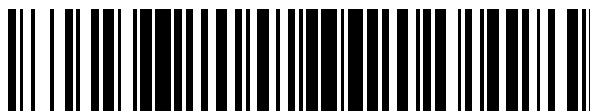


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 826 992**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2017 PCT/EP2017/078452**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2018 WO18091314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2017 E 17793966 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3542163**

54 Título: **Evaluación de la estabilidad de un producto biológico en jeringas precargadas**

30 Prioridad:

15.11.2016 EP 16306490

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.05.2021

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON FRANCE (100.0%)
11, Rue Aristide Bergès
38800 Le Pont-de-Claix, FR**

72 Inventor/es:

**BRUNET, CLAIRE y
HAMEL, JEAN-BERNARD**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 826 992 T3

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

DESCRIPCIÓN

Evaluación de la estabilidad de un producto biológico en jeringas precargadas

5 **Introducción/campo de la invención**

El dominio técnico de la invención es la evaluación de la estabilidad de un producto biológico en jeringas precargadas (PFS).

10 La invención se refiere a un método para determinar el riesgo de degradación química de un producto biológico; la degradación se produce principalmente por contacto, en particular contacto a largo plazo, con parte de un recipiente para uso médico, por ejemplo una jeringa, y el producto biológico que comprende por lo menos un aminoácido seleccionado de entre metionina, tirosina, triptófano, histidina, glutamina, asparagina, cisteína, arginina, aspartato, glutamato, lisina, prolina, serina, treonina y fenilalanina.

15 Es bien conocido que el desarrollo y la preparación de un producto de medicamento farmacéutico son complicados debido a los requisitos legales, de seguridad y de calidad. En particular, el riesgo de contaminar pacientes con compuestos contaminantes debe gestionarse y controlarse para evaluar la gestión del riesgo de la calidad.

20 El riesgo de compuestos contaminantes se incrementa en el caso de que el producto de medicamento farmacéutico se encuentre en disolución en un recipiente para uso médico, siendo el típico una jeringa precargada que contiene, por ejemplo, una vacuna. Los compuestos contaminantes son inevitables al considerar todas las superficies poliméricas con las que una sustancia farmacológica o producto farmacéutico entra en contacto directo y/o indirecto durante la fabricación, llenado, envasado y etiquetado, almacenamiento y transporte. Son fuentes de compuestos contaminantes partes del recipiente (son ejemplos el cilindro de vidrio, la aguja hipodérmica de acero inoxidable, el protector de caucho de la aguja, los lubricantes de aceite de silicona y el tapón de caucho del émbolo) y otras fuentes inesperadas son los residuos de las herramientas de procesamiento y los aditivos para unir la aguja al cilindro, y en términos generales, la parte de un recipiente para el uso médico.

30 Los compuestos contaminantes pueden potenciar la inmunogenicidad, modificando químicamente el producto biológico terapéutico o presentando una actividad adyuvante inmunitaria directa.

En consecuencia, existe una necesidad de predecir el riesgo de liberación de compuestos contaminantes a partir de un recipiente para uso médico en el que el producto biológico se ha almacenado durante un tiempo prolongado. En consecuencia, los proveedores de dispositivos de administración farmacológica y fabricantes farmacéuticos han llevado a cabo estudios de extracción y lixiviación a fin de predecir y evaluar la naturaleza de dichos compuestos contaminantes que pueden lixiviar en el recipiente y entrar en contacto con el producto biológico. El Product Quality Research Institute (PQRI) ha contribuido significativamente a las mejores prácticas en las evaluaciones de extraíbles y lixiviables (E+L) en productos farmacéuticos nasales de inhalación oral (OINDP) y actualmente se está concentrando en los productos farmacéuticos parenterales y oftálmicos (PODP) para clasificar los lixiviables en genotóxicos, irritantes, sensibilizadores y otros tóxicos, con un umbral propuesto para cada clase. Superada a la validación de dicho esquema de clasificación y a una base de datos suficientemente grande para el análisis estadístico, un compuesto contaminante será considerado para la cualificación basándose en sus umbrales respectivos.

45 Sin embargo, existe una necesidad de un marco científico coherente, capaz de comprender el potencial de un compuesto contaminante de interactuar con el producto biológico y causar degradación química.

Con el fin de evaluar la idoneidad de un sistema de jeringa precargada (SJP) para el desarrollo de un producto de anticuerpo monoclonal (mAb), se ha desarrollado un enfoque experimental conocido que consiste en la evaluación siguiente de la integridad de un producto biológico entero al ponerlo en contacto con componentes de la jeringa precargada durante un estudio acelerado de estabilidad de mínimo 6 meses. Dicho enfoque subraya el potencial de los lixiviables de interactuar con productos biológicos, aunque la naturaleza única de cada proteína provoca que dicho estudio sea muy específico y restringe a los fabricantes farmacéuticos en la realización de este tipo de estudio, que es largo y caro, para cada producto biológico en desarrollo.

55 Se ha desarrollado otro enfoque experimental conocido que muestra un importante interés en productos biológicos que son susceptibles a modificaciones estructurales inducidas por lixiviados y proponen un programa holístico de extraíbles y lixiviables para el producto biotecnológico. El método identifica los compuestos que pueden formar potencialmente modificaciones covalentes de proteínas y han establecido un árbol de decisiones para el análisis científico y de riesgos del perfil de extraíbles y lixiviables. Sin embargo, dicho enfoque requiere encontrar, identificar y cuantificar todos los potenciales extraíbles y lixiviables a partir de cualquier material procedente de parte de un recipiente para uso médico. Dicha información se encuentra protegida principalmente como 'know-how' por el proveedor de dispositivos de administración farmacéutica y, en consecuencia, no se encuentra fácilmente disponible. Con el fin de obtener una lista exhaustiva, deben llevarse a cabo estudios de extraíbles/lixiviables con un panel de técnicas analíticas y métodos de cribado exhaustivos y conocimientos expertos asociados en la identificación de estructuras químicas.

Hoofnagle A.N. et al., CLINICAL CHEMISTRY, 62:1, páginas 48 a 69, 2016, dan a conocer recomendaciones para la generación, cuantificación, almacenamiento y manipulación de péptidos utilizados para ensayos basados en espectrometría de masas, incluyendo un ensayo CPTAC para evaluar la estabilidad peptídica. El almacenamiento a corto plazo, de menos de 3 meses, se describe a una temperatura comprendida en el intervalo de -20°C a 4°C.

Majumdar S. et al., JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 100, nº 7, páginas 2563 a 2573, 2011, dan a conocer un método para evaluar el efecto de las superficies de jeringa siliconadas y modificadas sobre la estabilidad de las formulaciones de proteínas en términos de agregación, utilizando el análisis de partículas subvisibles mediante obtención de imágenes de microflujos.

Akala E.O. et al., Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Regulations and Quality, páginas 641 a 686, 2008, es una revisión que investiga el efecto del envasado sobre el producto farmacéutico (no peptídico), que da a conocer principalmente un ensayo de HPLC después del almacenamiento a 40°C durante 6 meses.

Raulfs M.D. et al., JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, ELSEVIER SCIENCE INC, US, vol. 25, nº 10, páginas 1705 a 1715, 2014, estudian la fragmentación de péptidos AAX(X)AA en la espectrometría de masas.

Alston R.W. et al., BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 94, nº 6, páginas 2288 a 2296, 2008, estudian la estabilidad de las proteínas, de las proteínas desnaturalizadas y de los péptidos AAWAA.

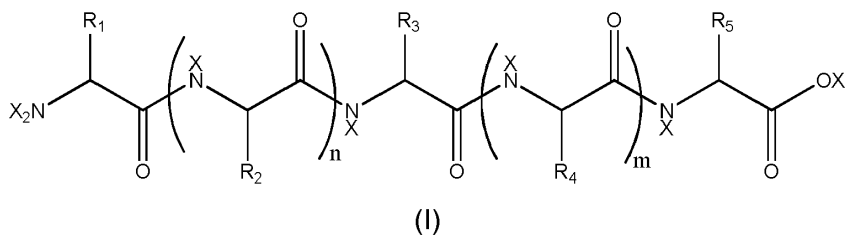
Yoshioka S.: "Stability of Dosage Forms", en: "Stability of Drugs and Dosage Forms", Kluwer Academic Publishers, Boston, 2002, es una obra sobre la estabilidad de los fármacos y formas de administración. El tiempo de almacenamiento se comenta a partir de los estudios acelerados de temperatura. No se mencionan datos de los ensayos.

De esta manera, existe una necesidad continua en la técnica de optimización de los métodos científicos de reducción del riesgo de la estabilidad a largo plazo de productos biológicos en un recipiente para uso médico, tal como jeringas precargadas.

Inesperadamente, los inventores han encontrado que la utilización de un péptido de modelo mimético podría cumplir dicho requisito. Mediante la utilización de un péptido mimético especialmente diseñado, los inventores han desarrollado un método para mimetizar y evaluar la degradación química de un producto biológico que se encuentra en contacto con parte de un recipiente para uso médico. Dicho método asimismo es capaz de predecir la susceptibilidad a la degradación de un producto biológico en disolución en un recipiente para uso médico.

En el presente contexto, la invención se refiere a un método para determinar el porcentaje de degradación de un compuesto de fórmula (I) mediante el contacto con parte de un recipiente para uso médico, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- i) preparar una disolución acuosa que comprende un compuesto de fórmula (I) a continuación:



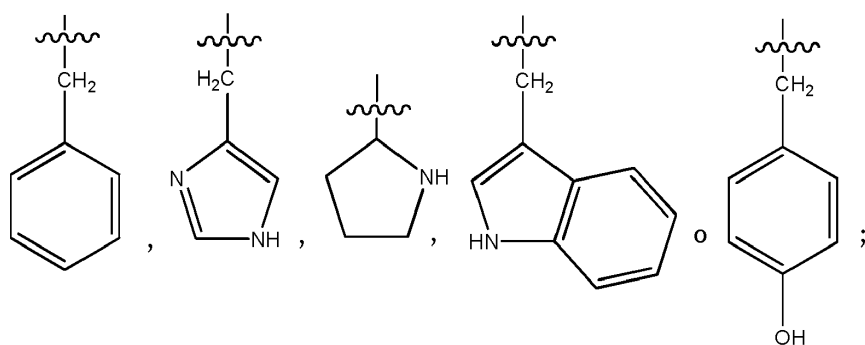
en la que:

R₁, R₂, R₄ y R₅ representan, cada uno independientemente, H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenido (C2-C6) o alquinilo (C2-C6),

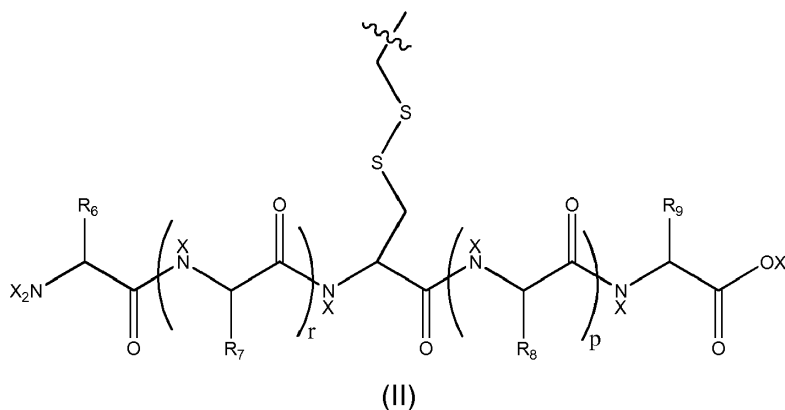
X representa H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenido (C2-C6), alquinilo (C2-C6), alcoxicarbonilo (C1-C6), arilo o un grupo protector,

n y m representan, cada uno independientemente, un número entero entre 0 y 10,

R₃ representa -(CH₂)₂-COOH, -CH₂-COOH, -(CH₂)₄-COOH, -CH₂-OH, -C(OH)-CH₃, -CH₂-CO-NH₂, CH₂-SH, -(CH₂)₄-NH₂, -(CH₂)₂-CO-NH₂, -CH₂-CH₂-S-CH₃, -(CH₂)₃-NH-C(NH)-NH₂,



o R₃ representa un grupo de fórmula (II), a continuación:



5

en la que R₆, R₇, R₈ y R₉ representan, cada uno independientemente, H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenoilo (C2-C6) o alquiniilo (C2-C6),

10

X representa H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenoilo (C2-C6), alquiniilo (C2-C6), alcoxicarbonilo (C1-C6), arilo o un grupo protector,

r y p representan, cada uno independientemente, un número entero entre 0 y 10,

15

ii) añadir a la disolución preparada en la etapa i) parte de un recipiente para uso médico durante un periodo de tiempo de 1 hora a 2 meses, a una temperatura comprendida en el intervalo de entre 5°C y 80°C,

iii) analizar mediante cromatografía líquida la disolución obtenida en la etapa ii), y

20

iv) determinar el porcentaje de degradación.

La presente invención pretende proporcionar un nuevo método con una o más de las características siguientes:

25

- el método según la invención permite mimetizar los sitios sensibles a la degradación de productos biológicos;

- el método según la invención permite evaluar la susceptibilidad de los sitios sensibles de productos biológicos en la interacción con parte de un recipiente para uso médico, tal como componentes de jeringas precargadas;

30

- el método según la invención permite ayudar a los fabricantes biotecnológicos/farmacéuticos a realizar la selección de menor riesgo del recipiente para uso médico y garantizar un tiempo de comercialización predecible;

35

- el método según la invención permite evaluar la eficiencia de los aditivos farmacéuticos para proteger la integridad farmacológica;

- el método según la invención permite desarrollar metodologías y herramientas para la evaluación de cribado rápido de las interacciones;

40

- el método según la invención permite proporcionar un estudio acelerado de estabilidad con disoluciones

modelo de contacto directo con parte de un recipiente para uso médico, residuos del procedimiento, mezcla de extraíbles o extraíbles individuales;

- 5 • el método según la invención permite predecir el riesgo de degradación de productos biológicos;
- el método según la invención permite ayudar a los fabricantes biotecnológicos/farmacéuticos a cribar y seleccionar adicionalmente la parte adecuada de los recipientes en el procedimiento de desarrollo temprano de medicamentos;
- 10 • el método según la invención permite ayudar a los fabricantes biotecnológicos/farmacéuticos en la selección de la parte óptimamente adecuada de los recipientes para la configuración de uso médico;
- el método según la invención permite comprender los problemas de interacción de productos biológicos en recipientes precargados para uso médico para investigaciones posteriores a la comercialización;
- 15 • el método según la invención permite evaluar la parte nueva de un recipiente;
- el método según la invención permite seleccionar la parte óptimamente adecuada de un recipiente;
- 20 • el método según la invención permite controlar y evaluar las consecuencias de los cambios de una parte de un recipiente.

Definiciones

25 La expresión “parte de un recipiente” utilizada en la expresión “parte de un recipiente para uso médico” se refiere al recipiente completo mismo, a una parte del recipiente, a un elemento del recipiente o a la materia prima utilizada para fabricar el recipiente, o incluso a compuestos contaminantes. Un recipiente utilizado en la presente invención no se encuentra limitado por el material de fabricación, e incluye muchos materiales, tales como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.), polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, termoplásticos-elastómeros) y lubricantes de aceite de silicona. Entre los polímeros comunes se incluyen polietileno (PE), polipropileno (PP), policarbonato (PC), etileno-propileno fluorado (FEP), etileno tetrafluoroetileno (ETFE) y politetrafluoroetileno (PTFE). Entre los elastómeros comunes se incluyen elastómeros saturados e insaturados: elastómero de bromobutilo, mezcla de clorobutilo-isopreno, caucho natural y caucho de poliisopreno sintético, caucho de butilo y caucho de butilo halogenado, caucho de estireno-butadieno, caucho de nitrilo, caucho de etileno-propileno (EPM) y caucho de etileno-propileno-dieno, caucho poliacrílico, caucho de silicona, caucho de fluorosilicona, fluoroelastómeros, perfluoroelastómeros, amidas en bloque de poliéter, polietileno clorosulfonado, etileno-acetato de vinilo, etc.

40 Se entiende que parte de un recipiente para uso médico puede contener compuestos contaminantes.

Otros materiales son poliéster, dicloruro de polivinilideno (PVDC), alcohol etilvinílico (EVOH), copolímero de poliamida (PA), tereftalato de polietileno (PET), polidimetilsiloxanos (PDMS) y polisulfona (PS).

45 Entre los metales comunes se incluyen cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, tungsteno y cinc, litio, boro, magnesio, aluminio, silicio, titanio, cromo, cobalto, arsénico, antimonio, bario y sus derivados oxidativos.

50 La expresión “recipiente para uso médico” se refiere a cualesquiera medios que se utilizan para “contener”, “alojar”, “mezclar”, “combinar”, “dispensar”, “inyectar”, “transferir”, “nebulizar”, etc. un producto biológico durante la investigación, procesamiento, desarrollo, formulación, fabricación, almacenamiento y/o administración. Por ejemplo, el recipiente para uso médico en la presente invención incluye, aunque sin limitación, material de vidrio de laboratorio general, matraces, vasos, probetas graduadas, fermentadores, biorreactores, tubos, tuberías, bolsas, bolsas de biomasa de un solo uso, jarras, viales, cierres de vial (por ejemplo, tapones de goma, rosca sobre capuchón), ampollas, jeringas, jeringas precargadas, jeringas precargables, autoinyectores, plumas inyectoras, tapones, tapones de jeringa, émbolos de jeringa, cierres de goma, cierres de plástico, cierres de vidrio, cilindros, capuchones de punta, capuchones, agujas, émbolos, tapones de émbolo, vástagos de émbolo, cilindros de vidrio, agujas hipodérmicas de acero inoxidable, coberturas de aguja de goma, tapón de émbolo de goma recubierta, etiquetas adhesivas, etiquetas de tinta, etiquetas de recubrimiento y similares. Pueden encontrarse recipientes adicionales para uso médico contemplados en la presente invención en catálogos publicados de proveedores y fabricantes de equipos de laboratorio, tales como VWR(TM) (West Chester, PA), BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), Fisher Scientific International Inc. (Hampton, NH) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

La expresión “jeringa precargada” se refiere a una jeringa ya cargada con un fluido, asimismo abreviada como PFS.

65 La expresión “jeringa precargable” se refiere a una jeringa vacía que puede llenarse.

El término “jeringa” se refiere a una jeringa precargada o precargable. La expresión “proveedor de dispositivo de administración farmacéutica” se refiere a una parte proveedora de un recipiente para uso médico.

5 Tal como se define en la presente memoria, un “producto biológico” utilizado en la presente invención incluye péptidos, proteínas, conjugados de polisacárido-proteína, producto biofarmacéutico a base de proteínas, productos farmacéuticos para uso humano y/o animal. La mayor parte del tiempo, el producto biológico podría ser un principio farmacéutico activo (API). Un API está destinado a proporcionar actividad farmacológica u otro efecto directo en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad o a afectar la estructura o cualquier función del cuerpo de seres humanos o animales.

15 El término “degradación” o “degradación química” se refiere a una modificación química de productos biológicos debido a la reacción con componentes en el medio, en particular por compuestos contaminantes. Generalmente, dichas modificaciones se producen con las cadenas laterales más reactivas y son predominantemente oxidaciones, reducciones y sustituciones nucleófilas y electrófilas. Entre las degradaciones se incluyen escisiones de enlaces peptídicos, racemizaciones, eliminaciones β y formaciones de productos mediante la reacción de proteínas con compuestos químicos añadidos. Las degradaciones excluyen el cambio conformacional natural, el cambio en la estructura nativa, tales como interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, etc.

20 El término “estabilidad” se refiere a estabilidad química, ya que no se produce degradación química del producto biológico. La estructura primaria del producto biológico se mantiene sin cambios durante el almacenamiento en el recipiente para uso médico o durante el contacto con parte de un recipiente para uso médico.

25 Tal como se indica en la presente memoria, la expresión “compuestos contaminantes” pretende cubrir los compuestos contaminantes que incluyen extraíbles, lixiviables o residuos del procesamiento.

30 Los extraíbles son compuestos que pueden extraerse de parte de un recipiente para uso médico, tales como componentes elastoméricos o plásticos, extraídos en presencia de un solvente, en particular bajo condiciones duras. Los extraíbles pueden ser mezclas complejas que consisten principalmente en oligómeros y aditivos de propiedades físicas y químicas diversas y con frecuencia se encuentran presentes a concentraciones mucho más bajas que cualquier otro ingrediente del producto biológico, dificultando la detección de su presencia. La American Food & Drug Administration (FDA) requiere la evaluación de los extraíbles para su impacto sobre la seguridad y eficacia de los productos biológicos.

35 Los lixiviables son compuestos que se lixivian hacia la formulación procedentes de parte de un recipiente para uso médico, tales como componentes elastoméricos o plásticos, en particular bajo condiciones de uso real. Entre los ejemplos de lixiviables se incluyen, aunque sin limitación, ácido acrílico, ácido metacrílico, diacrilato de 1,6-hexanodiol y maleato de dibutilo. El impacto de los lixiviables sobre el producto biológico puede estar relacionado con la degradación, agregación, formación de partículas y/o problemas de calidad del producto, tales como la reacción con la formulación o proteínas.

40 La expresión “residuos de procesamiento” se refiere a compuestos químicos procedentes del recipiente para uso médico o procedentes de los procedimientos de fabricación o llenado del producto farmacéutico inyectable. A título de ejemplo de residuos de procesamiento podrían indicarse: tensioactivos, tungsteno, ácidos orgánicos, sin limitarse a esta lista.

45 El término “alquilo (C1-C6)”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una cadena de hidrocarburo saturado monovalente ramificado que contiene 1 a 6 átomos de carbono, incluyendo, aunque sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares.

50 El término “alqueno (C2-C6)”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una cadena de hidrocarburo insaturado monovalente lineal o ramificado que contiene 2 a 6 átomos de carbono y que comprende por lo menos un doble enlace, incluyendo, aunque sin limitación, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo y similares.

55 El término “alquino (C2-C6)”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una cadena de hidrocarburo insaturado monovalente lineal o ramificado que contiene 2 a 6 átomos de carbono y que comprende por lo menos un triple enlace, incluyendo, aunque sin limitación, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo y similares.

60 El término “alcoxi C₁-C₆”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un grupo alquilo (C1-C6) tal como se ha definido anteriormente, unido a la molécula mediante un átomo de oxígeno, incluyendo, aunque sin limitación, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, t-butoxi, n-pentoxi, n-hexoxi y similares.

65 El término “alcoxicarbonilo (C1-C6)”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un grupo alcoxi C₁-C₆ tal como se ha definido anteriormente, unido a la molécula mediante un grupo -C(=O)-, incluyendo, aunque sin limitación, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo y t-butiloxicarbonilo (Boc).

El término "arilo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un grupo hidrocarburo aromático que comprende preferentemente 6 a 10 átomos de carbono y que comprende uno o más anillos fusionados, tales como, por ejemplo, un grupo fenilo o naftilo. Ventajosamente, es un grupo fenilo.

5 La expresión "grupo protector", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un grupo químico que bloquea selectivamente un sitio reactivo en un compuesto multifuncional de manera que se lleva a cabo selectivamente una reacción química en otro sitio reactivo no protegido.

10 La expresión "grupo protector de O", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un sustituyente que protege los grupos hidroxilo (OH) de los compuestos de fórmula (I) frente a reacciones no deseables durante los procedimientos sintéticos, tales como los grupos protectores de O dados a conocer en Greene's Protective Groups In Organic Synthesis", 4a edición, 2007, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. Habitualmente, el grupo OX de los compuestos de fórmula (I) se cubre con dicho grupo protector a fin de proteger la función hidroxilo. Un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector de O puede ser, por ejemplo, un éter, un carbonato, un acetal y similares. En particular, los grupos protectores de O pueden ser un alquilo (C1-C6) sustituido opcionalmente con uno o varios (particularmente 1 a 3) átomos de halógeno (tales como átomos de cloro), tales como metilo, etilo, terc-butilo o 2,2,2-tricloroetilo, un aril-alquilo (C1-C6), tal como bencilo, estando la fracción arilo sustituida opcionalmente con uno o varios grupos metoxi, tales como bencilo (Bn) o p-metoxibencilo (PMB), un derivado tritilo de fórmula -CAr1Ar2Ar3, tal como trifenilmetilo (asimismo denominado tritilo, - Tr), (4-metoxifenil)difenilmetilo (también denominado metoxitritilo, - NMT) o bis-(4-metoxifenil)fenilmetilo (asimismo denominado dimetoxitritilo - DMT); un grupo metilo sustituido de fórmula CH₂ORGP2 o CH₂SRGP2 (en particular, CH₂ORGP2), por ejemplo, metoximetilo (MOM), benciloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2-(trimetilsilil)etoximetilo o metiltiometilo; un grupo etilo sustituido de fórmula CH₂CH₂ORGP2 o -CH₂CH₂SRGP2 (en particular, -CH₂CH₂ORGP2), por ejemplo, etoxietilo (EE); un grupo sililo de fórmula -SiRGP3RGP4RGP5, por ejemplo, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), t-butildimetilsililo (TBS o TBDMS) y t-butildifenilsililo (TBDPS); un grupo carbonilado de fórmula CO-RGP6, tal como acetilo (Ac), pivaloilo (Piv o Pv) o benzoilo (Bz) o de fórmula -CO₂-RGP7, tal como aliloxicarbonilo (Alloc) o 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc); o un grupo tetrahidropirano (THP) o tetrahidrofuranilo,

30 en los que Ar1, Ar2 y Ar3 representan, independientemente unos de otros, un arilo, tal como fenilo, sustituido opcionalmente con uno o varios grupos metoxi; RGP2 representa un alquilo (C1-C6) (tal como metilo o etilo) sustituido opcionalmente con un arilo (tal como fenilo), un alcoxi C₁-C₆ (tal como metoxi) o un grupo trialkilsililo (tal como SiMe₃); RGP3, RGP4 y RGP5 que representan, independientemente unos de otros, un grupo alquilo (C1-C6) o arilo (tal como fenilo), y RGP6 y RGP7 representan, independientemente uno de otro, un alquilo (C1-C6), un alquenilo (C2-C6), un arilo, un aril-alquilo (C1-C6) o un grupo 9-fluorenilmetilo.

35 En particular, será un grupo bencilo, acetilo o metoximetilo.

40 La expresión "grupo protector de N", tal como se utiliza en la presente invención, sirve principalmente para controlar la síntesis del compuesto de fórmula (I). Con este propósito, todas las fracciones típicamente utilizadas en la química de péptidos, como grupos protectores en general, resultan adecuadas. Habitualmente, el grupo X₂N de los compuestos de fórmula (I) se cubre con dicho grupo protector a fin de proteger la función amina frente a reacciones no deseables durante los procedimientos sintéticos. Los grupos protectores de N utilizados comúnmente se dan a conocer en "Greene's Protective Groups In Organic Synthesis", 4a edición, 2007, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. La función amina X₂N protegida con un grupo protector de N puede ser un carbamato, una amida, una sulfonamida, un derivado de N-alquilo, un derivado de aminoacetal, un derivado N-bencilo, un derivado imina, un derivado enamina o un derivado de N-heteroátomo. En particular, los grupos protectores de N pueden ser formilo; un arilo, tal como un fenilo, sustituido opcionalmente con uno o varios grupos metoxi, tales como p-metoxifenilo (PMP); un aril-alquilo (C1-C6), tal como un bencilo, estando la fracción arilo sustituida opcionalmente con uno o varios grupos metoxi, tales como bencilo (Bn), p-metoxibencilo (PMB) o 3,4-dimetoxibencilo (DMPM); CO-RGP1, tal como acetilo (Ac), pivaloilo (Piv o Pv), benzoilo (Bz) o p-metoxibencilcarbonilo (Moz); -CO₂-RGP1, tal como t-butiloxicarbonilo (Boc), tricloroetoxicarbonilo (TROC), aliloxicarbonilo (Alloc), benciloxicarbonilo (Cbz o Z) o 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc); -SO₂-RGP1, tal como fenilsulfonilo, tosilo (Ts o Tos) o 2 nitrobenzenosulfonilo (asimismo denominado nosilo - Nos o Ns), y similares,

55 en el que RGP1 representa un alquilo (C1-C6) sustituido opcionalmente con uno o varios átomos de halógeno, tales como F o Cl; un alquenilo (C2-C6), tal como un alilo; un arilo, tal como fenilo, sustituido opcionalmente con uno o varios grupos seleccionados de OMe (metoxi) y NO₂ (nitro); un aril-alquilo (C1-C6), tal como un bencilo, estando la fracción arilo sustituida opcionalmente con uno o varios grupos metoxi, o un grupo 9-fluorenilmetilo.

60 En particular, puede ser un grupo terc-butiloxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Cbz) o 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc).

65 La expresión "cromatografía líquida", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a técnicas analíticas utilizando un aparato de cromatografía líquida utilizado para separar compuestos acoplado con un detector utilizado para detectar los productos de degradación de fórmula (I) y la presencia de compuestos contaminantes. El aparato de cromatografía líquida podría seleccionarse de HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento),

UPLC (cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento), UHPLC (cromatografía líquida de rendimiento ultraelevado) y RRLC (cromatografía líquida de resolución rápida). El detector podría seleccionarse de entre detector de UV, detector de matriz de diodos (DAD), espectrómetro de masas (EM), detector de matriz de fotodiodos (PDA) combinado con un espectrómetro de masas (PDA/EM o DAD/EM), detección evaporativa de dispersión lumínica (ELSD) y detector corona CAD.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un cromatograma de UPLC/DAD del pentapéptido AAWAA tras 15 o 30 días a 25°C/60% de humedad relativa (HR) en contacto directo con un tapón de émbolo recubierto y con uno no recubierto.

La figura 2 son los espectros de masas en modo de electropulverización positiva (ESI+) de: (a) péptido AAWAA intacto (tiempo de retención: 17,2 min) y (b) forma oxidada de AAWAA (tiempo de retención: 17,1 min) detectado tras 30 días (25°C) de contacto entre el tapón de émbolo no recubierto y la disolución de péptido AAWAA.

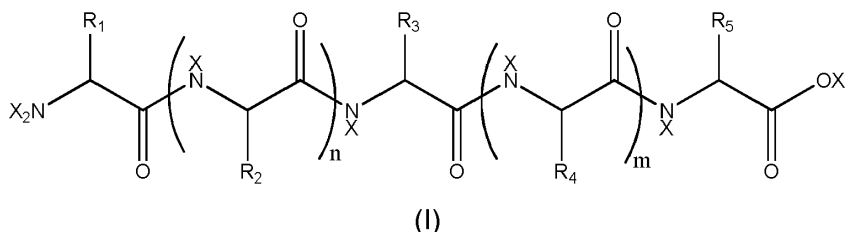
La figura 3 es el cromatograma de ULPC/DAD del péptido AAHAA tras 3 días a 70°C en contacto directo con dos componentes de jeringa: (a) adhesivo y (b) tungsteno insoluble, (c) es AAHAA de referencia.

La figura 4 es la comparación entre el perfil de degradación de los péptidos AAMAA en el caso de que se almacenen en contacto directo con capuchón de punta de elastómero termoplástico (TPE) durante 3 días a 70°C.

Descripción de la invención

La invención se refiere a un método para determinar el porcentaje de degradación de un compuesto de fórmula (I) mediante el contacto con parte de un recipiente para uso médico, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- i) preparar una disolución acuosa que comprende un compuesto de fórmula (I) a continuación:



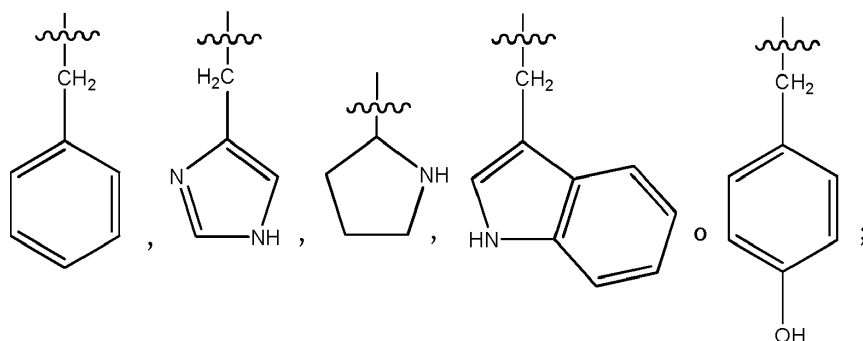
en la que:

R₁, R₂, R₄ y R₅ representan, cada uno independientemente, H o un grupo alquilo (C1-C6), alqueno (C2-C6) o alquino (C2-C6),

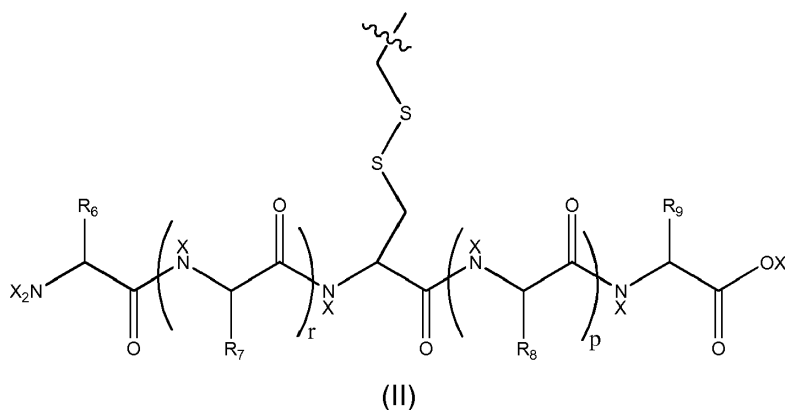
X representa H o un grupo alquilo (C1-C6), alqueno (C2-C6), alquino (C2-C6), alcoxicarbonilo (C1-C6), arilo o un grupo protector,

n y m representan, cada uno independientemente, un número entero entre 0 y 10,

R₃ representa -(CH₂)₂-COOH, -CH₂-COOH, -(CH₂)₄-COOH, -CH₂-OH, -C(OH)-CH₃, -CH₂-CO-NH₂, CH₂-SH, -(CH₂)₄-NH₂, -(CH₂)₂-CO-NH₂, -CH₂-CH₂-S-CH₃, -(CH₂)₃-NH-C(NH)-NH₂,



o R₃ representa un grupo de fórmula (II), a continuación:



5 en la que R_6 , R_7 , R_8 y R_9 representan, cada uno independientemente, H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenoilo (C2-C6) o alquinoilo (C2-C6),

X representa H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenoilo (C2-C6), alquinoilo (C2-C6), alcocarbonilo (C1-C6), arilo o un grupo protector,

10 r y p representan, cada uno independientemente, un número entero entre 0 y 10,

ii) añadir a la disolución preparada en la etapa i) parte de un recipiente para uso médico durante un periodo de tiempo de 1 hora a 2 meses, a una temperatura comprendida en el intervalo de entre 5°C y 80°C,

15 iii) analizar mediante cromatografía líquida la disolución obtenida en la etapa ii), y

iv) determinar el porcentaje de degradación.

20 Según el método de la invención, el contacto con parte de un recipiente para uso médico puede ser directo o indirecto. La expresión contacto directo se refiere a que el producto biológico se encuentra en contacto con parte del recipiente sin ningún intermediario. La expresión contacto indirecto se refiere a que el producto biológico en ningún momento entra en contacto con parte del recipiente, aunque entra en contacto con otro compuesto/intermediario que ha estado en contacto directo con parte de dicho recipiente.

25 Etapa (i):

En la etapa i) se prepara una disolución acuosa. La disolución acuosa preparada en la etapa i) comprende preferentemente 30% a 100% de agua, más preferentemente 75% a 100%, todavía más preferentemente de 85% a 100%, porcentaje en masa.

30 Según una variante, la disolución acuosa preparada en la etapa i) puede contener además excipientes, agentes amortiguadores, ácidos, bases, sales, conservantes, solubilizadores, tensioactivos, agentes quelantes, azúcares, aminoácidos, péptidos, solventes y combinaciones de los mismos.

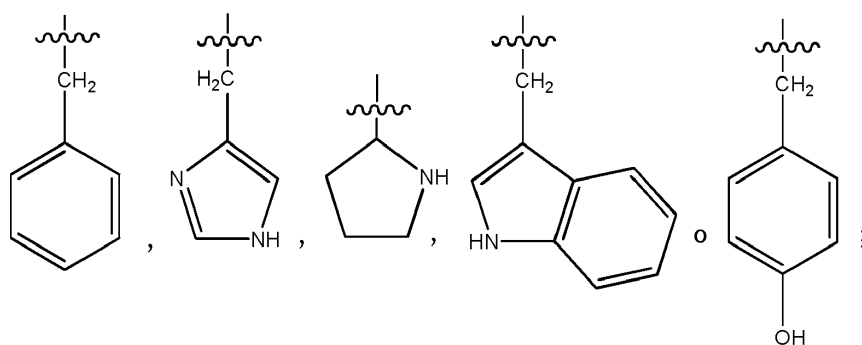
35 La disolución acuosa preparada en la etapa i) comprende preferentemente por lo menos 5 µg/ml de compuesto de fórmula (I), más preferentemente por lo menos 15 µg/ml. La cantidad de compuesto de fórmula (I) utilizada en la etapa i) depende de la sensibilidad del aparato detector utilizado en la etapa iii), habitualmente se utilizan 45 µg/ml en la etapa i) a fin de detectar los productos de degradación peptídica sintetizados.

40 En una forma de realización preferida de la invención, el compuesto utilizado en la etapa i) es de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que X=H.

En una forma de realización preferida de la invención, el compuesto utilizado en la etapa i) es de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que $n=1$ y $m=1$.

45 En una forma de realización preferida de la invención, el compuesto utilizado en la etapa i) es de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que R_1 , R_2 , R_4 y R_5 representan, cada uno, CH_3 y X=H, $n=1$ y $m=1$.

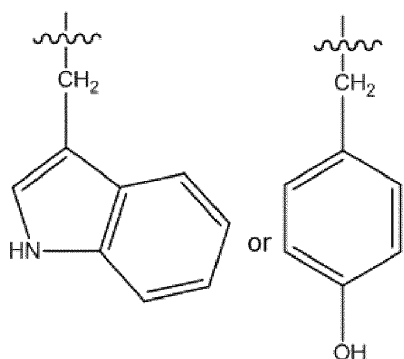
50 En una forma de realización preferida de la invención, el compuesto utilizado en la etapa i) es de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que R_1 , R_2 , R_4 y R_5 representan, cada uno, CH_3 y X=H, $n=1$, $m=1$ y R_3 es uno de entre:



5 En una forma de realización preferida de la invención, el compuesto utilizado en la etapa i) es de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que R_1 , R_2 , R_4 y R_5 representan, cada uno, CH_3 , y $X=H$, $n=1$, $m=1$ y R_3 es uno de entre:

$-CH_2-CH_2-S-CH_3$ (Met), $-(CH_2)_3-NH-C(NH)-NH_2$ (Arg), $-(CH_2)_4-NH_2$ (Lys), $-CH_2-CO-NH_2$ (Asn), $-CH_2-COOH$ (Asp), $CH_2-CH_2-CO-NH_2$ (Gln), $-(CH_2)_2-COOH$ (Glu).

10 En una forma de realización preferida de la invención, el compuesto utilizado en la etapa i) es de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que R_1 , R_2 , R_4 y R_5 representan, cada uno, CH_3 , y $X=H$, $n=1$, $m=1$ y R_3 es uno de $-CH_2-CH_2-S-CH_3$.



15 Etapa (ii):

20 Durante la etapa ii), parte de un recipiente para uso médico se añade a la disolución preparada en la etapa i) durante un periodo de tiempo de 1 hora a 2 meses, a una temperatura comprendida en el intervalo de entre $5^\circ C$ y $80^\circ C$.

Preferentemente, la etapa ii) se lleva a cabo bajo agitación parcial y/o en una cámara climática.

25 Preferentemente, la parte del recipiente para uso médico es una jeringa, una jeringa precargable, parte de una jeringa precargable, una jeringa precargada o parte de una jeringa precargada (ver las definiciones, anteriormente).

Preferentemente, la parte del recipiente para uso médico es un cilindro, un capuchón de punta, un capuchón, una aguja o un tapón de émbolo, todos de una jeringa, una jeringa precargable o una jeringa precargada.

30 Preferentemente, la parte del recipiente para uso médico es de vidrio, caucho, tungsteno o sus derivados, adhesivo, aceite de silicona, plástico o metal (aluminio, boro, silicio, magnesio, cinc o cromo).

La duración preferente de la etapa ii) se encuentra comprendida en el intervalo de 4 horas a 2 meses. Más preferentemente, la duración de la etapa ii) se encuentra comprendida en el intervalo de 7 días a 45 días.

35 La temperatura de la etapa ii) del método según la invención preferentemente se encuentra en el intervalo de $10^\circ C$ a $80^\circ C$, más preferentemente de $15^\circ C$ a $75^\circ C$, todavía más preferentemente de $18^\circ C$ a $70^\circ C$, todavía más preferentemente de $18^\circ C$ a $30^\circ C$. La temperatura de la etapa ii) del método según la invención es preferentemente $25^\circ C$, $45^\circ C$ o $70^\circ C$.

40 Etapa (iii):

En la etapa iii), la disolución obtenida en la etapa ii) se analiza mediante cromatografía líquida.

5 La cromatografía preferida es la cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (UPLC). El detector preferido se selecciona de entre espectrómetro de masas (EM), detector de matriz de fotodiodos (PDA) y detector de matriz de fotodiodos en combinación con un espectrómetro de masas (PDA/EM). Preferentemente, la cromatografía líquida es cromatografía líquida UPLC/detector de matriz de fotodiodos en combinación con un espectrómetro de masas.

10 Se obtiene un cromatograma de PDA a fin de permitir la evaluación del rendimiento de degradación del péptido mimético sintetizado (compuesto de fórmula (I)) y la detección de los productos de degradación relacionados. Se obtiene el espectro de EM a fin de permitir la identificación de los productos de degradación de los compuestos de fórmula (I).

Etapa (iv):

15 La etapa iv) es la determinación del porcentaje de degradación del compuesto de fórmula (I).

Etapa (v):

20 El método según la invención puede comprender, además, después de la etapa iv), una etapa de medición v) mediante espectrometría de masas y una etapa vi) de identificación de la degradación química, tal como una oxidación o una desaminación. El detector de EM asimismo puede utilizarse para la determinación del porcentaje de degradación del compuesto de fórmula (I) en el caso de que el compuesto de fórmula (I) coeluya con un producto contaminante o cualesquiera compuestos presentes en el producto biológico.

25 En la presente descripción, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los porcentajes son en masa.

Se proporcionan los ejemplos a continuación para la invención únicamente a título ilustrativo y no limitativo.

30 **Ejemplos**

Materiales:

35 Se sintetizaron pentapéptidos AAXAA en GeneCust (Luxemburgo) con una pureza >99%. Se adquirió PBS (solución salina amortiguada con fosfato) y amortiguador de acetato amónico de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todos los demás reactivos eran de grado analítico.

El recubrimiento se refiere a ETFE (etileno-tetrafluoroetileno).

40 El péptido nº 1 presentaba la fórmula siguiente: Ala-Ala-Trp-Ala-Ala (AAWAA)
El péptido nº 2 presentaba la fórmula siguiente: Ala-Ala-His-Ala-Ala (AAHAA)
El péptido nº 3 presentaba la fórmula siguiente: Ala-Ala-Met-Ala-Ala (AAMAA)

45 La parte del recipiente utilizada fue el tapón del émbolo y el capuchón de punta de TPE de diferentes fabricantes de caucho (tales como Becton Dickinson, Aptar Stelmi, West, Sumitomo), el adhesivo utilizado para unir la aguja y tungsteno insoluble, residuos potenciales del procedimiento de formación de la punta.

Aparato:

50 La cromatografía líquida utilizada era de Waters.

Se analizaron las disoluciones de péptidos mediante CL/DAD/EM con el espectrómetro de masas Quattro Premier XE Mass, de Waters.

55 El software utilizado era Mass Lynx.

Ejemplo 1: ensayos de un tapón de émbolo con péptido mimético nº1

60 El péptido AAWAA se disolvió en amortiguador de acetato de amonio pH 4 (20 m) + Tween-80 al 0,02% hasta una concentración final de 45 µg/ml. Las disoluciones de péptido AAWAA obtenidas se almacenaron en contacto directo con un tapón de émbolo no recubierto y uno recubierto con ETFE durante 30 días a 25°C/60% de HR.

Se presentan los resultados en las figuras 1 y 2.

65 La figura 1 es un cromatograma de UPLC/DAD de pentapéptido AAWAA en contacto directo con un tapón de émbolo recubierto y uno no recubierto tras 15 días (c, d) y tras 30 días (a, b) de almacenamiento a 25°C/60% de

HR. Los cromatogramas e y f son disoluciones de AAWAA de referencia (sin ningún contacto directo con tapones de émbolo).

5 La figura 2 son los espectros de masas en modo de electropulverización positiva (ESI+) de: (a) péptido AAWAA intacto (tiempo de retención: 17,2 min) y (b) forma oxidada de AAWAA (tiempo de retención: 17,1 min) detectado tras 30 días (25°C) de contacto entre el tapón de émbolo no recubierto y la disolución de péptido AAWAA.

10 Tal como se observa en la figura 1 (a y b), el rendimiento de degradación de AAWAA es más importante en el caso de que el péptido se encuentre en contacto directo con el tapón de émbolo no recubierto. En la figura 1b se muestran productos de degradación de AAWAA. El rendimiento de degradación más elevado de AAWAA al almacenarlo en contacto directo con el tapón no recubierto subraya los mayores riesgos del aminoácido W y las interacciones lixiviables.

15 **Ejemplo 2: ensayos de residuos de adhesivo y de tungsteno con el péptido mimético nº 2 a temperatura elevada y tiempo de duración corto**

20 El péptido AAHAA se disolvió en amortiguador de acetato de amonio pH 4 (20 mM) + Tween-80 al 0,02% hasta una concentración final de 45 µg/ml. La disolución de péptido AAHAA se almacenó en contacto directo con el adhesivo utilizado para unir la aguja a la jeringa y con tungsteno insoluble, un potencial residuo de procesamiento, durante 3 días a 70°C.

Se presentan los resultados en la figura 3.

25 La figura 3 son cromatogramas de ULPC/DAD del péptido AAHAA tras 3 días a 70°C en contacto directo con dos componentes de jeringa: (a) adhesivo y (b) tungsteno insoluble; (c) son cromatogramas de referencia.

Tal como se observa en la figura 3, los péptidos AAHAA reaccionan con el tungsteno insoluble tras 3 días a 70°C.

30 **Ejemplo 3: ensayos de un capuchón de punta con péptido mimético nº 3 a temperatura elevada y tiempo de duración corto**

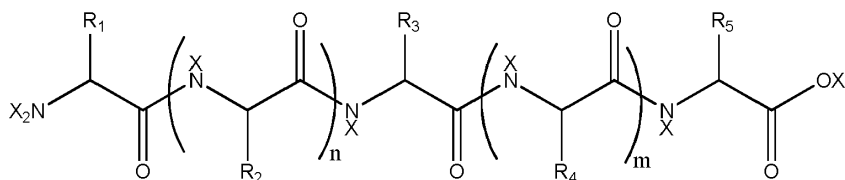
35 Las disoluciones de péptido AAWAA se disolvieron en amortiguador de PBS pH 7 (20 mM) + Tween-80 (al 0,02%) hasta una concentración final de 45 µg/ml. Las disoluciones de péptido AAMAA obtenidas se almacenaron en contacto directo con un capuchón de punta de TPE durante 3 días a 70°C.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar el porcentaje de degradación de un compuesto de fórmula (I) mediante el contacto con parte de un recipiente para uso médico, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

5

i) preparar una disolución acuosa que comprende un compuesto de fórmula (I) a continuación:



(I)

en la que:

10

R₁, R₂, R₄ y R₅ representan cada uno independientemente de otro H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenilo (C2-C6) o alquinilo (C2-C6);

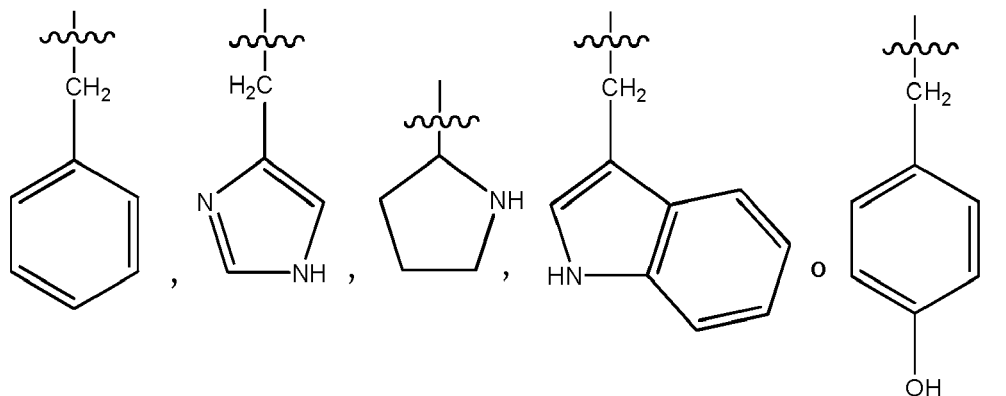
15

X representa H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenilo (C2-C6), alquinilo (C2-C6), alcoxicarbonilo (C1-C6), arilo o un grupo protector;

n y m representan cada uno independientemente de otro un número entero de 0 a 10;

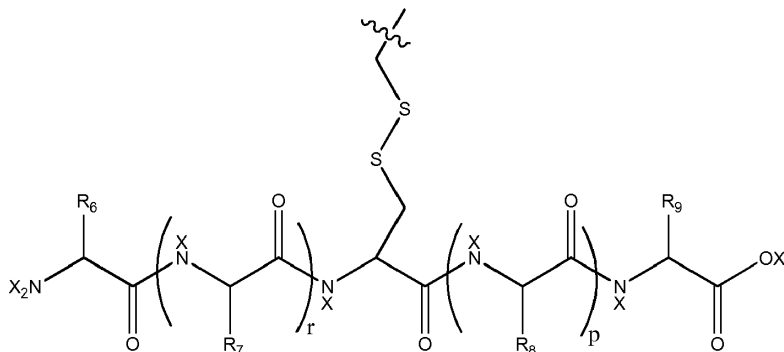
20

R₃ representa -(CH₂)₂-COOH, -CH₂-COOH, -(CH₂)₄-COOH, -CH₂-OH, -C(OH)-CH₃, -CH₂-CO-NH₂, CH₂-SH, -(CH₂)₄-NH₂, -(CH₂)₂-CO-NH₂, -CH₂-CH₂-S-CH₃, -(CH₂)₃-NH-C(NH)-NH₂;



o R₃ representa un grupo de fórmula (II) a continuación:

25



(II)

con R₆, R₇, R₈ y R₉ representando cada uno independientemente de otro H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenilo (C2-C6) o alquinilo (C2-C6);

30

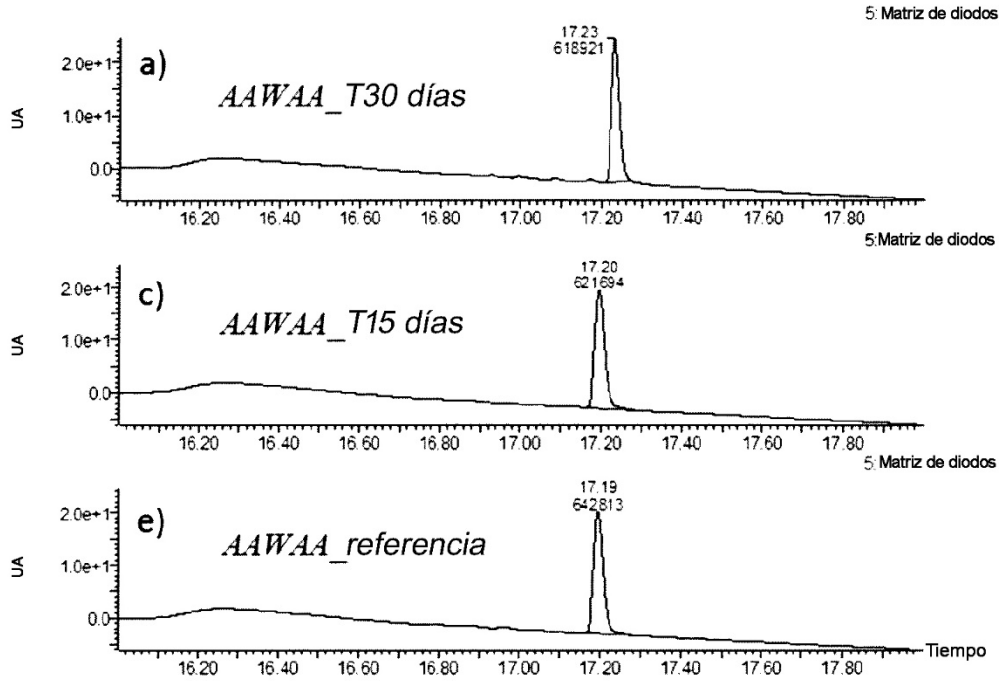
X representa H o un grupo alquilo (C1-C6), alquenilo (C2-C6), alquinilo (C2-C6), alcoxicarbonilo (C1-C6), arilo o un grupo protector;

r y p representan cada uno independientemente de otro un número entero de 0 a 10;

- 5 ii) añadir a la disolución preparada en la etapa i) parte de un recipiente para uso médico durante un periodo de tiempo de 1 hora a 2 meses, a una temperatura en un intervalo de 5 a 80°C;
- iii) analizar mediante cromatografía líquida la disolución obtenida en la etapa ii); y
- 10 iv) determinar el porcentaje de degradación.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además después de la etapa iv), una etapa de medición v) mediante espectrometría de masas y una etapa vi) de identificación de la degradación química, como una oxidación o una desaminación.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R₁, R₂, R₄ y R₅ representan cada uno CH₃, y X=H, n=1 y m=1.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución acuosa preparada en la etapa i) comprende de 30 a 100% de agua, porcentaje en masa.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución acuosa preparada en la etapa i) contiene además excipientes, agentes amortiguadores, ácidos, bases, sales, conservantes, solubilizadores, tensioactivos, agentes quelantes, azúcares, aminoácidos, péptidos, solventes y combinaciones de los mismos.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución acuosa preparada en la etapa i) comprende por lo menos 5 µg/ml de compuesto de fórmula (I).
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la parte del recipiente para uso médico es una jeringa, una jeringa precargable, parte de una jeringa precargable, una jeringa precargada o parte de una jeringa precargada.
- 35 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la parte del recipiente para uso médico es un cilindro, un capuchón de punta, un capuchón, una aguja o un tapón de émbolo, todos de una jeringa, una jeringa precargable o una jeringa precargada.
- 40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la parte del recipiente para uso médico es vidrio, caucho, tungsteno o sus derivados, adhesivo, aceite de silicona, plástico, metal o (aluminio, boro, silicio, magnesio, cinc o cromo).
- 45 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la duración de la etapa ii) se encuentra en el intervalo de 4 horas a 2 meses, preferentemente de 7 días a 45 días.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura de la etapa ii) se encuentra en el intervalo de 15 a 75°C, preferentemente de 18 a 70°C.

Figura 1

Tapón de émbolo recubierto



Tapón de émbolo no recubierto

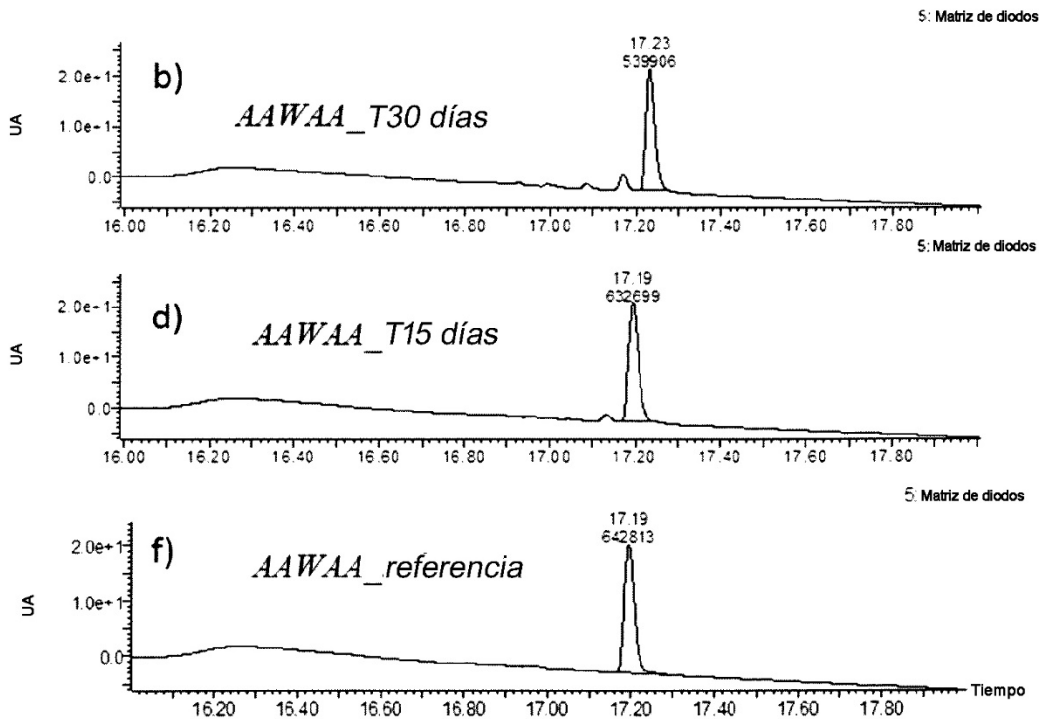
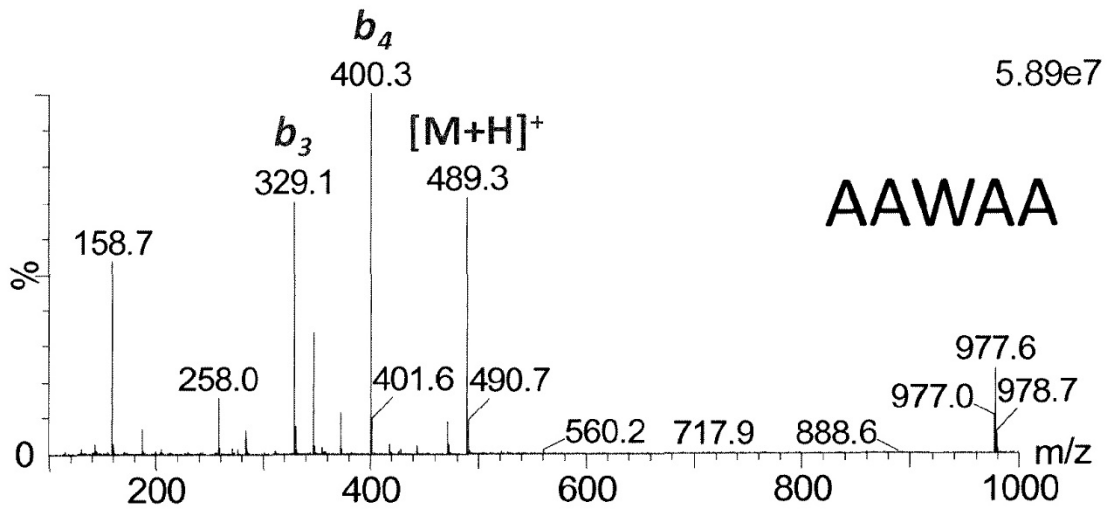


Figura 2

(a)



(b)

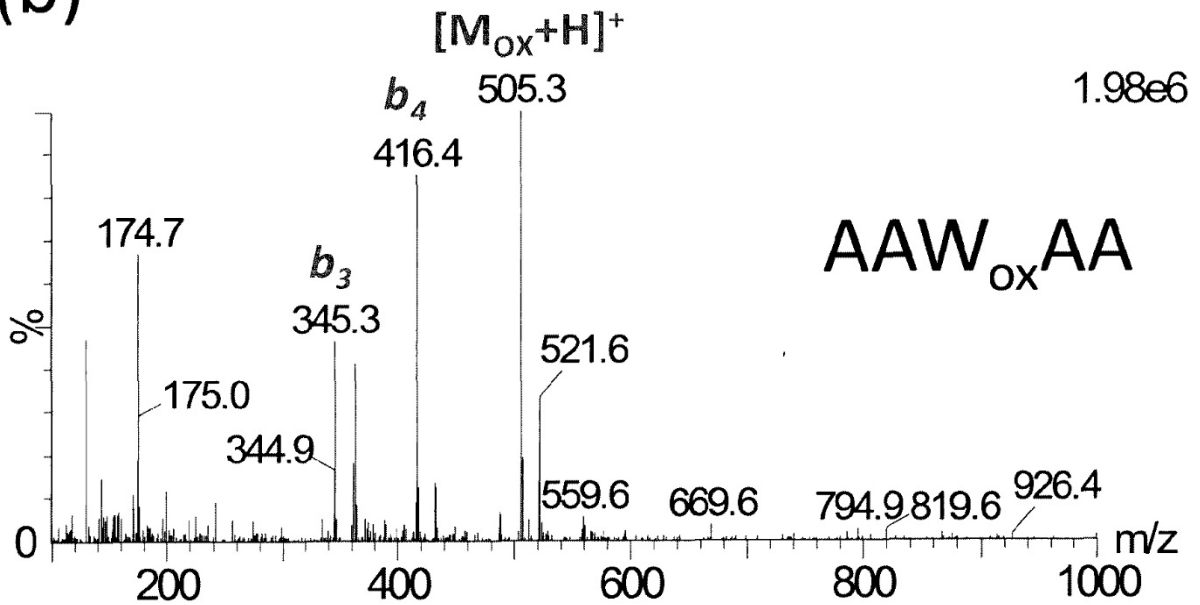


Figura 3

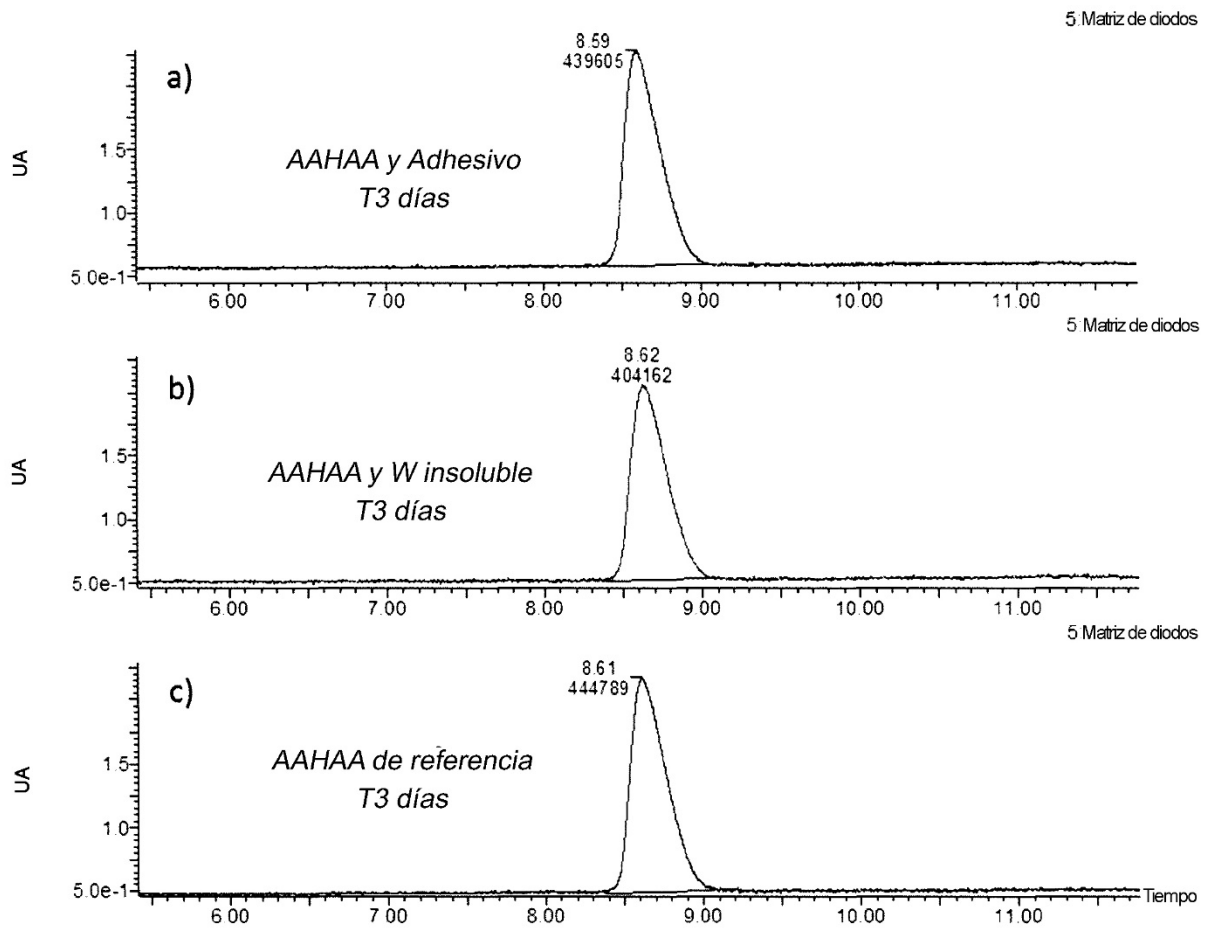


Figura 4

