



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104487823 B

(45)授权公告日 2017.02.22

(21)申请号 201380026314.2

(22)申请日 2013.05.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104487823 A

(43)申请公布日 2015.04.01

(30)优先权数据
61/650735 2012.05.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.11.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2013/001590 2013.05.21

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/175312 EN 2013.11.28

(73)专利权人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公
司

地址 比利时里克森萨特

(72)发明人 本尼迪克特·格巴圭迪
奥利维尔·C·杰梅
索尼亚·拉尔道

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 李慧惠 梁谋

(51)Int.Cl.
G01N 21/552(2014.01)

审查员 丁晓燕

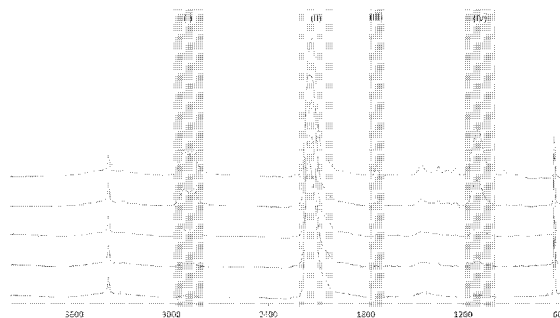
权利要求书2页 说明书16页 附图9页

(54)发明名称

用于测定混合物中聚山梨酯种类的浓度的方法

(57)摘要

用于测定混合物中聚山梨酯种类(诸如聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60或聚山梨酯80)的浓度的方法,其包括:获得所述混合物的测试样品,将内部标准品(优选叠氮化物)添加至所述测试样品,用分光计(例如通过使用ATR-FTIR仪器)获得所述测试样品的中红外衰减全反射(ATR)光谱,从所述反射光谱鉴定对应于C=O峰的波数(例如 1735 cm^{-1}),从所述反射光谱鉴定对应于内部标准品的波数,计算通过内部标准品均一化的所述C=O波数的曲线下面积,将所述面积与校准曲线比较来测定所述测试样品中聚山梨酯的浓度。



1. 用于测定混合物中聚山梨酯种类的浓度的方法,其包括:
 - a) 获得所述混合物的测试样品;
 - b) 将内部标准品添加至所述测试样品;
 - c) 用分光计获得所述测试样品中红外衰减全反射(ATR)光谱;
 - d) 从所述反射光谱鉴定对应于C=O峰的波数;
 - e) 从所述反射光谱鉴定对应于内部标准品的波数;
 - f) 计算通过内部标准品均一化的所述C=O波数的曲线下面积;
 - g) 将所述面积与校准曲线比较来测定所述测试样品中聚山梨酯的浓度。
2. 权利要求1的方法,其中所述混合物包含抗原。
3. 任一前述权利要求的方法,其中所述混合物包含蛋白抗原。
4. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物包含选自以下的蛋白抗原:流感病毒蛋白;流感血凝素(HA)蛋白;流感神经氨酸酶(NA)蛋白;麻疹病毒蛋白,腮腺炎病毒蛋白,水痘病毒(水痘)蛋白,风疹病毒蛋白,登革热病毒蛋白,呼吸道合胞病毒(RSV)蛋白,巨细胞病毒(CMV)蛋白,人乳头瘤病毒(HPV)蛋白;甲型肝炎病毒蛋白;乙型肝炎病毒蛋白;轮状病毒蛋白;脊髓灰质炎病毒蛋白;麻疹病毒蛋白;疱疹病毒蛋白;天花病毒蛋白;痘病毒蛋白;肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)蛋白;B型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae* B)蛋白;白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)蛋白;棒杆菌属(*Corynebacterium*)种蛋白;破伤风梭状芽胞杆菌(*Clostridium tetani*)蛋白;梭状芽胞杆菌属(*Clostridium*)种蛋白;百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)蛋白;和博德特氏菌属(*Bordetella*)种蛋白。
5. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物包含多糖抗原。
6. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物包含选自以下的多糖抗原:链球菌属(*Streptococcus*)种多糖;肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)多糖;脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)多糖;流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)多糖;沙门氏菌属(*Salmonella*)种多糖;和伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)多糖。
7. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述测试样品在获得所述测试样品中红外衰减全反射光谱之前没有化学预处理。
8. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述对应于C=O峰的波数为 1735 cm^{-1} 。
9. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述内部标准品为叠氮化物。
10. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述测试样品为液体样品。
11. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述测试样品为含水样品。
12. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物包含仅单一的聚山梨酯种类。
13. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物包含选自聚山梨酯80、聚山梨酯60、聚山梨酯40和聚山梨酯20的聚山梨酯种类。
14. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物包含聚山梨酯80。
15. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物包含非聚山梨酯赋形剂。
16. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物包含非聚山梨酯去污剂。
17. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物包含选自4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇、叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇、聚乙二醇叔辛基苯基醚和维生素E琥珀酸酯(VES)的非聚山梨酯赋形剂。

18. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物根据疫苗的当前良好生产规范生产。

19. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物为原料疫苗组分。

20. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述混合物为原料流感疫苗组分。

21. 权利要求1-2中任一项的方法,其中在获得ATR光谱之前将所述测试样品放置与单一内反射元件(IRE)接触。

22. 权利要求1-2中任一项的方法,其中在获得ATR光谱之前将所述测试样品放置与多重内反射元件(IRE)接触。

23. 权利要求1-2中任一项的方法,其中在获得ATR光谱之前将所述测试样品放置在由金刚石制成的IRE上。

24. 权利要求的1-2中任一项方法,其中在获得所述光谱之前将所述样品在氮气下干燥。

25. 根据权利要求1的方法,其中所述混合物是包含单一聚山梨酯种类的水溶液,并且其中所述方法包括将叠氮化物添加至所述测试样品作为内部标准品;使用ATR-FTIR测量在 1735 cm^{-1} 和在 $2200\text{--}1980\text{ cm}^{-1}$ 的峰面积;用在 $2200\text{--}1980\text{ cm}^{-1}$ 的所述峰面积将在 1735 cm^{-1} 的所述峰面积均一化,以得到均一化的在 1735 cm^{-1} 的峰面积。

用于测定混合物中聚山梨酯种类的浓度的方法

[0001] 关于联邦资助的研究的声明

[0002] 本发明的各方面依照合同# HHS0100200600011C用来自卫生和人服务部 (Department of Health and Human Services) 的美国政府支持进行;美国政府可具有本发明的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及使用衰减全反射-傅里叶变换红外光谱学(ATR-FTIR)测量聚山梨酯诸如聚山梨酯80的方法。

[0004] 背景

[0005] 本领域中存在用于定量聚山梨酯的技术,包括基于比色法、HPLC分离、气相色谱法(GC)和GC与质谱(MS)检测的方法。然而,由于测试样品内存在的成分或条件,可能与此类测试方法发生干扰(基质干扰)。这可能需要测试样品的特定的、有时复杂且耗时的制备。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明的一个方面是用于通过以下测定混合物中聚山梨酯种类的浓度的方法:获得混合物的测试样品,将内部标准品添加至测试样品,获得测试样品的中红外衰减全反射(ATR)光谱,从反射光谱鉴定对应于C=O峰的波数和对应于内部标准品的波数,对于C=O波数计算曲线下面积(通过内部标准品均一化),以及将所述面积与校准曲线比较来确定测试样品中聚山梨酯的浓度。

[0008] 在本发明的一个方面,测试样品包含抗原,诸如蛋白抗原或多糖抗原。

[0009] 在本发明的一个方面,测试样品在获得测试样品的中红外衰减全反射光谱之前没有化学预处理。

[0010] 在本发明的一个方面,内部标准品是叠氮化物。

[0011] 在本发明的一个方面,测试样品包含单一聚山梨酯种类。

[0012] 在本发明的一个方面,测试样品是原料疫苗组分。

[0013] 附图简述

[0014] 图1是选择性离子监测(SIM)模式的GC-MS色谱图的实例(标记为TIC:25.D\data.ms 10.686的峰是聚山梨酯80)。

[0015] 图2描绘化学键的振动模式。振动模式的位置在波长和频率方面给出。

[0016] 图3显示使用内部标准品(区域II)均一化的从溶液(水)中已知浓度的聚山梨酯80获得的ATR-FTIR光谱,其中X轴为波数(cm^{-1})且Y轴为吸光度(任意单位的均一化的吸光度)。光谱区域(I) $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ =聚山梨酯80脂肪族链;区域(II) $2200 - 1980 \text{ cm}^{-1}$ =添加至样品的内部标准品;在 1735 cm^{-1} 的区域(III)峰=聚山梨酯80(C=O);在 1100 cm^{-1} 的区域(IV)峰=聚山梨酯80 (C-O)。峰面积(I)、(III)和(IV)作为聚山梨酯80浓度的函数而增加。图上的每条线都代表来自32次扫描的样品的平均结果。

[0017] 图4显示使用叠氮化物标准区域II均一化的从图3的区域(I)、(III)和(IV)获得的校准曲线。面积(Y轴)表示为任意单位;X轴是聚山梨酯80浓度($\mu\text{g/ml}$)。

[0018] 图5:使用内部标准品(区域II)均一化的Flu-CC原料样品的ATR-FTIR光谱的实例。由于基质的复杂性,仅图3的峰(III)可用于鉴定和定量Flu-CC样品中的聚山梨酯80。

[0019] 图6:来自图5的区域(I)和(III)的面积相对于聚山梨酯80浓度的图。

[0020] 图7A:描绘使用ATR-FTIR的聚山梨酯80光谱。

[0021] 图7B:描绘使用ATR-FTIR的聚山梨酯80的定量,其中峰响应相关性没有进行均一化。

[0022] 图8A:描绘使用ATR-FTIR的聚山梨酯80光谱。

[0023] 图8B:描绘使用ATR-FTIR的聚山梨酯80的定量,其中所述峰使用叠氮化物作为内部标准品进行均一化。

[0024] 图9描绘了在纯化Flu-CC的过程中获得的两个样品的聚山梨酯80光谱,其中顶部线是添加聚山梨酯之前采集的样品,且底部线是在处理过程中添加聚山梨酯之后采集的样品。

[0025] 详述

[0026] 赋形剂通常被添加至药物制剂(包括疫苗制剂)中。表面活性剂,包括聚山梨酯,是药物和疫苗制剂中常用的赋形剂。表面活性剂(诸如聚山梨酯)可以,例如,通过在储存、运输和递送过程中维持特定蛋白结构而帮助保留蛋白的生物活性。表面活性剂也可帮助减少蛋白吸附至表面(例如,小瓶和注射器),减少界面的表面张力,且降低蛋白变性(其可导致蛋白聚集)的速率。参见,例如,Khosravi等人, *Pharma Research*, 19(5):634 (2002); Loughheed等人, *Diabetes*, Vol. 32 (1983) 424-432。

[0027] 聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60和聚山梨酯80是生物药物(包括疫苗)的配制中常用的聚山梨酯赋形剂。管理机构可要求定量医疗、生物制药和生物产品中的表面活性剂,以及其它成分。

[0028] 本文中公开了衰减全反射-傅里叶变换红外光谱学(ATR-FTIR)方法,其定量液体制剂(包括包含除了聚山梨酯以外的赋形剂的药物制剂)中的聚山梨酯。

[0029] 定量聚山梨酯的方法

[0030] 已经描述用于定量聚山梨酯的各种分析方法。此类方法可以包括多步骤样品制备、复杂基质内的潜在干扰和灵敏度和特异性的缺乏。

[0031] 聚山梨酯20和/或80可以基于在有机溶剂中与硫氰酸钴试剂络合的聚山梨酯种类的蓝色着色来定量;聚山梨酯20和/或80的浓度通过光吸收来测定。Zsolt和Gabor, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 715-720; Hu等人, *J. Chromatogr. A*, 984 (2003) 233-236; Adamo等人, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 1865-1870; Tani等人, *J. Chromatogr. A*, 786 (1997) 99-106。

[0032] Fekete等人描述了基于碱性介质中聚山梨酯80与5(对二甲基氨基亚苄基)罗丹明(PDR)的相互作用来定量测定聚山梨酯80的LC-CAD方法(Fekete等人, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 52 (2010) 672-679)。该方法使用高效液相色谱(HPLC)分离和带电气溶胶检测(CAD)。Fekete等人声称LC-CAD方法适合用于定量蛋白溶液中范围为10-60 $\mu\text{g/ml}$ 的聚山梨酯80。

[0033] 使用紫外(UV)吸光度检测的大小排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)采用含有浓度高于其临界胶束浓度(CMC)的待测定的表面活性剂的流动相。

[0034] 样品制备后使用UV吸光度检测的反相高效液相色谱(RP-HPLC)可以基于脱水山梨醇月桂酸酯的酸性水解,随后RP-HPLC分离与通过游离月桂酸的UV吸光度检测(摩尔比1:1)。Zsolt等人, J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 18 (1998) 715-720。或者,可以使用脱水山梨醇油酸酯的碱性水解,随后RP-HPLC分离与通过游离油酸的UV吸光度检测。Hu等人, J. Chromatogr. A, 984 (2003) 233-236; Adamo等人, J. Chromatogr. B, 878 (2010) 1865-1870; Tracy等人, AAPS J., 10 (S1) (2008) 647。

[0035] 使用蒸发光散射检测(ELSD)的反相高效液相色谱(RP-HPLC)可以实现作为单峰的聚山梨酯80的洗脱(所有聚山梨酯组分的共洗脱)。Nair等人, J. Chromatogr. A, 1012 (2003) 81-86; Hewitt等人, J. Chromatogr. A, 1215 (2008) 156-160; Adamo等人, J. Chromatogr. B, 878 (2010) 1865-1870; Hewitt等人, J. Chromatogr. A, 15: 2138-45 (2011)。

[0036] 使用质谱(MS)检测的气相色谱(GC)使用脱水山梨醇油酸酯的酸性水解,随后通过GC分离油酸甲酯与通过质谱(MS)检测。样品制备涉及水解程序,和然后提取步骤。聚山梨酯80针对作为内部标准品的十五烷酸来定量(Oliveira等人, Talanta Vol. 69 (2006) 1278-1284)。

[0037] 用于定量聚山梨酯的其它分析方法可包括薄层色谱(TLC),超临界流体色谱(SFC),用分配入由聚山梨酯形成的胶束的疏水核心的N-苯基-1-萘胺荧光染料的荧光分析,在与2-硝基苯基脲衍生化反应之后通过RP-HPLC定量聚山梨酯酸组分,通过使用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)的聚山梨酯表征,和具有质谱检测(MS)的液相色谱。

[0038] IR光谱学

[0039] 红外(IR)振动光谱学通过分析分子的化学键(其以特征性频率振动)来鉴定分子。来自4000-400 cm^{-1} (中红外)的光辐射通常用作光谱的红外区,其包含大多数分子振动的基本频率。在分子中,组分(例如, CH_2)的拉伸和弯曲运动导致多种振荡模式。引起分子中偶极子变化的振动导致以相同频率吸收光子。样品中吸收频率的光谱可以被记录,并用于检测和定量样品中存在的化学基团。

[0040] 衰减全反射(ATR)

[0041] 衰减全反射(ATR)是以红外光谱学使用的采样技术。将测试样品放置与ATR晶体(或者被称为内反射元件(IRE))接触。当测试液体样品时,在ATR晶体上铺展浅(薄)层。将辐射的入射光束(红外光)以预定角度引导至ATR晶体。光束通过ATR晶体,从而使得它在IRE和测试样品之间的边界被完全内反射。内反射生成仅超过ATR晶体表面几微米延伸进入样品的衰减波,并且一些入射辐射的能量被测试样品吸收。因此,衰减波在样品吸收能量的红外光谱区被衰减或改变。对于样品吸收能量的那些波长,内反射的辐射的强度被减弱,并且特定点的吸收量可以用于定量测试样品中的特定分子的量。因此,反射的辐射包括从中可以获取测试样品的吸收光谱的信息。衰减的能量离开ATR晶体,进入IR分光计的检测器。该系统生成红外光谱(内反射光谱或衰减全反射(ATR)光谱。

[0042] 因为衰减波穿透入样品的深度有限,所以将测试样品置于与ATR晶体紧密接触;这可以使用液体样品来实现。使用的ATR晶体的类型定义了其折射率、红外透射范围和IRE的化学特性。穿透深度可以通过改变相对于IRE的进入IR光束的入射角或改变ATR晶体的折射

率来控制。

[0043] 傅里叶变换红外(FTIR)光谱学

[0044] 傅里叶变换红外(FTIR)光谱学基于分子对红外光的吸收。分子只吸收影响该分子的偶极矩的频率的红外光;这引起激发至更高的振动状态。单原子(He、Ne等)和同核双原子(H₂、O₂等)分子不吸收红外光。

[0045] FTIR光谱学获得固体、液体或气体样品吸收的红外光谱。数学算法(傅里叶变换)用于将原始数据转换为光谱。在FTIR光谱学中,包含不同频率的光的光束被引导在样品处,并且进行在不同波长的吸收的测量。在被称为扫描时间的一段时间,同时观察所有光频率。改变光束(例如,通过使用Michelson干涉仪,如本领域中已知的),以含有不同的频率组合,并再次进行测量。将其重复,以提供用于计算在特定波长的吸收的许多数据点(原始数据)。

[0046] 因此,在ATR-FTIR中,测定发生在IRE和测试样品的边界处的红外光束中的变化。当用中IR光谱处理时,通常使用波数(厘米⁻¹),而不是波长,因为波数与辐射的能量和频率成比例。

[0047] 红外能量进入样品的穿透深度是波长依赖性的。随着红外辐射波长增加,穿透深度增加。或者说,穿透深度随着波数减小而增加。这引起当与相同样品的透射光谱相比时,ATR光谱中的相对谱带强度随着波数递减而增加。该现象可以通过软件(包括市售的FTIR软件包)来数学校正。

[0048] 在ATR-FTIR中,返回入射谱的强度特征,连同比尔定律,用于鉴定和定量化合物。比尔定律是FTIR数据分析的基础。其指出,对于恒定路径长度,穿过吸收介质的入射(直接)光能量的强度随着浓度呈指数减少。本方法的数学和统计操作可以使用任何合适的计算设备来进行。分光计可具有储存收集的IR光谱(数据)和进行数据的数学运算的能力。市售个人计算机可以用于运行用于采集数据、计算差光谱和光谱和其它分析的软件。与FTIR仪器联网的计算机可以用来在一台计算机上获取数据,而分析在另一台上进行。合适的数据采集和管理软件包可以从头编写或可以购买。用于本发明中使用的合适的市售软件包包括OPUS软件(Bruker Optics, Germany);且可以定制Matlab (Mathworks Inc., USA)用于在该方法中使用。存在用于与IR光谱数据使用的许多合适的多元分类技术,包括但不限于,定量方法,诸如偏最小二乘法,主成分分析(PCA)或主成分回归(PCR)。经处理的IR光谱可以由几个原始IR光谱形成(例如,通过在波长范围的多次扫描和使用本领域中已知的平均化技术)。

[0049] Oliveira等人使用基于酯基的C=O伸缩振动的FTIR描述生物柴油中酯含量的评价(Oliveira等人, Talanta Vol. 69 (2006) 1278-1284)。美国专利号7,255,835描述了用于测定蛋白二级结构的ATR-FTIR的单通方法(single-pass method)。

[0050] 获取IR光谱

[0051] 用于使用ATR-FTIR收集和分析IR光谱的具体细节随着使用的具体设备而变化,但是通常包括用IR辐射照射与液体测试样品接触的IRE,和监测从IRE反射的辐射。可以将反射数据储存在合适介质上和/或显示在计算机屏幕上或图纸上。

[0052] 使用本发明的装置和方法获取的光谱可以包含来自样品溶剂的信号;可以在溶剂已知的情况下进行背景扣除(数学减法)。生物组分,诸如蛋白、糖蛋白或多糖可以在包含水的溶剂或含水缓冲液中。含水缓冲液可以包含除了水以外的化合物。磷酸盐缓冲盐水

(PBS)、三(羟甲基)氨基甲烷、HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)和其它化合物通常用于缓冲包含生物分子(诸如多肽抗原)的溶液。缓冲组分的扣除可以通过从在缓冲液存在的情况下样品的光谱中数学减去缓冲液的光谱(在样品不存在的情况下获得)来实现。

[0053] 背景扣除运算也可以根据需要进行以(诸如从干净ATR晶体)去除其它背景信号。

[0054] 数学光谱减法运算可以在计算机系统上进行;减法运算可以包括标识(或允许用户标识)用于减法的复合光谱的区域的算法。标识待减去的区域后,进行减法以生成所得差光谱。差光谱可以以图形呈现或制表为在给定波长的吸光度的函数且以表格形式呈现。

[0055] 本方法

[0056] 通过ATR-FTIR定量聚山梨酯的本方法基于聚山梨酯的羰基键($C=O$)的检测和定量。该键存在于聚山梨酯80、聚山梨酯60、聚山梨酯40和聚山梨酯20的每一种中。因此,本方法可用于定量聚山梨酯80、聚山梨酯60、聚山梨酯40和聚山梨酯20中的任一种。在一个实施方案中,样品仅含有单一类型的聚山梨酯(例如,仅含有聚山梨酯80)。

[0057] 甚至当将相同量的样品置于ATR上时,ATR元件上保留的样品的精确量可以变化,因此,本方法使用用内部标准品生成的校准曲线来针对ATR上保留的样品的量均一化。

[0058] 本方法允许在没有化学预处理样品的情况下通过ATR-FTIR光谱学技术测定液体测试样品中聚山梨酯的浓度。本发明人利用金刚石IRE以获得聚山梨酯80的FTIR光谱。为了生成校准曲线和鉴定特定目标峰,本发明人使用由浓度为20 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 、和500 $\mu\text{g/ml}$ 的 H_2O 中的聚山梨酯80组成的校准集。当使用内部标准品(叠氮化物)均一化时,发现每个光谱在 1735 cm^{-1} 的峰面积($C=O$)与聚山梨酯80的含量线性相关($R^2 > 0.99$)。从ATR-FTIR方法获得的结果通过气相色谱与质谱检测法(GC-MS)证实。

[0059] 本文中提供的实例表明了用于测定含有多肽成分的复杂混合物的测试样品中聚山梨酯浓度的ATR-FTIR方法(本文中提供的实例利用在细胞培养物中产生的纯化原料(bulk)流感病毒的样品(流感-CC))。对于本领域技术人员将显而易见的是,用于定量的样品必须代表从其获得样品的原料。

[0060] 用于定量制剂(包括包含抗原组分的制剂)中聚山梨酯的本程序利用光谱学领域技术人员考虑本公开内容之后将显而易见的方法。可用于本方法中的设备包括,但不限于,ATR IRE和FTIR分光计,和适当数据处理设备和软件。程序的具体细节取决于设备的参数和实验的性质,但本文中描述了一般方法。此外,可以使公开的方法适用于研究和其它相关实验考虑的样品的各种特性。

[0061] 本发明的一个实施方案提供了定量样品中聚山梨酯的ATR-FTIR方法。在一个实施方案中,样品包含液体中的多肽和/或蛋白(液体样品),诸如水中的多肽和/或蛋白(含水样品)。在一个实施方案中,多肽是多肽抗原。

[0062] 本发明的一个实施方案提供了定量样品中聚山梨酯的ATR-FTIR方法,其中所述样品包含多糖,诸如多糖抗原。在一个实施方案中,样品包含液体中的多糖(液体样品),诸如水中的多糖(含水样品)。在一个实施方案中,多糖是多糖抗原。

[0063] 在一个实施方案中,测试样品是疫苗(包括单价疫苗原料以及最终疫苗制剂,包括多价疫苗制剂);在进一步实施方案中,所述测试样品是疫苗,其包含来自选自以下的生物体的抗原:流感病毒,麻疹病毒,腮腺炎病毒,水痘病毒(水痘),风疹病毒,疱疹病毒,脊髓灰质炎病毒,天花病毒,痘病毒,人乳头瘤病毒(HPV),日本脑炎病毒,肝炎病毒,诸如HepA或

HepB, 轮状病毒, 登革热病毒, 呼吸道合胞病毒(RSV), 巨细胞病毒(CMV), 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*), 脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitides*), 白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*), 破伤风梭状芽孢杆菌(*Clostridium tetani*), 百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*), 流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*), 伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*), 链球菌属(*Streptococcus*)种, 棒杆菌属(*Corynebacterium*)种, 梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)种, 沙门氏菌属(*Salmonella*)种和博德特氏菌属(*Bordetella*)种。

[0064] 在一个实施方案中, 已知样品包含选自聚山梨酯80、聚山梨酯60、聚山梨酯40和聚山梨酯20的单一聚山梨酯种类。当单一聚山梨酯种类存在于样品中时, 结果提供了该聚山梨酯的浓度的测量。样品的量必须足以提供IRE上的样品薄层。

[0065] 在本发明的一个实施方案中, 该方法采用单通ATR采样技术和FTIR光谱学。

[0066] 在一个实施方案中, 该方法包括: (a) 提供包含聚山梨酯和内部标准品的样品; (b) 提供内反射元件(IRE); (c) 使样品与IRE接触, 以形成样品-IRE界面; (d) 使用FTIR设备, 或含有聚焦光学器件以允许利用FTIR辐射的设备, 以便在使得IR辐射与样品-IRE界面相互作用的条件下引导红外(IR)辐射的光束通过IRE; (e) 记录 $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ 的频率范围内的反射率概况; (f) 在计算机数据库中编译样品的吸光度概况, (g) 生成 $4000-600 \text{ cm}^{-1}$ 频率范围内样品的IR光谱, 和(h) 计算 1735 cm^{-1} 的峰面积(曲线下面积); 通过参考校准曲线测定所述样品中聚山梨酯的浓度。

[0067] 在一个实施方案中, 对于测试的各实验或样品组建立校准曲线。在一个实施方案中, 建立单一校准曲线, 并用于多个样品, 其中样品来自通过相同方法制备的混合物。在一个实施方案中, 对于设定时间段, 建立校准曲线, 并用于多个样品, 其中样品来自通过相同方法制备的混合物。

[0068] 当仅聚山梨酯种类的存在(而不是量)待检测时, 不需要校准曲线。

[0069] 该方法对于具体基质(例如, 具体疫苗组分)的特异性可以使用掺有已知浓度的聚山梨酯的基质样品来表明。

[0070] 在一个实施方案中, 内部标准品是叠氮化物, 且生成 $2200-1980 \text{ cm}^{-1}$ 的频率范围内样品的IR光谱。

[0071] 在一个进一步实施方案中, 内部标准品是叠氮化物, 且生成包含 1735 cm^{-1} 的频率的样品的IR光谱。

[0072] 在一个实施方案中, 测试样品不以改变聚山梨酯的化学结构的方式预处理(‘化学预处理(chemical pre-treatment)’或‘化学预处理(chemically pre-treated)’), 例如, 聚山梨酯没有与硫氰酸钴络合, 衍生化, 酯基转移, 苄基转移, 处理以产生酯衍生物, 和/或水解。如本文中所使用, 添加不改变聚山梨酯的化学结构的内部标准品不被认为是“化学预处理”。

[0073] 在一个实施方案中, 内部标准品被添加至测试样品。在一个实施方案中, 内部标准品是叠氮化物(与 CO_2 等电位的线性阴离子)。

[0074] 在一个实施方案中, 用于定量聚山梨酯的本ATR-FTIR光谱学方法可用于含有(a) 蛋白分子和/或(b)除了聚山梨酯以外的赋形剂(非聚山梨酯赋形剂)的液体制剂。在一个实施方案中, 用于定量聚山梨酯的本ATR-FTIR光谱学方法可用于含有(a)多糖分子和/或(b)

除了聚山梨酯以外的赋形剂(非聚山梨酯赋形剂)的液体制剂。此类非聚山梨酯赋形剂包括除了聚山梨酯以外的去污剂,例如,TRITON™ X-100 (4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇、叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇、聚乙二醇叔辛基苯基醚;购自Sigma Aldrich, St. Louis, MS)和维生素E琥珀酸酯(VES)。

[0075] 在本发明的一个实施方案中,获取样品光谱的过程使用用于自动光谱获取的合适的市售软件包来自动化。

[0076] 在另一个实施方案中,本发明是完全自动化的,并且可以包含注入和去除样品的自动进样器和运行FTIR分光计的光谱获取软件包。

[0077] 术语

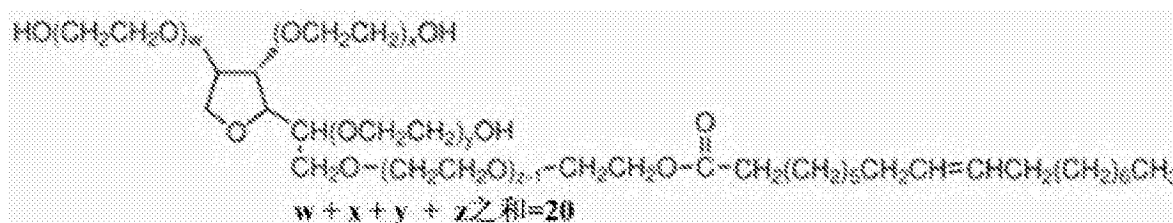
[0078] 除非另有解释,本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域普通技术人员通常理解的相同含义。分子生物学中常用术语的定义可见Benjamin Lewin, *Genes V*, 由Oxford University Press出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew等人.(编), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 由Blackwell Science Ltd. 出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 和Robert A. Meyers (编), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 由VCH Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

[0079] 聚山梨酯衍生自用脂肪酸酯化的PEG化脱水山梨醇(山梨醇的衍生物)。聚山梨酯种类包括聚山梨酯20(聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯)、聚山梨酯40(聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单棕榈酸酯)、聚山梨酯60(聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单硬脂酸酯)和聚山梨酯80(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯)。“聚山梨酯”之后的数字名称是指亲脂性基团(单月桂酸酯(20)、单棕榈酸酯(40)、单硬脂酸酯(60)和单油酸酯(80))。“聚氧乙烯”之后的数字二十(20)是指分子中氧乙烯基的总数量。聚山梨酯被归类为非离子型表面活性剂。聚山梨酯的品牌名称包括ALKEST™ 和TWEEN™。

[0080] 聚山梨酯80是非离子型表面活性剂和乳化剂;品牌名称包括Alkest TW 80、Canarcel和TWEEN™ 80。聚山梨酯20是非离子型表面活性剂和乳化剂;品牌名称包括Alkest TW 20和TWEEN™ 20。聚山梨酯40是非离子型表面活性剂和乳化剂;品牌名称包括TWEEN™ 40。聚山梨酯60是非离子型表面活性剂和乳化剂;品牌名称包括TWEEN™ 60。聚山梨酯80和聚山梨酯20的结构如下显示。

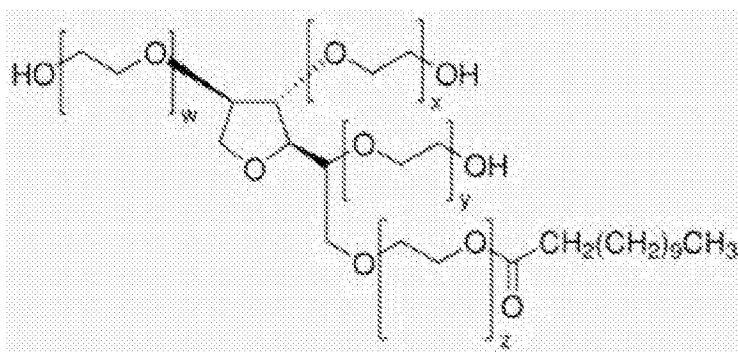
[0081] 聚山梨酯80(w、x、y 和z之和为20):

[0082]



[0083] 聚山梨酯20(w、x、y 和z之和为20):

[0084]



[0085] 聚山梨酯种类,包括聚山梨酯80、聚山梨酯60、聚山梨酯40、聚山梨酯20及其组合,用作医用制剂中的赋形剂,所述医用制剂包括疫苗,包括提供针对流感、人乳头瘤病毒(HPV)感染、日本脑炎、肺炎球菌病、肝炎(HepB)和轮状病毒疾病的保护的疫苗;还包括联合疫苗,诸如DTaP(白喉、破伤风和无细胞百日咳)、DTaP/Hib(DTaP加上B型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae B*))、DTaP/IPV(DTaP加上灭活的脊髓灰质炎病毒),和DTaP-HepB-IPV。

[0086] 流感疫苗在各种底物上制备。许多商业疫苗使用母鸡的蛋制备。最近,流感疫苗已经使用细胞系诸如Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞系、MRC-5细胞系(人胎儿肺)、Vero细胞系(非洲绿猴肾上皮细胞)、中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)、EB66[®]细胞系和PER.C6[®]细胞系(人,Crucell(荷兰))来开发。EB66[®]细胞系是市售的衍生自胚胎干细胞的鸭细胞系(Vivalis, Nantes, France),且用于生长和产生疫苗组分,包括产生病毒疫苗制造中使用的病毒,包括流感病毒。EB66[®]细胞易受许多病毒(包括禽流感病毒)的感染。疫苗组分产生的替代方法包括在含胚鸡蛋和原代鸡胚成纤维细胞(CEF)中生长。

[0087] 如本文中所使用,含有(或包含)蛋白(或多肽)组分的制剂(或溶液)可以是医用组合物,诸如生物药物组合物,诸如治疗性疫苗或预防性疫苗,或包含抗体、单克隆抗体或其抗原结合部分的组合物。

[0088] 如本文中所使用,含有(或包含)多糖组分的制剂(或溶液)可以是医用组合物,诸如生物药物组合物,诸如治疗性疫苗或预防性疫苗。

[0089] 如本文中所使用,疫苗可以是经设计并旨在用于施用于人或非人哺乳动物的疫苗。疫苗可以是预防性的,以提供针对疾病的保护(降低接触疾病的机会),或治疗性的(通过减轻疾病的症状、严重度、持续时间或复发风险而治疗疾病)。疫苗可以是抗癌疫苗。疫苗可以是单价或多价的。

[0090] 如本文中所使用,疫苗可以包含从病毒获得的抗原,所述病毒包括但不限于:流感病毒、麻疹病毒、疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、天花病毒、痘病毒、人乳头状瘤病毒(HPV)、日本脑炎病毒、肝炎病毒诸如HepB、和轮状病毒。

[0091] 如本文中所使用,疫苗可以包含从细菌物种获得的抗原,所述细菌物种包括但不限于:肺炎链球菌、白喉棒杆菌、破伤风梭状芽孢杆菌、百日咳博德特氏菌和流感嗜血杆菌。

[0092] 如本文中所使用,cGMP意指当前良好生产规范。

[0093] 如本文中所使用,“原料疫苗组分(bulk vaccine components)”或“原料(bulks)”是指包含或储存在大于成品疫苗体积的体积中的疫苗活性成分。原料中疫苗活性成分的浓度通常高于成品疫苗中活性成分的浓度。原料是疫苗的商业制造中的中间产品。原料可以

是一价的(单价的),即,含有一种纯化的抗原,二价的或多价的。原料可以含有浓度不同于最终疫苗制剂(用于临床使用或商业销售的制剂)中存在的浓度的纯化抗原。在一个实施方案中,原料含有至少一种流感病毒蛋白抗原,例如,神经氨酸酶(NA)或血凝素(HA)抗原。原料可以含有衍生自病原体的一个株或衍生自病原体的多个株的抗原。最终疫苗制剂可以包含多种抗原(多价疫苗),即可以是多种单价原料的混合物,且可以包含来自多种病原体或一种病原体的多个株的抗原。可以储存原料,直到需要用于疫苗剂量的最终制备。疫苗可以是液体、佐剂化液体或冻干的形式。

[0094] 如本文中所使用,样品是较大体积的代表性部分。样品可以是混合物,诸如包含非液体要素的液体。样品可以是含水样品。

[0095] 如本文中所使用,混合物包含至少两种不同的要素,例如,包含多肽种类的分子和聚山梨酯种类的分子的混合物。混合物可以是固体形式或液体形式。

[0096] 如本文中所使用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白”是可互换的,且意指氨基酸的聚合物,而不论大小。尽管“蛋白”通常被用来指相对大的多肽且“肽”通常被用来指小多肽,但本领域中的这些术语的使用重叠且变化。如本文中所使用,术语“多肽”是指肽、多肽和蛋白,除非另有说明。如本文中所使用,术语“蛋白”、“多肽”和“肽”是指表达的基因产物和化学合成的实体两者,且涵盖糖蛋白和失活的蛋白毒素(类毒素)。

[0097] 如本文中所使用,抗原是指在哺乳动物(包括人)中诱导免疫应答的物质,包括肽和蛋白(包括糖蛋白)。

[0098] 如本文中所使用,定量包括测定样品中具体物质的浓度,例如,以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 计,或测定具体体积中物质的总量。

[0099] 如本文中所使用,术语“含水的”意指包含水组分。因此,“水溶液”是包含水组分的溶液。术语“含水的”和“水溶液”具体涵盖包括水、氧化氙或两者都作为水组分。

[0100] 如本文中所使用,术语内反射元件(IRE)与术语ATR晶体或ATR元件可互换使用,并且意指容许入射照射和从元件内部上的表面(反射表面)反射照射至少一次的晶体、棱镜或其它结构。在ATR-FTIR中,反射在照射与和IRE的反射表面接触的样品的相互作用之后。在此类反射之后,照射可以被重新反射或从IRE发射。许多分光计的制备可以通过将ATR装置添加至分光计而与ATR使用。FTIR分光计优选具有在约30至约60度的预定入射角将IR能量供应至样品且通过包括入射角的宽范围角度从样品收集反射光的能力。

[0101] IRE具有高折射率(至少大于待测试样品的折射率,并且在 2000 cm^{-1} 通常在2.38和4.01之间),并且可以是光学致密晶体诸如锗晶体、硒化锌晶体、金刚石晶体,或能够发射IR光的其它高折射率材料。ATR晶体的形状取决于分光计和与其一起使用的样品的类型,如本领域中已知。

[0102] 如本文中所使用,入射角是入射光接触IRE的角度。在本发明中,可以使用金刚石ATR元件,且合适的入射角与表面法线呈45度。

[0103] 如本文中所使用,术语“多通ATR (multi-pass ATR)”意指衰减全反射技术,其中在具有至少两个反射面的IRE上入射的照射在离开IRE之前与反射面相互作用至少两次。此类相互作用可被称为“弹跳”或“通过”。多通ATR生成多通ATR光谱。如本文中所使用,术语“单通ATR (single-pass ATR)”意指衰减全反射技术,其中在IRE内具有至少一个反射面的IRE上入射的照射在离开IRE之前与反射面相互作用仅一次(一次“弹跳”或“通过”)。单通

ATR生成单通ATR光谱。

[0104] 如本文中所使用,本发明的一个实施方案中使用的校准曲线意指使用与该方法中所述的相同步骤,但使用含有已知量的聚山梨酯种类的样品(校准样品)生成的参考标准。校准样品中的聚山梨酯种类与测试样品中相同,且校准样品中聚山梨酯种类的量跨越涵盖测试样品中存在的本领域技术人员合理预期的范围的范围。例如,当预期测试样品中的聚山梨酯浓度范围为零和500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间时,可以使用含有0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的校准样品来制备校准曲线。任何合适的面积单位可用于校准曲线。

[0105] 单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指示物,除非上下文另有清楚指出。类似地,词语“或(or)”意在包括“和(and)”,除非上下文另有清楚指出。术语“多个(种)(plurality)”是指两个(种)或更多个(种)。此外,关于物质的浓度或水平给出并表示为“约”某一水平的给定数值限制意在是近似的。因此,当浓度表示为“约250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ”(例如)时,意指浓度被理解为至少约(或“约”或“~”) 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0106] 尽管与本文所述的方法或材料相同或等效的方法或材料也可以用于本公开的实施或测试中,但下文描述合适的方法和材料。术语“包含”意指“包括”。因此,除非上下文另有要求,词语“包含(comprises)”和变体诸如“包含(comprise)”和“包含(comprising)”将被理解为暗示包括所述化合物或组合物(例如,核酸,多肽,抗原)或步骤,或一组化合物或步骤,但不排除任何其它化合物、组合物、步骤或其组。缩写“例如(*e.g.*)”在本文中用于表示非限制性实例,并且与术语“例如(for example)”同义。

[0107] 为了便于综述本公开的各个实施方案,提供了以下术语解释。其它术语和解释可以在本公开的上下文中提供。

[0108] 已经开发了用于定量液体制剂,包括包含蛋白(包括糖蛋白)和/或多糖的制剂中的聚山梨酯的快速且灵敏的方法。该方法也适用于定量含有其它(非聚山梨酯)赋形剂的液体制剂和含有蛋白和其它(非聚山梨酯)赋形剂两者的液体制剂中的聚山梨酯。

实施例

[0109] 实施例1:通过GC-MS定量聚山梨酯80的方法

[0110] 气相色谱-质谱法(GC-MS)是用于测量液体样品中聚山梨酯80的含量的常用的和验证的方法。

[0111] 使用两个步骤程序处理样品和标准品:

[0112] (1) 衍生化:甲醇+HCl Fischer酯交换(trans-esterification)

[0113] (2) 衍生化产物的提取:己烷/含水介质分配

[0114] 聚山梨酯80(使用MeOH +HCl)的转甲基提供9-十八碳烯酸,甲酯。

[0115] 内部标准品(十五烷酸)用于计算衍生化步骤的可变性。使用用TAP-CB DF=010 (Agilent Technologies, Santa Clara, US)包被的熔融石英毛细管柱(Varian WCOT (Wall Coated Open Tubular) Ulti-metal 25m x 0.25mm柱获得色谱分离。校准范围为50至2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。聚山梨酯80和内部标准品(IS)的质谱检测在特定m/z(质荷比)。

[0116] 通过混合以下制备样品和标准品:

[0117] ■ 200 μl 样品或标准品

[0118] ■ 200 μ l 十五烷酸(内部标准品, IS)

[0119] ■ 400 μ l MeOH/HCl 4N。

[0120] 然后将样品(或标准品)在80℃下加热一小时, 且添加400 μ l 己烷以提取甲酯衍生物。然后将样品(或标准品)以11000 RPM离心五分钟。将己烷相收集, 并且通过GC-MS分析。

[0121] 表1显示用于GC-MS检测内部标准品和聚山梨酯80的质荷比(m/z), 和这些组分的保留时间。

[0122] 表 1

[0123]

分析物	m/z	保留时间
十五烷酸(IS)	256-143	9.29 min
聚山梨酯80	264-296	10.69 min

[0124] 图1是显示聚山梨酯80峰的SIM模式的GC-MS色谱图的实例。第一个峰对应于内部标准品(已知量), 且第二个峰(标记为TIC:25.D\data.ms 10.686 (TIC=总离子数))对应于衍生化的聚山梨酯。计数数目表明丰度。

[0125] 实施例2:ATR-FTIR程序

[0126] 使用在生产原料灭活流感疫苗组分过程中获得的样品开发使用ATR-FTIR定量聚山梨酯的方法。

[0127] 在EB66® 细胞中产生流感病毒。从细胞分离病毒收获物, 且使用以下连续步骤纯化以产生原料浓缩物: 离心、微滤、超滤、蔗糖梯度超速离心、 β -丙内酯灭活、紫外(UV)光灭活、超滤、裂解(破碎和灭活完整病毒)、超速离心、色谱、超滤、和过滤0.22 μ m。

[0128] 纯化的最终原料包含流感蛋白抗原和赋形剂。

[0129] 在配备液氮冷却的汞/镉/碲化物检测器的TENSOR™ 27 FT-IR单光束分光光度计(Bruker Optics, Ettlingen, Germany)上在室温记录ATR-FTIR光谱, 额定分辨率为4 cm^{-1} , 且每一 cm^{-1} 进行编码。用干燥空气连续清洗分光光度计。每个样品之前(无样品的IRE)进行背景吸光度光谱。通过使用的软件从样品的测量光谱中减去该“空白”。

[0130] 将约1 μ L样品铺展在内反射元件(IRE)上, 并在温和氮气流下将溶剂慢慢蒸发。IRE是目标红外(IR)照射可穿透的金刚石晶体(Golden Gate Reflectance ATR, Reflex Analytical Corporation, Ridgewood, NJ, USA; 单次反射)。使用标准密封且可清洗的光学罩(optics housing); 使用Michelson干涉仪。

[0131] 对于每个样品, 从4000至600 cm^{-1} 记录光谱, 且对于每个样品, 将多次扫描平均化。

[0132] 将光谱区域3000 - 2800 cm^{-1} 分配给聚山梨酯80脂肪族链; 2200 - 1980 cm^{-1} 峰对应于内部标准品(叠氮化物); 1735 cm^{-1} 的峰来自聚山梨酯80(C=O拉伸); 1100 cm^{-1} 的峰分配给聚山梨酯80 C-O键。(参见Coates, The Interpretation of Infrared Spectra: Published Reference Sources, Applied Spectroscopy Review, Vol. 31 (1-2), 179-192 (1996); Smith, *Infrared Spectral Interpretation, a Systematic Approach*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.) 使用叠氮化物峰面积(II)(内部标准品)将峰面积(I)、(III)和(IV)均一化。

[0133] 如实施例3和4中所述, 使用含有已知量的聚山梨酯的校准样品生成校准曲线, 且使用参考标准品与已知浓度的聚山梨酯80鉴定特定目标峰。参考标准品为(1) H₂O中聚山

梨酯80的溶液(20、50、100、250 和500 $\mu\text{g/ml}$),和(2) 添加已知浓度的聚山梨酯80的纯化的原料Flu-CC的样品。参考标准品还含有叠氮化物作为内部标准品(0.2%叠氮化物w/v;稀释10次以提供最终0.02%的叠氮化物)。使用OPUS软件(Bruker Optics, Germany)和Matlab (Mathworks Inc., USA)进行数据分析。

[0134] 一般振动模式显示于图2中。中红外,约4000-400 cm^{-1} (1.4-3.0 μm),用于研究基本振动和相关结构。例如,CH₂基团的振动模式包括对称拉伸($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ 约2853 cm^{-1}),不对称拉伸($\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ 约2926 cm^{-1}),平面内弯曲或剪切($\delta_{\text{s}} \text{CH}_2$ 约1465 cm^{-1}),平面内弯曲或摇动(ρCH_2 约720 cm^{-1}),平面外弯曲或摇摆($w \text{CH}_2$ 1350-1150 cm^{-1}),平面外弯曲或扭转(τCH_2 1350-1150 cm^{-1})。

[0135] 实施例3:水中聚山梨酯的ATR-FTIR检测

[0136] 使用如实施例2中所述的方法,使用水中20 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 和500 $\mu\text{g/ml}$ 的聚山梨酯80研究聚山梨酯的浓度(将单个初始样品稀释以生成不同浓度)。每个样品含有叠氮化物(0.02% w/v)作为内部标准品。

[0137] 图3显示从聚山梨酯80/水稀释物中获得的光谱的实例。每行代表样品(水中20 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 和500 $\mu\text{g/ml}$ 的聚山梨酯80)之一,且是来自32次扫描的平均值。(还制备每个样品256次扫描的平均结果(未显示),并给出作为32次扫描的平均结果的相同相关性)。将光谱区域3000 - 2800 cm^{-1} 分配给聚山梨酯80脂肪族链;2200 - 1980 cm^{-1} 峰对应于内部标准品(叠氮化物);1735 cm^{-1} 的峰来自聚山梨酯80(C=O拉伸);1100 cm^{-1} 的峰分配给聚山梨酯80 C-O键。(参见Coates, *The Interpretation of Infrared Spectra: Published Reference Sources*, *Applied Spectroscopy Review*, Vol. 31 (1-2), 179-192 (1996); Smith, *Infrared Spectral Interpretation, a Systematic Approach*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1999)。

[0138] 图3上的五行代表五个聚山梨酯/水稀释样品。使用叠氮化物(内部标准品,以峰面积(II)显示)将峰面积(I)、(III)和(IV)进行聚山梨酯均一化。

[0139] 区域(I) 3000 - 2800 cm^{-1} =聚山梨酯脂肪族链;

[0140] 区域(II) 2200 - 1980 cm^{-1} =内部标准品,叠氮化物;

[0141] 在1735 cm^{-1} 的区域(III)峰 = 聚山梨酯(C=O);

[0142] 在1100 cm^{-1} 的区域(IV)峰 = 聚山梨酯(C-O)。

[0143] 将峰面积(I)、(III)和(IV)鉴定为作为聚山梨酯80浓度的函数而逐渐增加。

[0144] 从这五个光谱图绘制图4的线性回归。图4绘制峰面积的比例(I、III和IV;使用内部标准品均一化)。面积表示为任意单位。显示聚山梨酯80的剂量-响应在该范围内是线性的,其中对于峰(III)和(IV),测定系数 R^2 高于0.99。

[0145] 实施例4:Flu-CC原料的样品中聚山梨酯的ATR-FTIR检测

[0146] 为了证明基质不影响聚山梨酯的测量,将聚山梨酯80(以20 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ 和500 $\mu\text{g/ml}$ 的量)添加至Flu-CC原料的样品。该样品含有叠氮化物作为内部标准品,并使用如实施例2和3中所述的ATR-FTIR进行研究。

[0147] 图5显示从聚山梨酯80/Flu-CC样品中获得的光谱的实例。图5上的五行代表五个不同的聚山梨酯/流感样品,所述样品从32次扫描平均化,且使用叠氮化物内部标准品进行均一化。(峰面积(I)、(II)和(III)被报道在图3中)。

[0148] 将在 1735 cm^{-1} 的峰(III)鉴定为随着添加的聚山梨酯80量准确地增加。由于基质的复杂性,仅峰(III)可用于鉴定和定量Flu-CC样品中的聚山梨酯80。参见下面的线性系数。

[0149] 图6显示使用图5的五个光谱对于(I)和(III)绘制的线性回归。面积表示为任意单位。显示聚山梨酯80剂量-响应在该范围内是线性的,其中对于峰(III),测定系数 r^2 优于0.99。这表明,基质没有显著影响聚山梨酯的测量值,并且因此水中的聚山梨酯可以用作校准曲线。

[0150] 实施例5:ATR-FTIR检测参考标准品和流感样品中的聚山梨酯

[0151] 在实施例3和4中获得的数据被用于计算回收率值,如表2中显示。(回收率值=测量的聚山梨酯的已知量的%)。

[0152] 表 2

[0153]

样品	20 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	平均值
H ₂ O中的聚山梨酯80	86%	110%	104%	96%	101%	99%
添加聚山梨酯80的Flu-CC原料	80%	89%	88%	90%	98%	89%

[0154] 实施例6:内部标准品的使用

[0155] 图7和8描述使用内部标准品在测量原料Flu-CC中聚山梨酯中的效果。图7A是对于未均一化的三个样品(结果是256次扫描的平均值),使用如实施例2中所述的ATR-FTIR方法获得的峰III的实例的放大图。图8A是对于三个样品(结果是256次扫描的平均值),使用如实施例2中所述的ATR-FTIR方法获得的峰III的实例的放大图,其中所述峰已经使用内部标准品均一化(峰面积除以内部标准品峰的面积)。

[0156] 图7B和8B分别图示图7和8的峰面积相对于聚山梨酯浓度(X轴, $\mu\text{g/ml}$)。均一化改进了响应的线性度($R^2=0.9933$)。

[0157] 实施例7:Flu-CC原料的样品中的聚山梨酯定量

[0158] 表 3:使用GC-MS(如实施例1中所述的方法)和ATR-FTIR(如实施例2中所述的方法)定量Flu-CC原料样品中的聚山梨酯。所有样品都是纯化的原料或最终原料。聚山梨酯的存在是由于所使用的纯化方法。

[0159] 表3-细胞培养中产生的所有抗原。

[0160]

Flu-CC 样品 (批号)	GC-MS: 聚山梨酯80浓度 µg/ml	ATR-FTIR: 聚山梨酯80浓度 µg/ml	GC-MS/ATR- FTIR的比率 测量值
DFCPB002 - 最终	216	249	0.87
DFCPB003 - 最终	124	175	0.71
DFCPB004 - 最终	201	233	0.86
DFCPBDA001	368	372	0.99
DFCPBDA003	1124	1088	1.03
DFCPBDA004	411	387	1.06
DFCPBDA005	281	321	0.88
DFCPBDA006	304	306	0.99
EB66-61 批次A	382	392	0.97
EB66-61 批次B	356	316	1.13
EB66-69 批次A	255	204	1.25
EB66-69 批次B	326	309	1.06
EFCPAHA016-A	268	294	0.91
EFCPAHA026	122	128	0.95
EFCPAHA028	129	191	0.68
EFCPAHA037	338	351	0.96
EFCPAHA038	737	789	0.93

[0161] 结果的可比性表明ATR-FTIR方法是定量聚山梨酯的可靠替代方法。使用本ATR-FTIR方法用于定量聚山梨酯不需要化学预处理样品,并且没有显示来自纯化原料Flu-CC基质的干扰。

[0162] 表4显示在批次EB66-69的处理过程中(细胞培养)在不同点获得的样品中聚山梨酯80的定量。在两种测量方法之间观察到良好的数据关联。

[0163] 表 4:聚山梨酯定量(GC-MS和ATR-FTIR)

[0164]

处理步骤	样品缓冲液	样品	聚山梨酯80		
EB66-69			测量的浓度 {GC-MS µg/ml}	测量的浓度 {ATR-FTIR µg/ml}	测量的 (µg/ml)
超滤	PBS	UF1	<51	<LOQ	0
超速离心	PBS-Tx100	SN	802	75	0
超速离心	PBS-Tx100	SN	858	<LOQ	0
去污剂去除	PBS-Tw80-Tx100-VES	FT	<51	18*	50-200
超滤	PBS-Tw80-Tx100-VES	UF2	520	539	100-500
除菌过滤	PBS-Tw80-Tx100-VES	原料(Bulk)	255	219	100-500

[0165] *噪音

[0166] LOQ =定量限值。

[0167] 如表4中显示,GC-MS技术表明在添加聚山梨酯80之前聚山梨酯的存在。

[0168] 图9使用来自处理中两个不同点的样品比较峰III区域中ATR-FTIR测量值。在纯化处理过程中添加任何聚山梨酯之前采集“SN裂解(SN split)”样品。图9没有显示峰III面积

的任何干扰。与在添加聚山梨酯之后的纯化中的点采集的“原料-PBS”样品比较。该样品含有聚山梨酯(在图上标记为TWEEN80)。图9表明本ATR-FTIR技术用于测量含有蛋白的样品中聚山梨酯的特异性。

[0169]

额外参考文献

- Baulsiri 和 Simler, Design and evaluation of IR sensors for pharmaceutical testing, *Advanced Drug Delivery Reviews* 21(3): 191-203 (Oct 1996)
- Blanco 等人, Analytical control of pharmaceutical production steps by near infrared reflectance spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 392(2-3):237 (1999)
- Chang 等人, Study of Interaction of Tributyl Phosphate, Non-ionic Surfactant and Water by FT-Infrared Spectrum. ISEC 2002, Cape Town, South Africa, 131-136, 2002
- Hillgren 等人, Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH, *International Journal of Pharmaceutics* 2002 237:1-2 (57-69)
- Kato 等人, Determination of polysorbates in foods by colorimetry with confirmation by infrared spectrophotometry, thin-layer chromatography, and gas chromatography, *J Assoc Off Anal Chem*. 1989 Jan-Feb;72(1):27-9.
- Kerwin 等人, Effects of tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20 °C of a recombinant hemoglobin, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998 87:9 (1062-1068)
- Kishore 等人, The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics, *Pharm Res*. 2011 May;28(5):1194-210. Epub 2011 Mar 3.
- Li 等人, Effect of poly(ethylene glycol) stearate on the phase behavior of monocaprato/Tween80/water system and characterization of poly(ethylene glycol) stearate-modified solid lipid nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2008 317:1-3 (352-359)
- Schwegman 等人, Evidence of partial unfolding of proteins at the ice/freeze-concentrate interface by infrared microscopy, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009 98:9 (3239-3246)
- Tian 等人, Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylecyanoacrylate nanoparticles, *Int J Nanomedicine*. 2011;6:445-52. Epub 2011 Feb 23.

[0170]

- Xie 等人, Improvement of antifouling characteristics in a bioreactor of polypropylene microporous membrane by the adsorption of Tween 20, *Journal of Environmental Sciences* Volume 19, Issue 12, 2007, Pages 1461-1465
- Xie 等人, Surface modification of polyethylene membrane by adsorption of Tween 20 to improve antifouling characteristics in a bioreactor, *Environmental Science and Technology*, 2009
- Xie 等人, Surface modification of polypropylene microporous membranes by the adsorption of non-ionic surfactants, *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)* 24(4), July 2006, Pages 421-429
- Yan 和 Chen, Investigation of microstructure of colloidal liquid aphrons (CLA), *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 41(11):1351-54 (2007)
- Yan 和 Chen, Zheng 等人, FTIR study of Tween 80/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate/toluene microemulsions, *Colloid Polymer Sci* 287:871-876 (2009).
- Yelenskii, 等人, Phase state determination of tween-80-water binary mixtures by IR spectroscopy, *Moscow University Chemistry Bulletin*, 47 (6), pp. 386-392 (2006)
- Zheng 等人, FTIR study of Tween80/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate/toluene microemulsions, *Colloid and Polymer Science* 2009 287.7 (871-876)

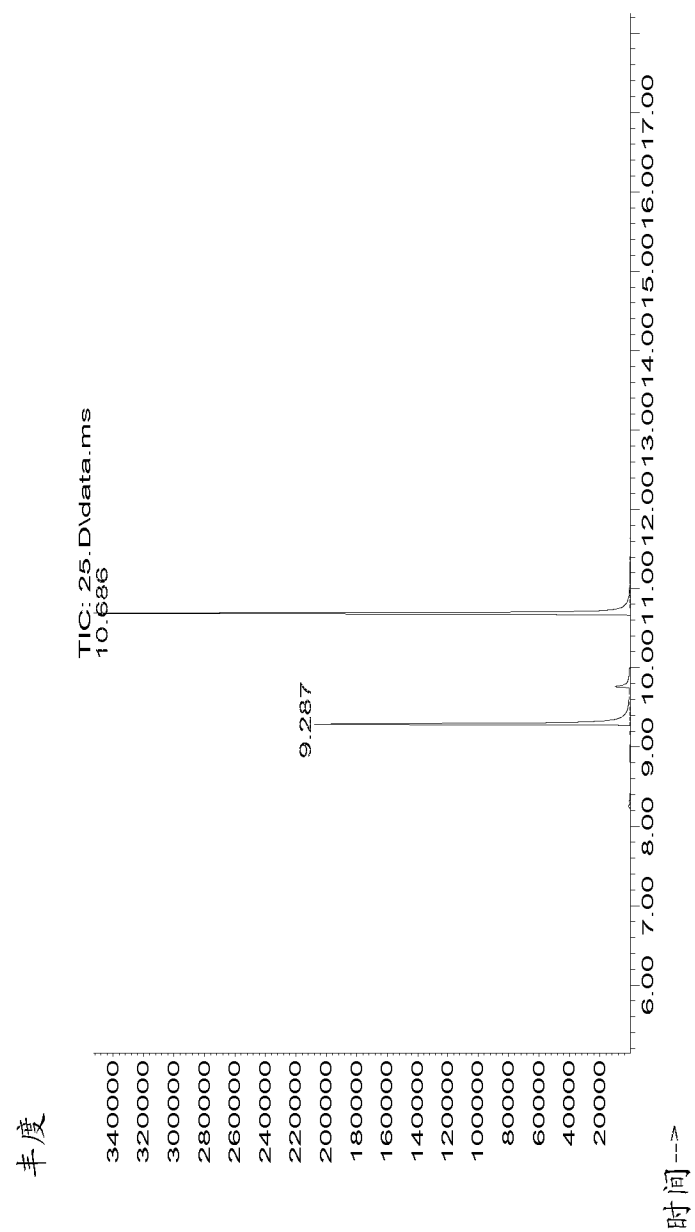


图 1

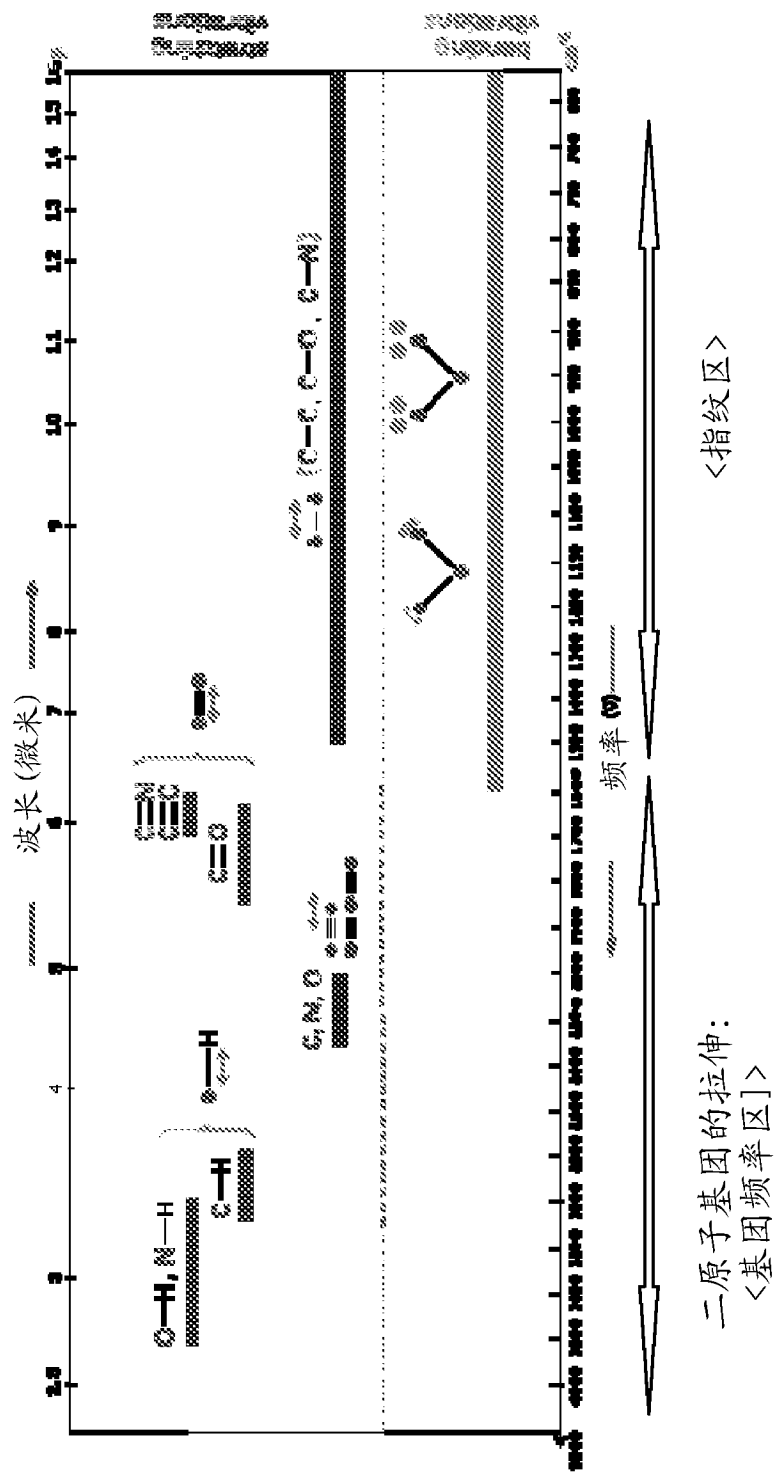


图 2

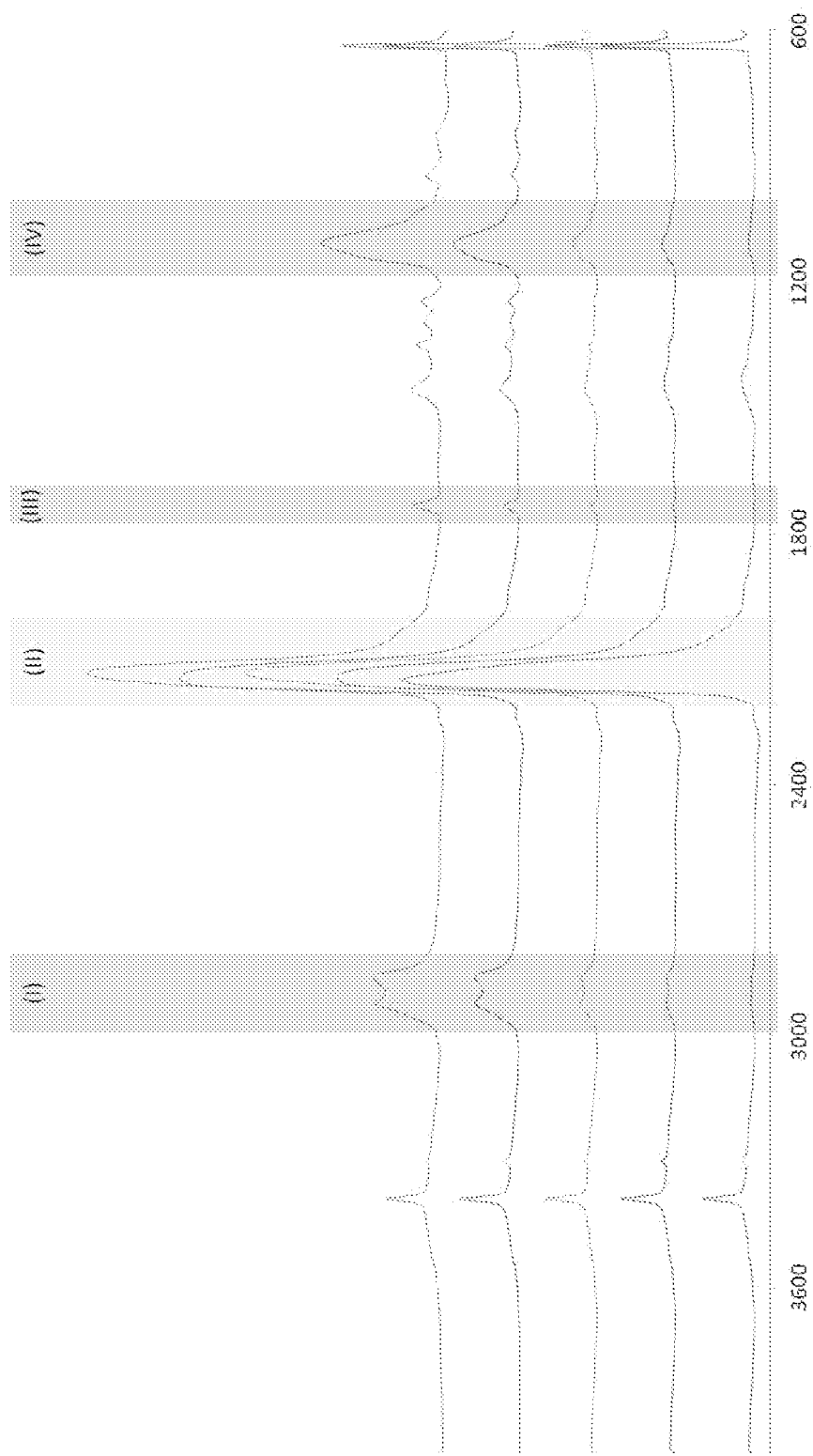


图 3

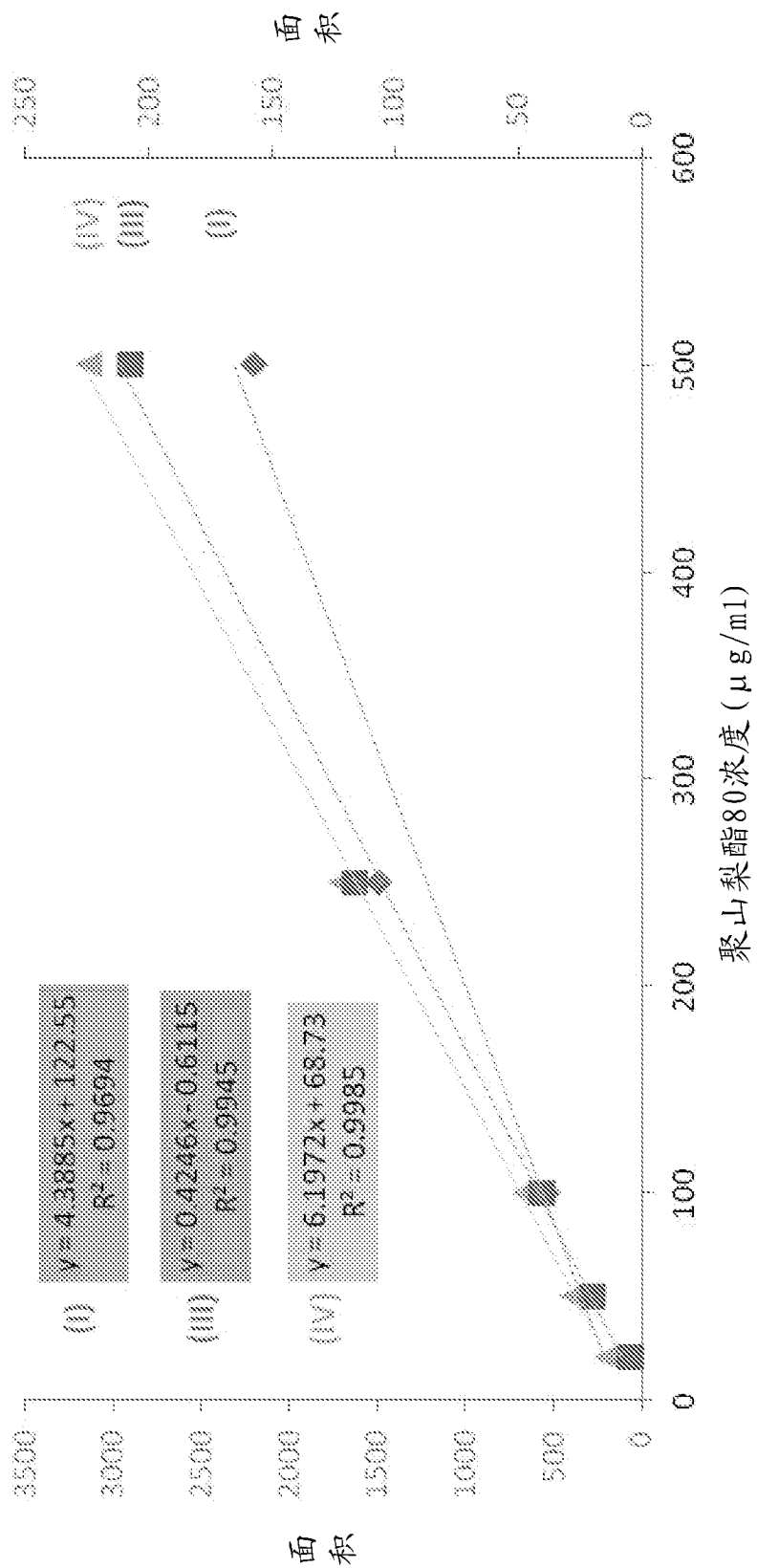


图 4

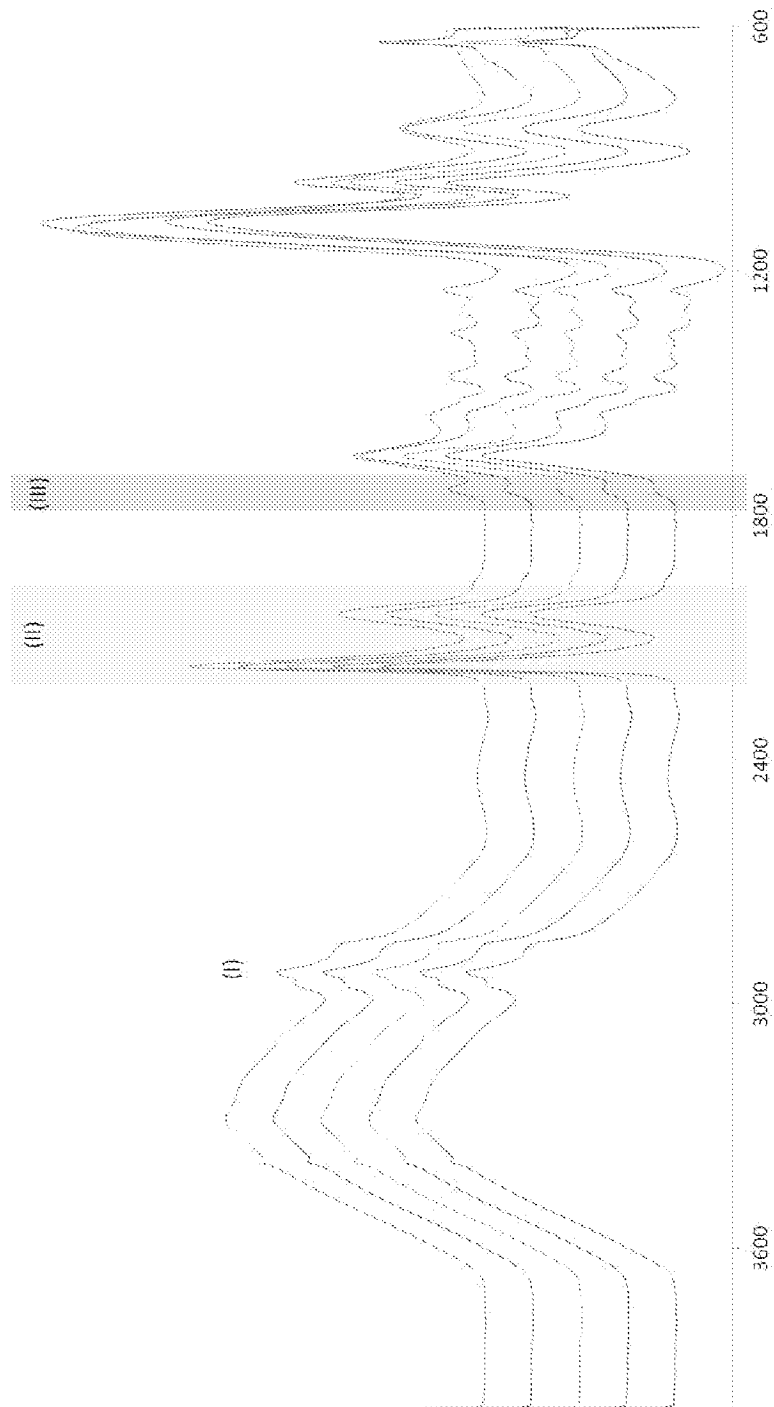


图 5

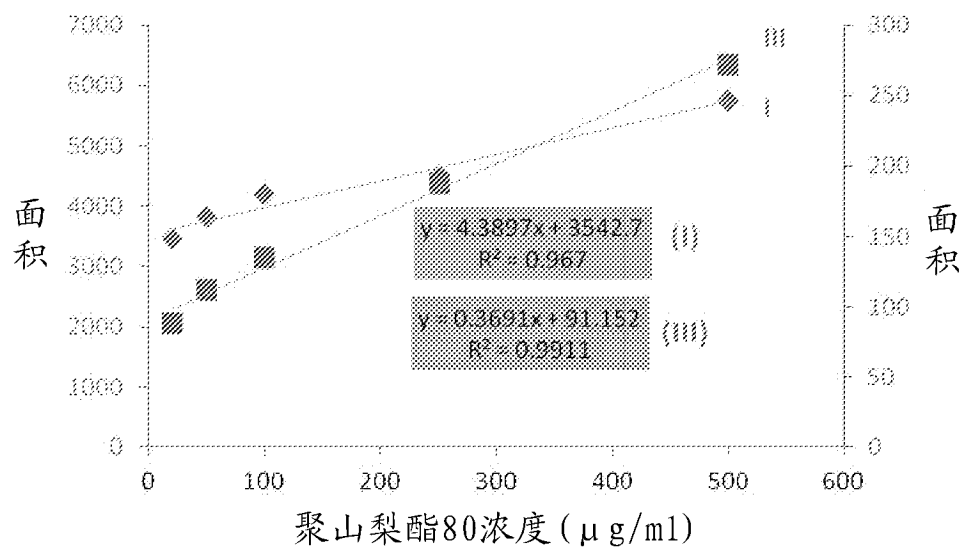
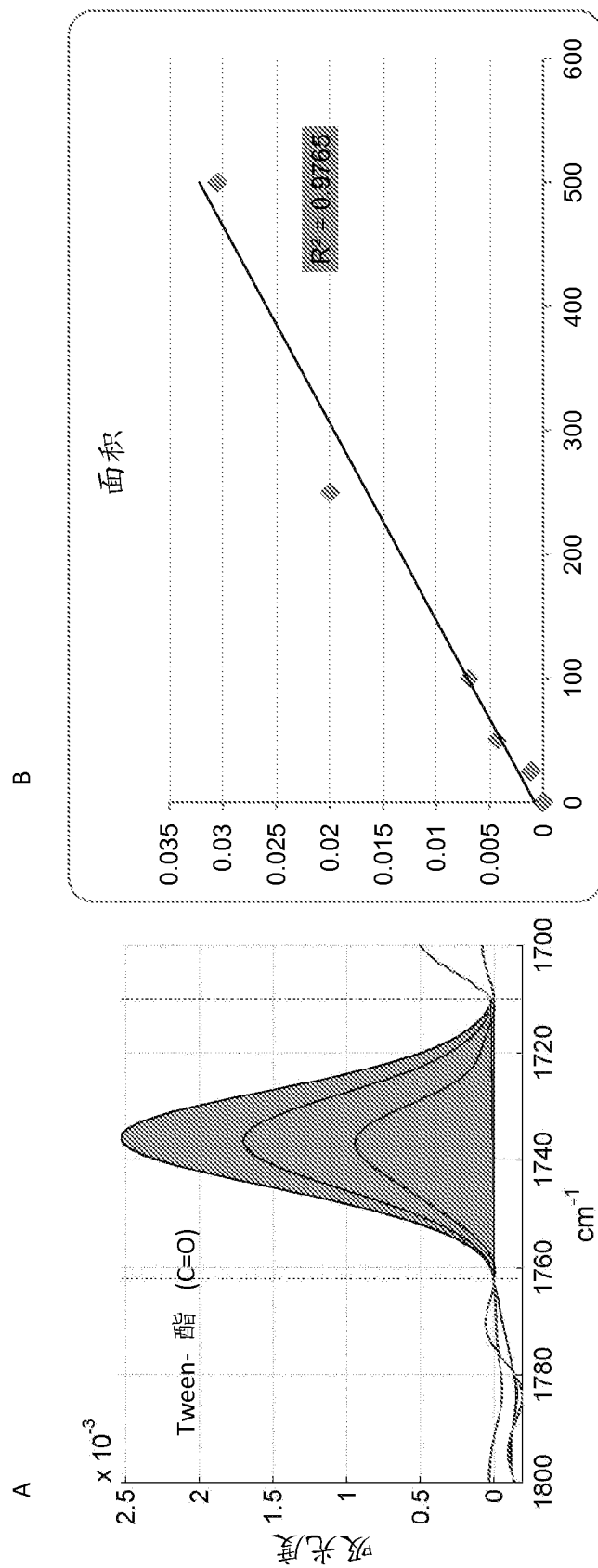


图 6



A目标区域上的放大。7B是仅TWEEN的面积(对于不同浓度)。显示响应不那么好

图 7A,图 7B

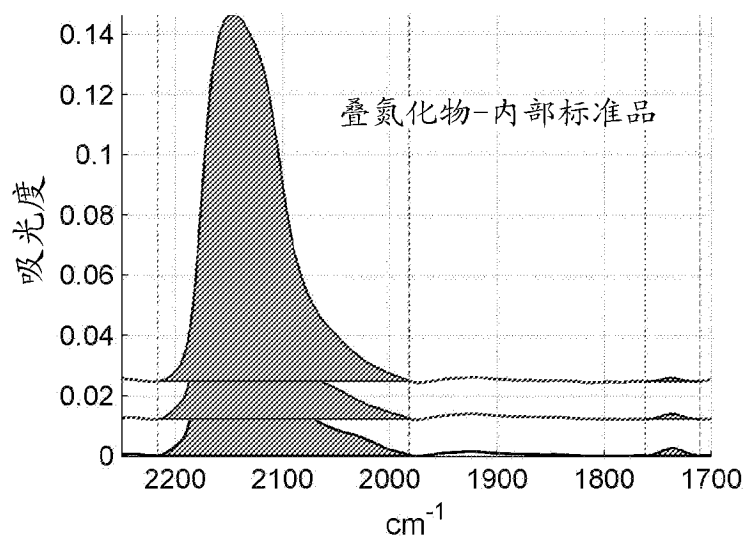


图 8A

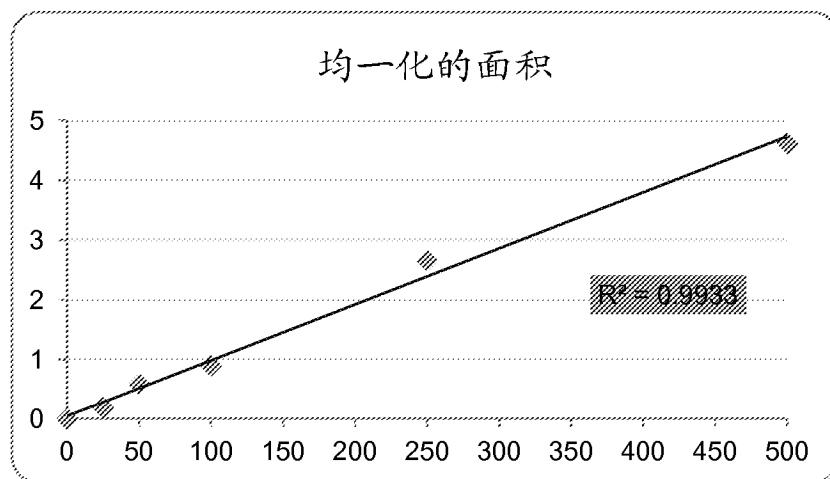


图 8B

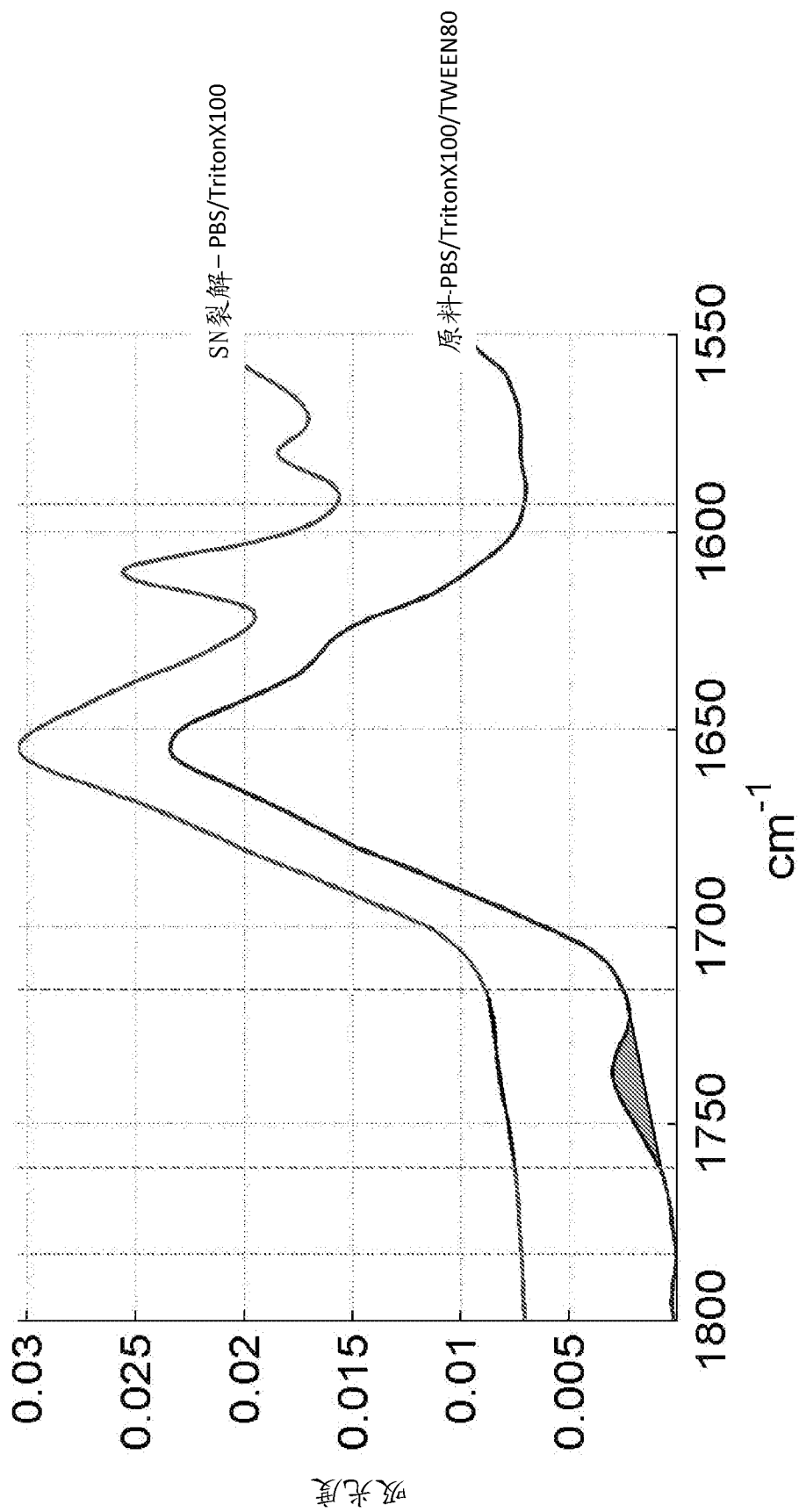


图 9