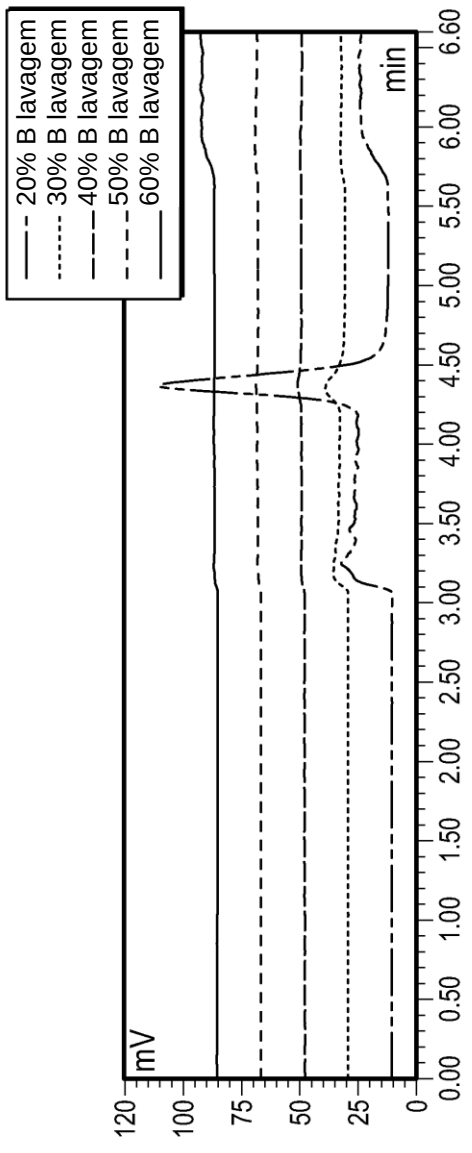


FIG. 15A

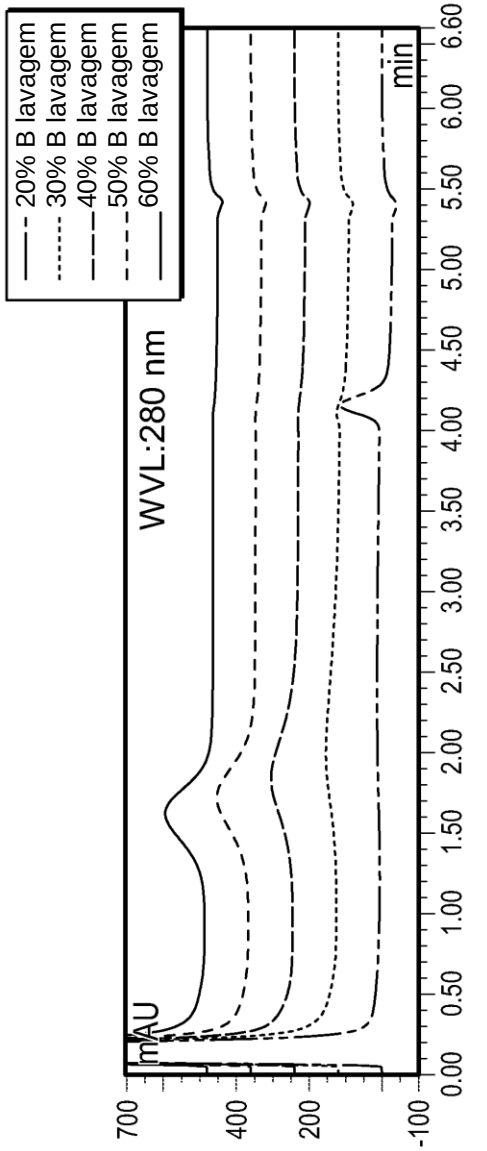


FIG. 15B

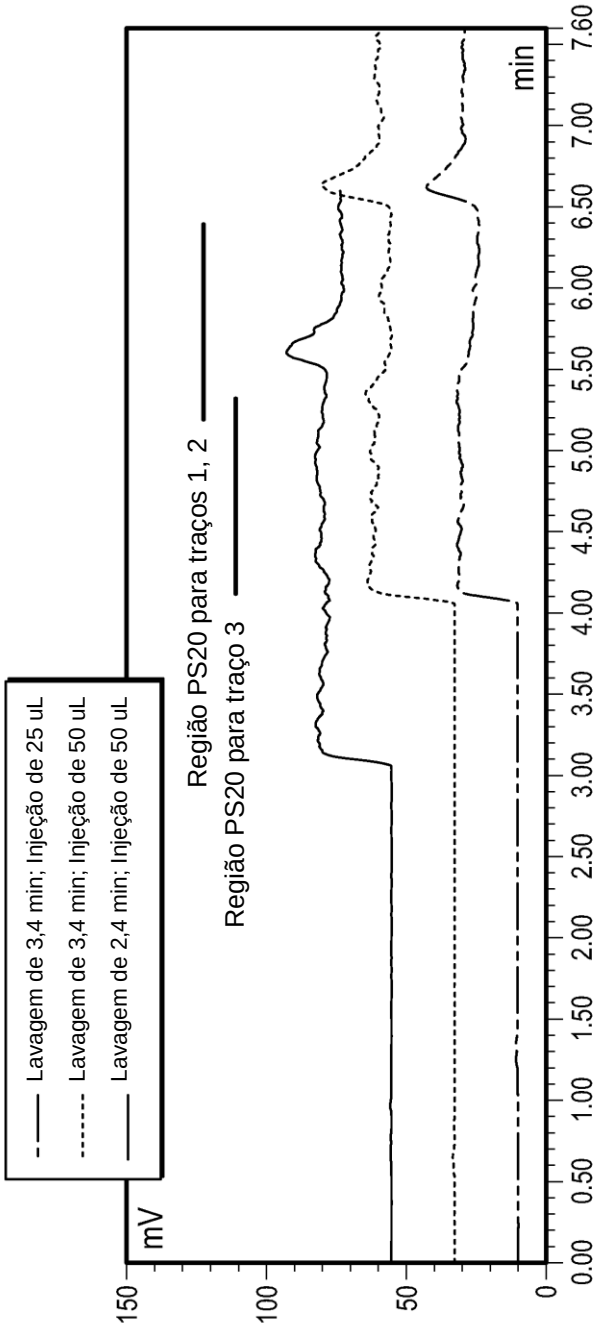

Lavagem de 3,4 min; Injeção de 25 uL
Lavagem de 3,4 min; Injeção de 50 uL
Lavagem de 2,4 min; Injeção de 50 uL
Região PS20 para traços 1, 2
Região PS20 para traço 3
mV
150
100
50
0
min
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.60

FIG. 16

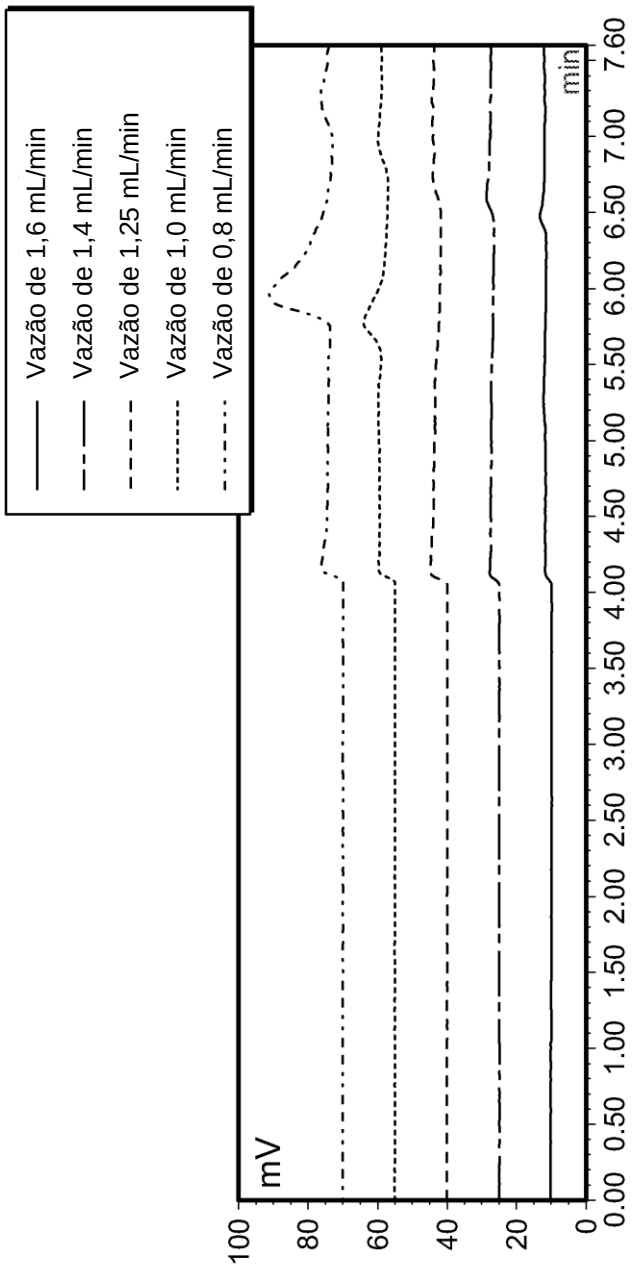

Vazão de 1,6 mL/min
Vazão de 1,4 mL/min
Vazão de 1,25 mL/min
Vazão de 1,0 mL/min
Vazão de 0,8 mL/min
mV
100
80
60
40
20
0
min
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.60

FIG. 17A

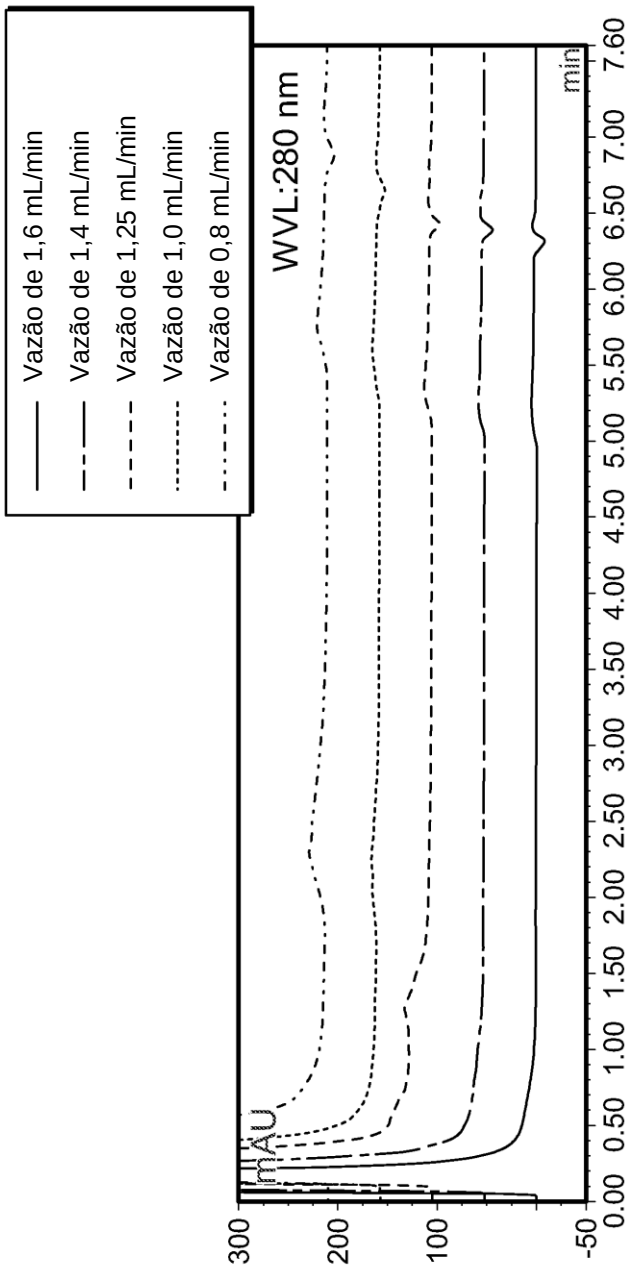

Vazão de 1,6 mL/min
Vazão de 1,4 mL/min
Vazão de 1,25 mL/min
Vazão de 1,0 mL/min
Vazão de 0,8 mL/min
WVL:280 nm
mAU
min
300
200
100
-50
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.60

FIG. 17B

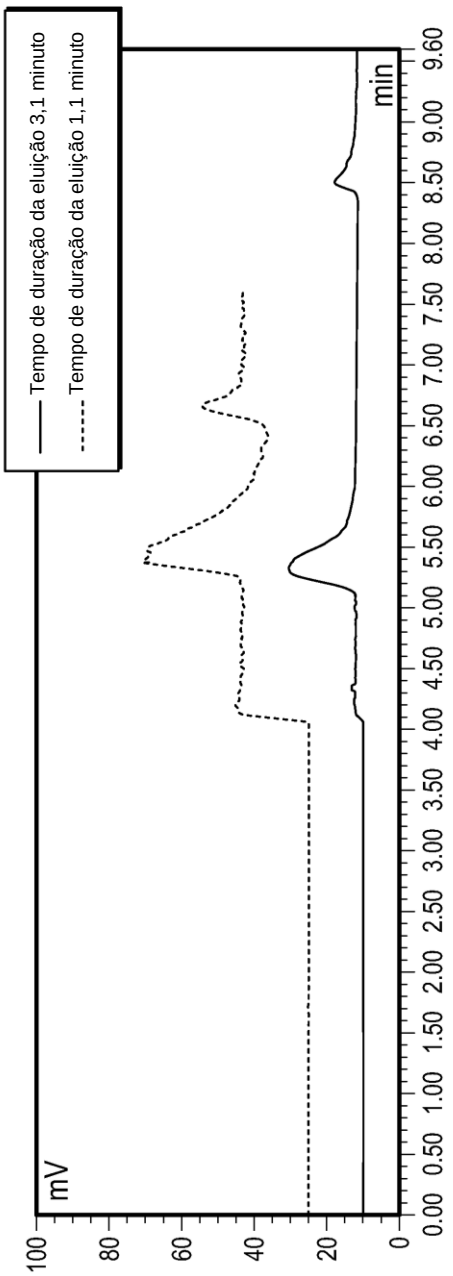

Tempo de duração da eluição 3,1 minuto
Tempo de duração da eluição 1,1 minuto
mV
min
100
80
60
40
20
0
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
9.60

FIG. 18

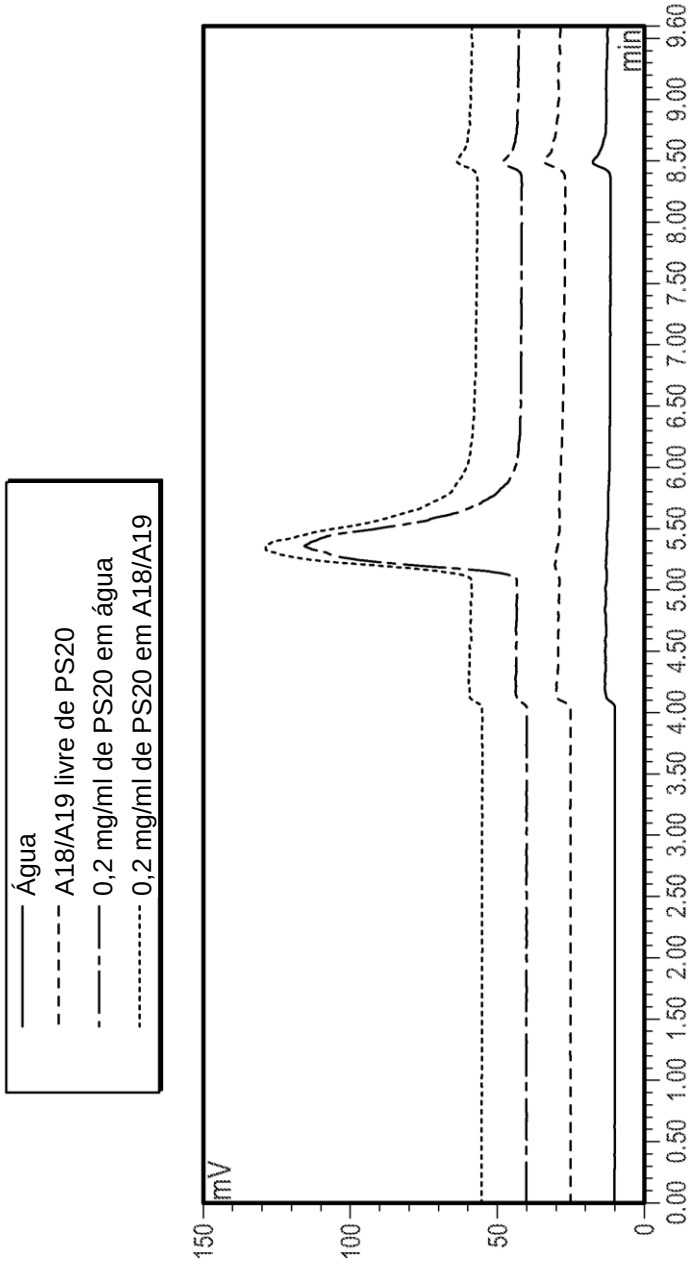

Água
A18/A19 livre de PS20
0,2 mg/ml de PS20 em água
0,2 mg/ml de PS20 em A18/A19
mV
150
100
50
0
min
0.00 0.50 1.00 1.50 2.00 2.50 3.00 3.50 4.00 4.50 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 8.50 9.00 9.60

FIG. 19

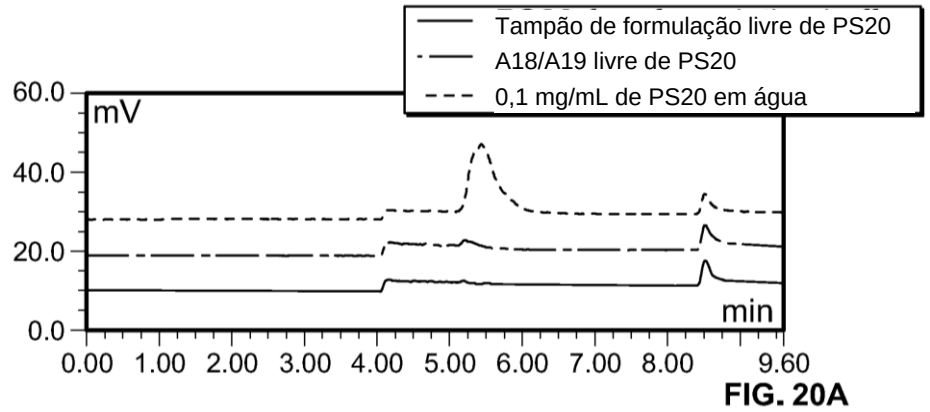


FIG. 20A

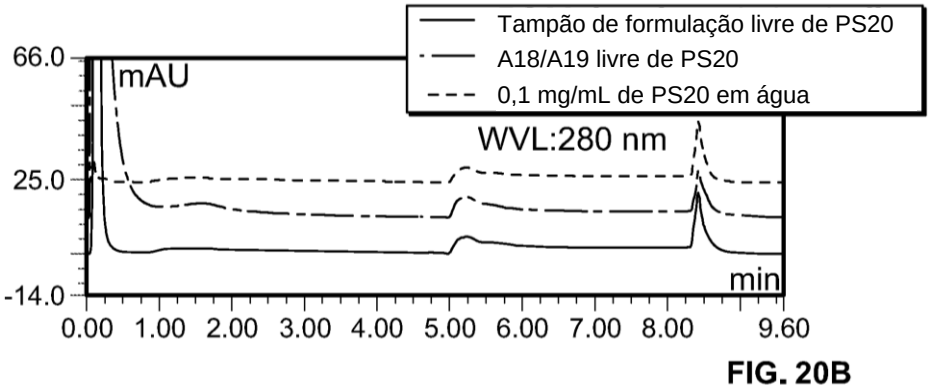


FIG. 20B

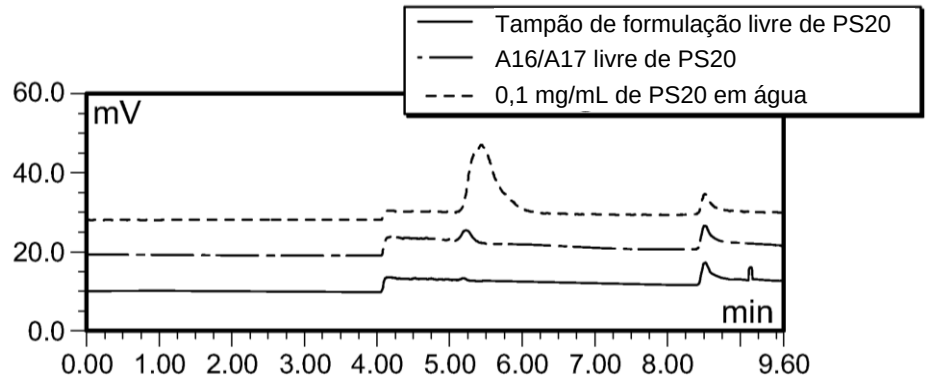


FIG. 20C

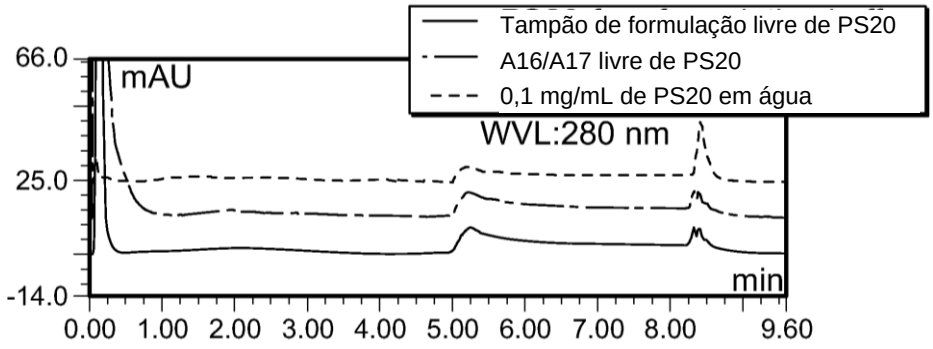


FIG. 20D

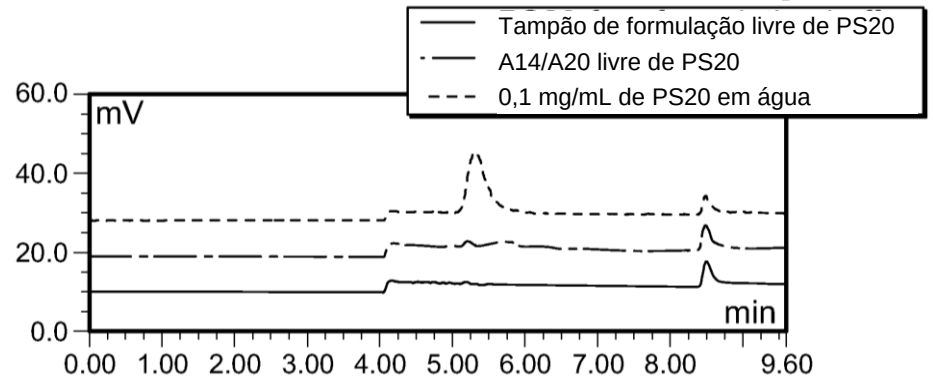


FIG. 20E

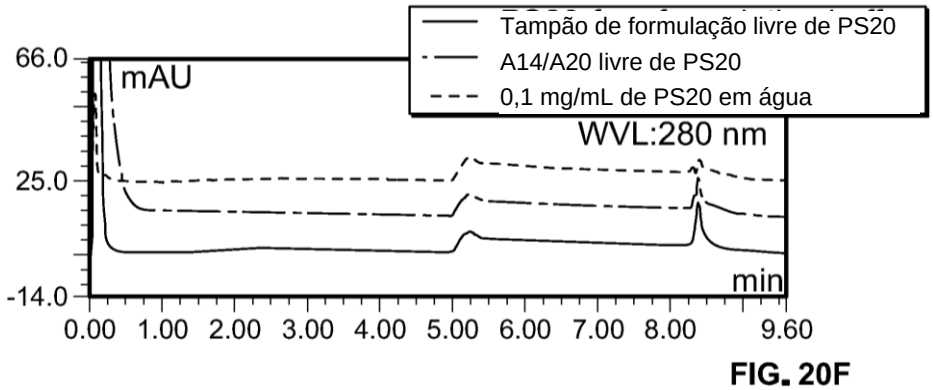


FIG. 20F

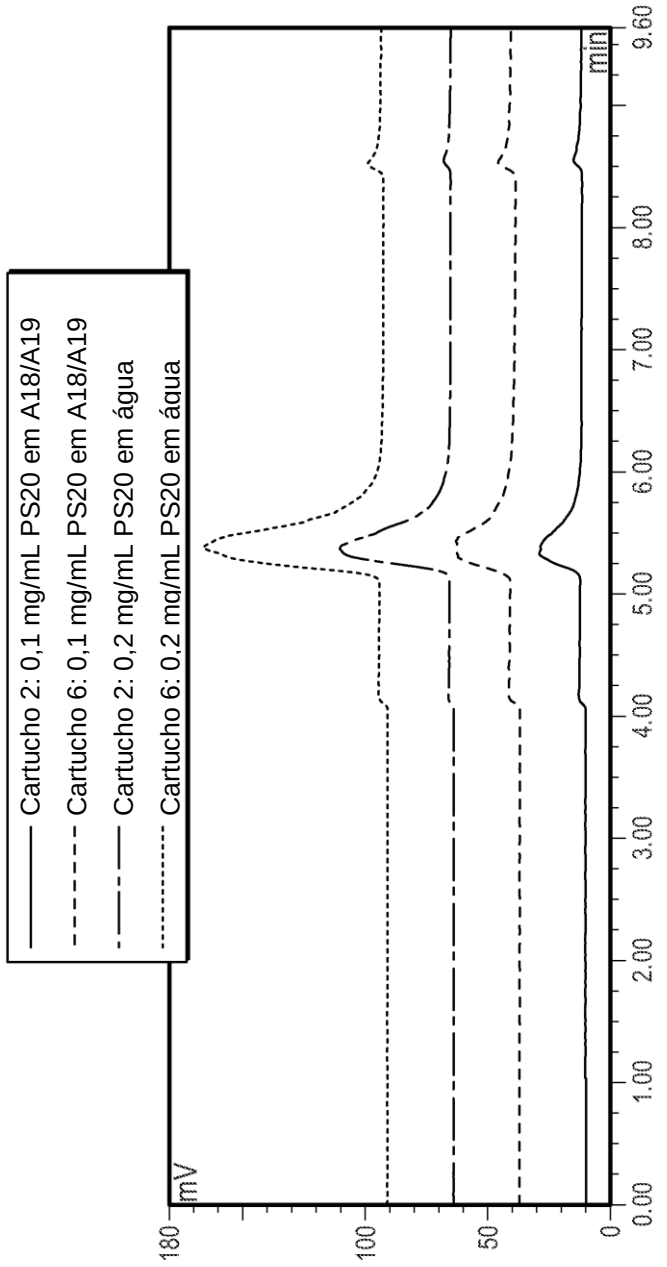

Cartucho 2: 0,1 mg/mL PS20 em A18/A19
Cartucho 6: 0,1 mg/mL PS20 em A18/A19
Cartucho 2: 0,2 mg/mL PS20 em água
Cartucho 6: 0,2 mg/mL PS20 em água
mV
180
100
50
0
min
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.60

FIG. 21

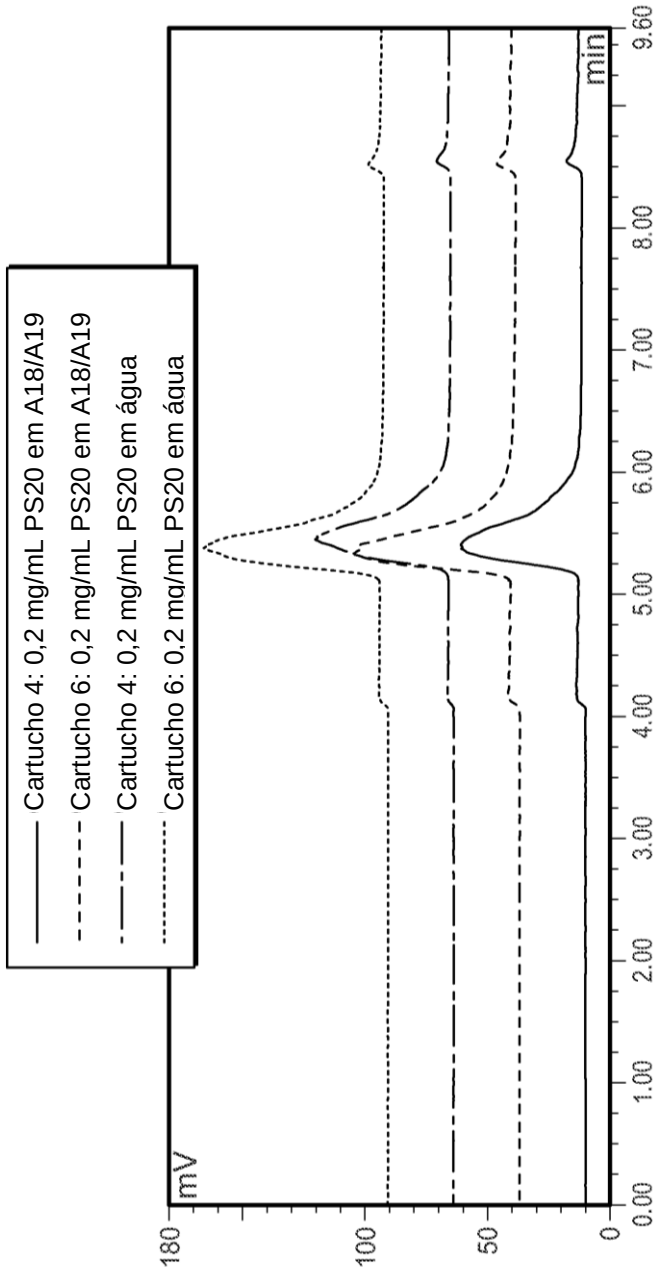

Cartucho 4: 0,2 mg/mL PS20 em A18/A19
Cartucho 6: 0,2 mg/mL PS20 em A18/A19
Cartucho 4: 0,2 mg/mL PS20 em água
Cartucho 6: 0,2 mg/mL PS20 em água
mV
180
100
50
0
min
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.60

FIG. 22

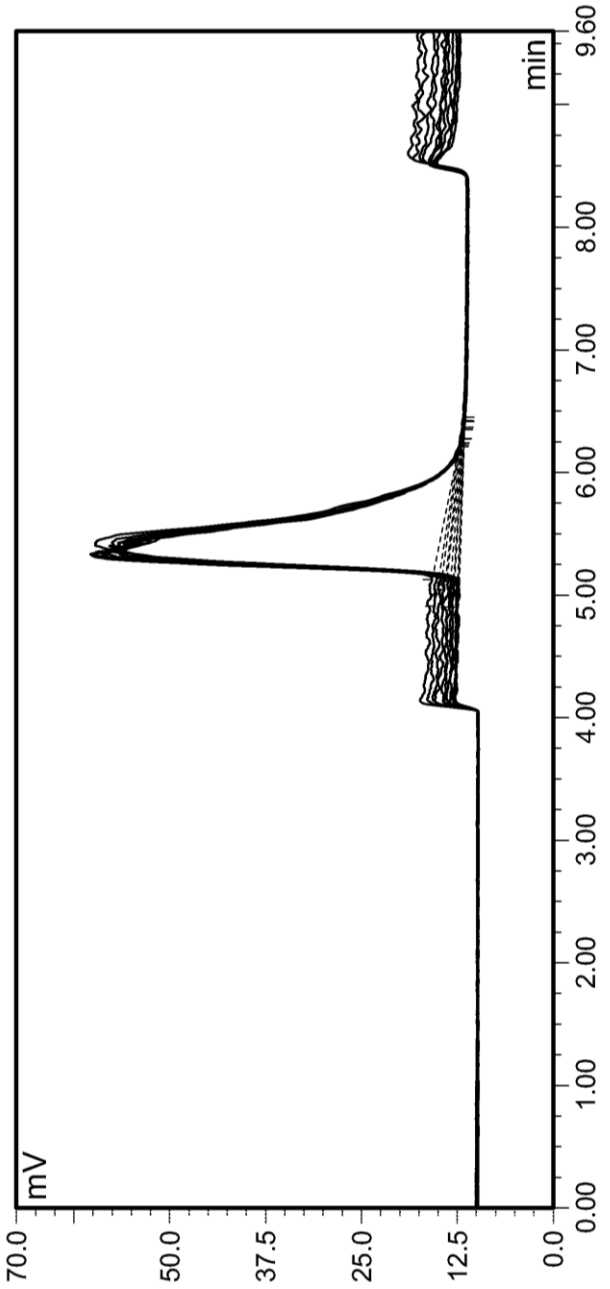

mV
70.0
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
min
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.60

FIG. 23

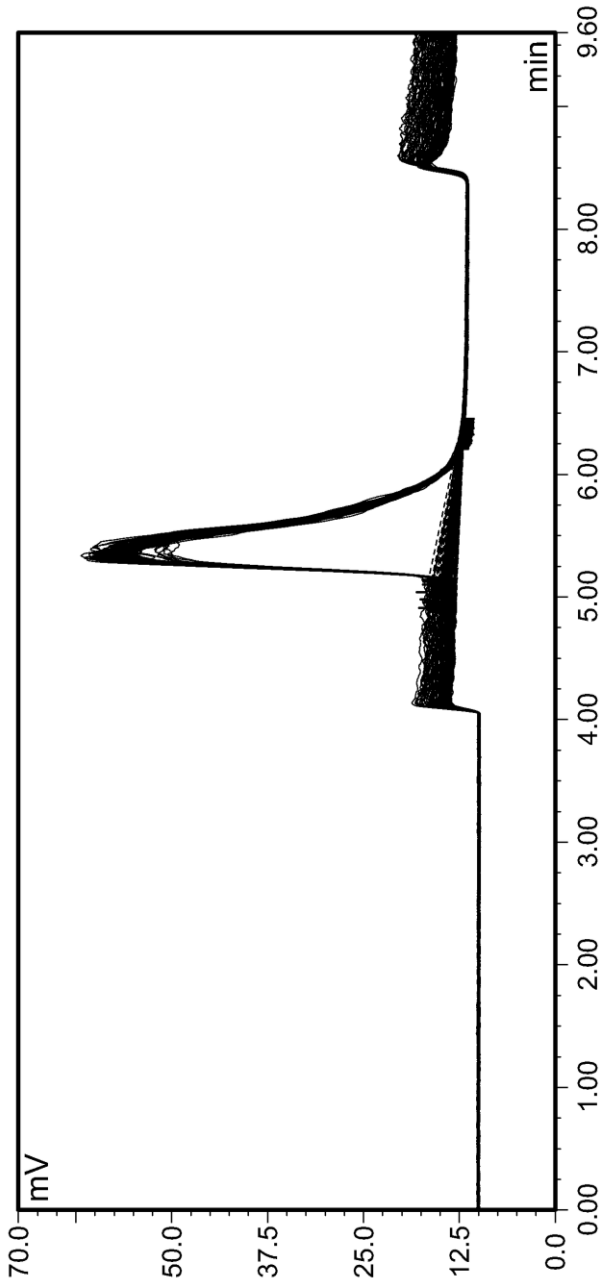

mV
70.0
50.0
37.5
25.0
12.5
0.0
min
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.60

FIG. 24

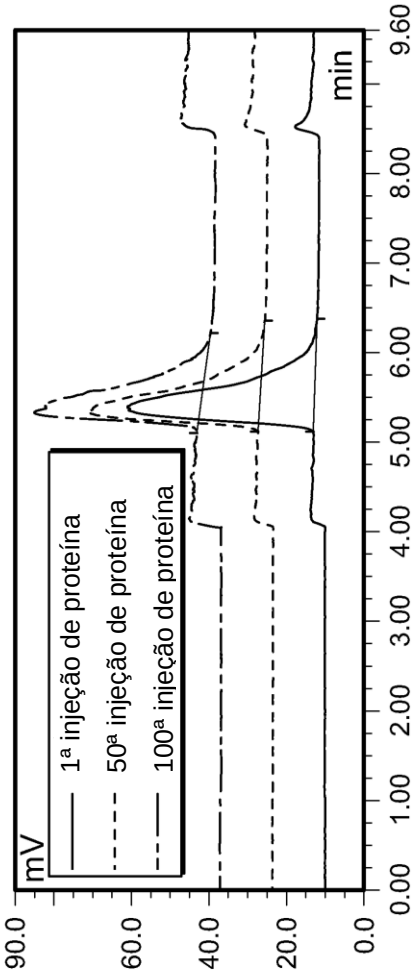


FIG. 25A

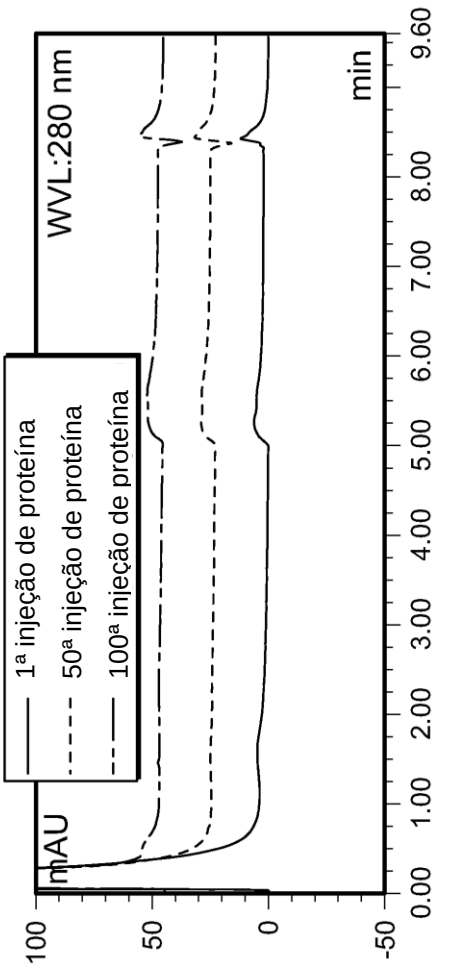


FIG. 25B

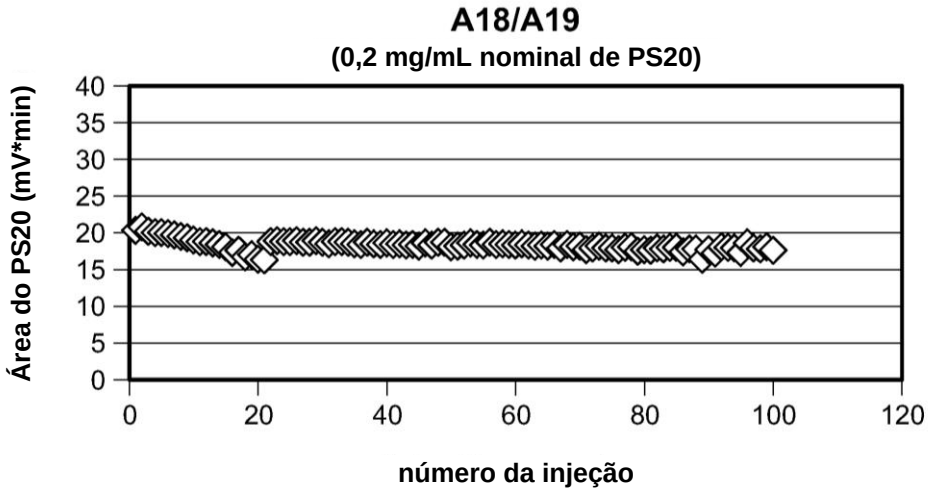


FIG. 26A

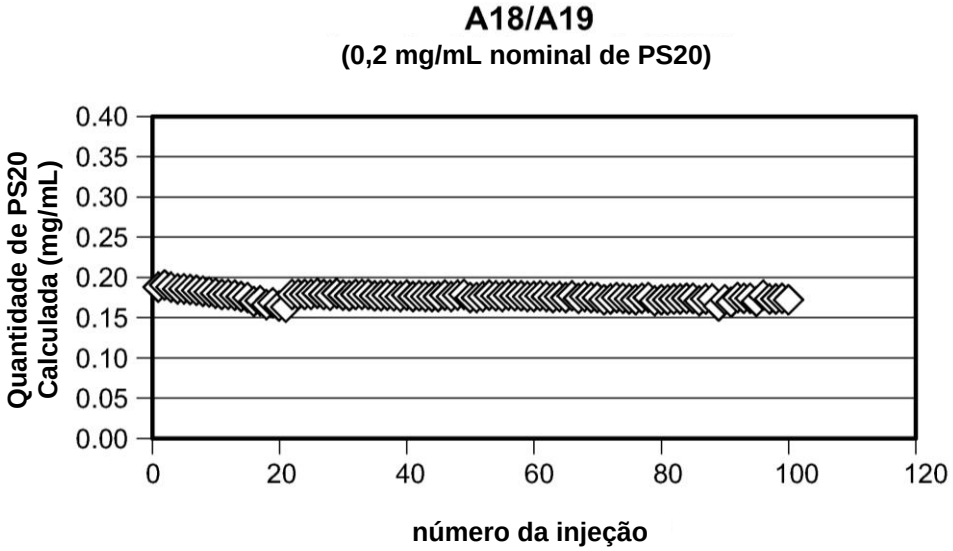


FIG. 26B

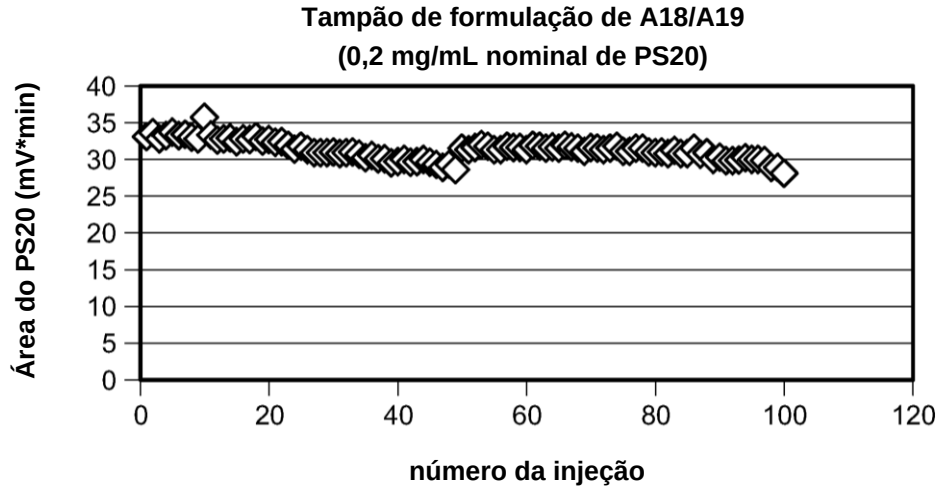


FIG. 27A

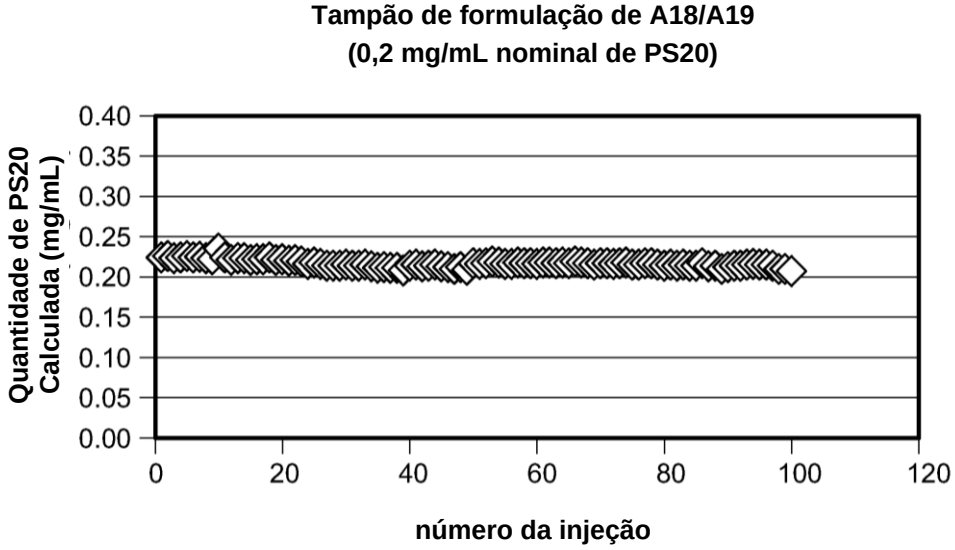


FIG. 27B

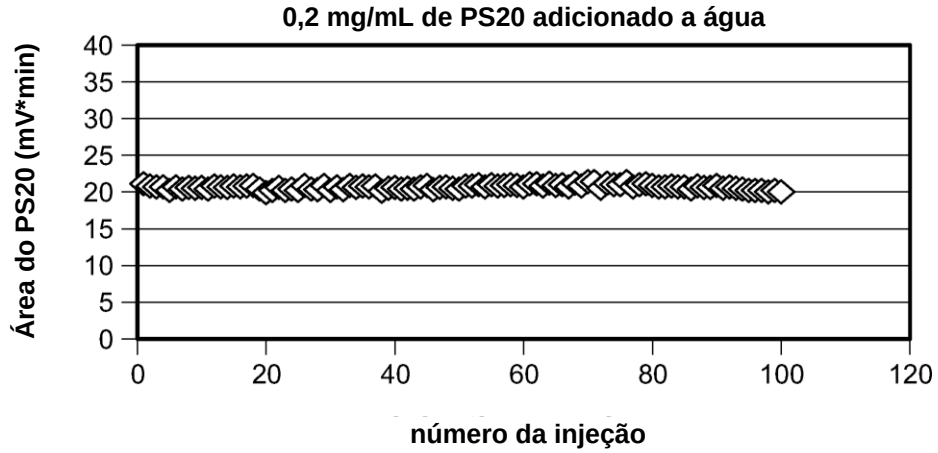


FIG. 28A

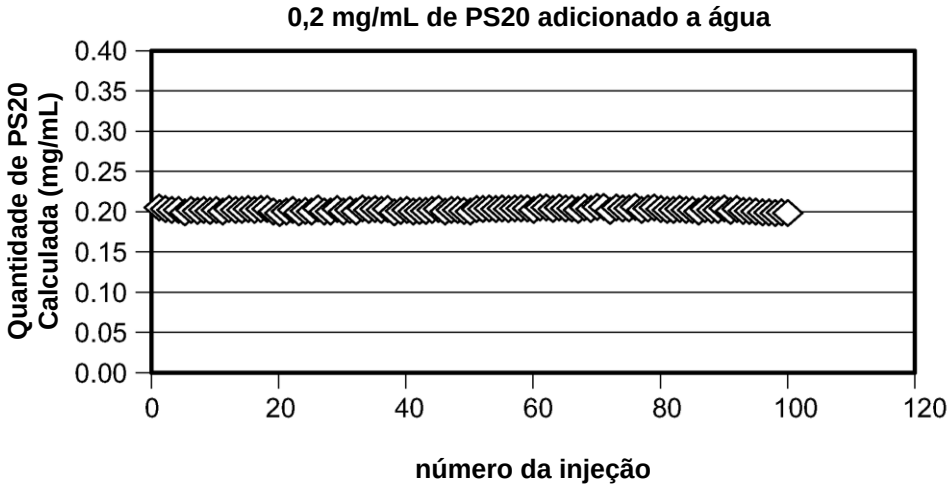


FIG. 28B

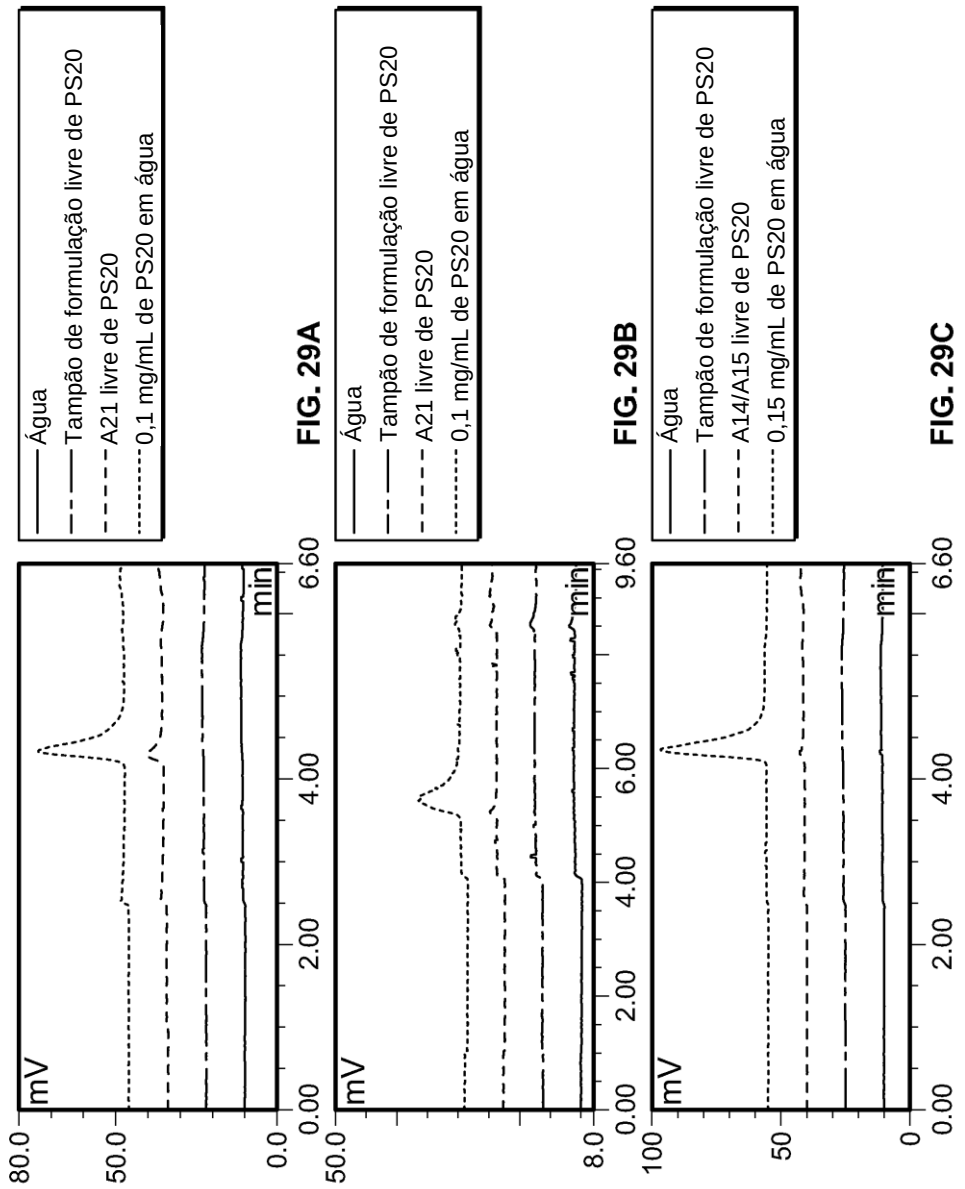


FIG. 29A

FIG. 29B

FIG. 29C

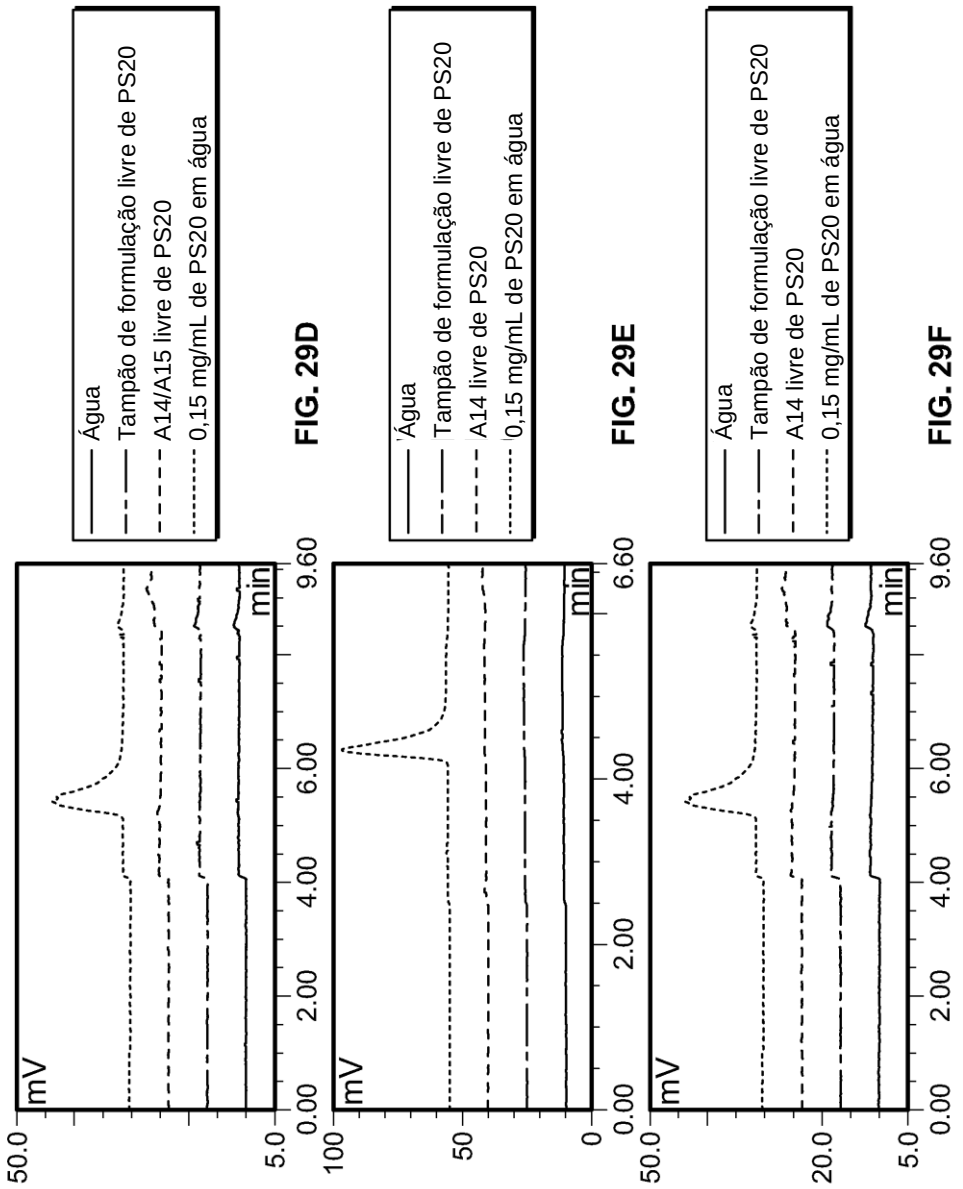


FIG. 29D

FIG. 29E

FIG. 29F