

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 029 282**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

C12Q 1/527 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2020** **PCT/US2020/031605**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2020** **WO20227364**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2020** **E 20727547 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2025** **EP 3966343**

54 Título: **Métodos para cuantificar la concentración de fármaco en una composición de profármaco**

30 Prioridad:

07.05.2019 US 201962844579 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
23.06.2025

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.00%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

ALVING, KIM y
WANG, BING

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 029 282 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

Métodos para cuantificar la concentración de fármaco en una composición de profármaco

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para cuantificar la cantidad de fármaco presente en una composición de profármaco.

10 ANTECEDENTES

En promedio, durante la última década, 17 nuevos péptidos han entrado en ensayos clínicos cada año con tasas de aprobación (desde la fase 1 hasta la comercialización) del doble de las de las moléculas pequeñas (Dharanipragada (2013) Future Medicinal Chemistry 5(7):831; Kaspar y Reichert (2013) Drug Discovery Today 18:807-817), y más de 150 candidatos a fármacos peptídicos están actualmente en desarrollo (Lau y Dunn (2018) Bioorganic & Medicinal Chemistry 26:2700-2707).

Sin embargo, el desarrollo de fármacos peptídicos presenta desafíos específicos. Por ejemplo, los fármacos peptídicos están sujetos a escisión proteolítica y se eliminan rápidamente *in vivo*. La administración oral sigue siendo un desafío, en parte debido a la baja permeabilidad de las membranas biológicas. Los intentos para remediar estas deficiencias se han realizado mediante la incorporación de restricciones conformacionales tales como la formación de péptidos cíclicos (p. ej., mediante lactamizaciones y ciclaciones de clics), grapado de hidrocarburos, lipidación y el desarrollo de conjugados de fármacos poliméricos.

Un ejemplo de un fármaco peptídico es SAR425899, un agonista del receptor dual que fija como objetivo a los receptores de glucagón y GLP1 y puede facilitar el control glucémico y la pérdida de peso en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, así como la pérdida de peso en voluntarios sanos (Tillner et al. (2019) Diabetes Obes. Metab. 21:120, doi: 10.1111/dom.13494, EPUB 16 de septiembre de 2018). Sin embargo, debido al rápido aclaramiento *in vivo*, se requiere una dosis una vez al día de SAR425899.

El ácido hialurónico (HA), al que también se alude como hialuronano, es un polisacárido lineal no sulfato de origen natural compuesto por unidades disacárido repetitivas de ácido d-glucurónico y N-acetil-d-glucosamina enlazadas por enlaces glicosídicos β -1-3 y β -1-4 (Khunmanee et al. (2017) J. Tissue Engineering vol. 8 (doi: doi.org/10.1177/2041731417726464)). El HA es un elemento estructural importante en la piel y participa en un cierto número de interacciones con receptores de superficie celular. El HA tiene actividad inmunosupresora y antiangiogénica, y está presente en el tejido cerebral, el cartílago hialino y el líquido de las articulaciones sinoviales. Debido a su fuerte carácter hidrófilo y su alto peso molecular en tejidos biológicos que pueden absorber una gran cantidad de agua, hasta 1000 veces su volumen sólido, el HA exhibe importantes funciones estructurales y funcionales en el cuerpo.

Debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, el HA ha encontrado numerosas aplicaciones en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Sin embargo, el HA es altamente soluble y a menudo exhibe propiedades mecánicas muy pobres con un comportamiento de degradación rápido *in vivo*. Por lo tanto, el HA se ha modificado químicamente y/o reticulado para mejorar sus propiedades, incluyendo la mecánica, la viscosidad, la solubilidad, la degradación y la biológica. Se han creado y utilizado derivados de HA en armazones para la ingeniería tisular, en cirugía de tejidos blandos, tal como el aumento de pliegues vocales, el suministro de fármacos, el suministro intracelular de ARNip, la cicatrización de heridas y como dispositivo en procedimientos quirúrgicos.

El ácido hialurónico reticulado (xHA) forma un hidrogel de múltiples millones de Dalton en un entorno acuoso y puede enlazarse a un fármaco (p. ej., un fármaco peptídico) para estabilizar el fármaco *in vivo*. Sin embargo, es difícil tanto cuantificar la cantidad de fármaco cargada en el hidrogel como cuantificar la velocidad de liberación del fármaco desde el hidrogel. Las mediciones UV simples que se aplican típicamente para la cuantificación básica de péptidos en solución no se pueden aplicar para los hidrogeles, ya que análisis de este tipo requieren que el complejo de hidrogel enlazado al fármaco se disuelva completamente.

Métodos alternativos para la hidrólisis acelerada del enlazador y la liberación de un fármaco peptídico utilizando una temperatura elevada o un pH elevado conducen a la degradación parcial del fármaco peptídico, produciendo por lo tanto una mezcla heterogénea que es difícil de cuantificar. Por consiguiente, se necesitan métodos de cuantificación analítica para cuantificar la carga de fármacos de composiciones de profármacos en hidrogeles de HA reticulados.

Yang et al. ("Target specific hyaluronic acid interferon alpha conjugate for the treatment of hepatitis C virus infection", BIOMATERIALS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 32, n° 33, 30 de julio de 2011) desarrolló un conjugado de ácido hialurónico e interferón alfa de acción prolongada (HA-IFN α) para el tratamiento de la infección por VHC. Ding et al. ("pH-Sensitive Coiled-Coil Peptide-Cross-Linked Hyaluronic Acid Nanogels: Synthesis and Targeted Intracellular Protein Delivery to CD44 Positive Cancer Cells", BIOMACROMOLECULES, vol. 19, n° 2, 12 de enero de 2018) diseñó nanogeles de ácido hialurónico (HA-cNGs) reticulados con péptidos de hélice superenrollada y sensibles al pH y los

testó para el suministro de proteína intracelular fijada como objetivo a células de cáncer de mama MCF-7 que sobre-expresan CD44. Yang et al. ("Molecular design of hyaluronic acid hydrogel networks for long-term controlled delivery of human growth hormone", SOFT MATTER, vol. 7, nº 3, 1 de enero de 2011) desarrolló una red de hidrogel de ácido hialurónico (HA) mediante la adición de Michael entre HA metacrilado con aminoetilo y HA tiolado, que permitió la liberación controlada de la hormona del crecimiento humano (hGH).

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Para abordar los desafíos analíticos de determinar la carga del fármaco en un hidrogel de HA reticulado (xHA), p. ej., para permitir la determinación de la carga peptídica de un hidrogel de xHA, se descubrieron métodos novedosos que permiten una cuantificación precisa de la carga del fármaco (p. ej., la carga peptídica biopolimérica del profármaco) medida como porcentaje de peso / peso. Los métodos descritos en esta memoria son altamente selectivos para la determinación de la carga de fármaco que se pueden aplicar a cualquier molécula pequeña (p. ej., un polipéptido, un polinucleótido o similares) que se pueden descomponer en componentes más pequeños (p. ej., mediante digestión proteolítica, hidrólisis o similares), y se pueden aplicar ampliamente para la determinación de la carga de fármacos, p. ej., profármacos que contienen biopolímeros. Los métodos descritos en esta memoria son útiles, por ejemplo, para controlar la administración de dosis del fármaco *in vivo* para el control de calidad de la carga del fármaco entre lotes de profármaco durante la fabricación. Los métodos descritos en esta memoria permiten la producción de fármacos, p. ej., fármacos peptídicos, que tienen semividas incrementadas *in vivo*, p. ej., fármacos tales como fármacos peptídicos que tienen semividas que aumentan de minutos a días.

Los métodos descritos en esta memoria proporcionan una diversidad de ventajas con respecto a métodos anteriores conocidos en la técnica, tales como métodos basados en RMN. Por ejemplo, los métodos basados en RMN tardan más y tienen un rendimiento inferior al de los métodos descritos en esta memoria. Los métodos basados en RMN requieren miligramos de material, mientras que los métodos novedosos descritos en esta memoria requieren sólo nanogramos de material. Además, el intervalo dinámico de los métodos basados en RMN es menor que el de los métodos novedosos descritos en esta memoria. Además, los métodos basados en RMN son más susceptibles a la interferencia por péptidos contaminantes que los métodos novedosos descritos en esta memoria.

En esta memoria se proporcionan métodos novedosos basados en el descubrimiento de que se puede utilizar una doble digestión enzimática seguida de cuantificación del producto o productos de digestión para cuantificar con precisión la carga de fármaco (p. ej., la carga de fármacos peptídicos) en un hidrogel. En determinadas realizaciones del método, un ácido hialurónico reticulado-enlazador-péptido (xHA-L-P) se incuba con una enzima para digerir el ácido hialurónico reticulado. Posteriormente, se aplica una enzima proteolítica para digerir el péptido fijado y producir productos de digestión proteolítica. Los productos de digestión proteolítica, que representan el péptido, se cuantifican posteriormente.

En determinadas realizaciones ejemplares del método, un conjugado de ácido hialurónico reticulado-enlazador-péptido (xHA-L-P) se pesa y se suspende como un hidrogel en tampón. El hidrogel se degrada enzimáticamente a ácido hialurónico oligomérico-enlazador-péptido (oHA-L-P), que es soluble. Los oligómeros resultantes de oHA-L-P están presentes como una mezcla heterogénea, que consiste en ácidos hialurónicos peptídicos, enlazadores y oligoméricos de diferentes longitudes. Esta heterogeneidad de ácido hialurónico oligomérico es indeseable para la cuantificación basada en espectrometría de masas, pero se puede aplicar para un ensayo basado en UV o fluorescencia menos específico. Por consiguiente, para un ensayo de referencia basado en espectrometría de masas, se introduce una segunda etapa de digestión endoproteolítica para digerir el fármaco peptídico y producir un producto de digestión peptídica homogéneo (p. ej., el producto de digestión peptídica C-terminal de 19 aminoácidos DFIEWLKAGGPSSGAPPPS-NH₂ (**Fig. 3**)). A continuación, el producto peptídico se puede detectar y cuantificar utilizando ensayos tales como, p. ej., cromatografía de líquidos / espectrometría de masas de alta resolución (LC/MS).

La presente invención proporciona un método para determinar la cantidad de fármaco presente en una formulación de profármaco de ácido hialurónico reticulado-enlazador-péptido (xHA-L-P). El método incluye las etapas de poner en contacto una muestra de la formulación del profármaco de xHA-L-P con una hialuronoglucosidasa, p. ej., una hialuronidasa (HAasa) o una liasa de hialuronato (HA), para generar un fármaco de ácido hialurónico oligomérico-enlazador-péptido (oHA-L-P), poniendo en contacto el oHA-L-P con una endoproteinasa para generar productos de digestión peptídica del fármaco, y detectar los productos de digestión peptídica para determinar la cantidad del fármaco presente en la formulación del profármaco xHA-L-P, en donde la endoproteinasa se selecciona del grupo que consiste en Glu-C, Asp-N, Lys-C, Arg-C, tripsina y quimotripsina.

En determinadas realizaciones ejemplares, los productos de digestión peptídica son entre aproximadamente 2 aminoácidos y aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 3 aminoácidos y aproximadamente 75 aminoácidos de longitud, son entre aproximadamente 4 aminoácidos y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, son entre aproximadamente 6 aminoácidos y aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, son entre aproximadamente 15 aminoácidos y aproximadamente 20 aminoácidos de longitud o son de aproximadamente 19 aminoácidos de longitud. En determinadas realizaciones ejemplares, los productos de digestión peptídica son de aproximadamente 1, aproximadamente 2 o aproximadamente 3 aminoácidos de longitud.

En determinadas realizaciones ejemplares, la etapa de detectar los productos de digestión peptídica se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en una o una combinación de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía de líquidos espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS), absorbancia ultravioleta (UV) y detección de fluorescencia.

En determinadas realizaciones ejemplares, la hialuronoglucosidasa es una HAasa seleccionada del grupo que consiste en HAasa 1, HAasa 2, HAasa 3, HAasa 4, HAasa 5 y HAasa 6. En otras realizaciones ejemplares, la hialuronoglucosidasa es HAasa 1 o HAasa 2. En aún otras realizaciones ejemplares, la hialuronoglucosidasa es HAasa 2. En determinadas realizaciones ejemplares, la hialuronoglucosidasa es HA lisa EC 4.2.2.1.

En determinadas realizaciones ejemplares, la endoproteinasa es Asp-N.

En determinadas realizaciones ejemplares, el método comprende, además, el uso de un patrón interno. En determinadas realizaciones ejemplares, el patrón interno comprende uno o más isótopos pesados.

En determinadas realizaciones ejemplares, la cantidad de fármaco presente se determina utilizando una curva de calibración.

En determinadas realizaciones ejemplares, el xHA-L-P se pone en contacto con la hialuronoglucosidasa en un ciclador a presión. En determinadas realizaciones ejemplares, la presión en el ciclador de presión es mayor que la presión atmosférica. En determinadas realizaciones ejemplares, la presión es de aproximadamente 5 KPSI (0,05 bares), aproximadamente 10 KPSI (0,1 bares) o aproximadamente 15 KPSI (0,15 bares).

En determinadas realizaciones ejemplares, el oHA-L-P se pone en contacto con la segunda enzima en un ciclador a presión. En determinadas realizaciones ejemplares, la presión en el ciclador de presión es mayor que la presión atmosférica. En determinadas realizaciones ejemplares, la presión es de aproximadamente 35 KPSI (0,35 bares), aproximadamente 40 KPSI (0,40 bares) o aproximadamente 45 KPSI (0,45 bares).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las anteriores y otras características y ventajas de la presente invención se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones ejemplares tomadas junto con los dibujos adjuntos.

La **FIG. 1** representa un soporte polimérico y un enlazador auto-escindible que libera lentamente un fármaco peptídico activo (es decir, un agonista del receptor de GLP-1/GCC una vez al día, SAR425899) de una forma de profármaco inactiva *in vivo*.

La **FIG. 2** representa la complejidad y el tamaño de un agonista de GLP-1/GCG una vez a la semana (es decir, SAR425899) que está unido a un hidrogel de ácido hialurónico reticulado de alto peso molecular a través de enlazadores escindibles. D-serina es el aminoácido en la posición 2 de SAR425899 (HdSQGTFTSDLSKQK(γE-palmitato)ESKAAQ DFIEWLKAGGPSSGAPPPS-NH₂).

La **FIG. 3** representa esquemáticamente la digestión de SAR425899 con la endoproteinasa Asp-N para producir productos de digestión, incluyendo el péptido C-terminal utilizado para la cuantificación. D-serina es el aminoácido en la posición 2 de SAR425899 (HdSQGTFTSDLSKQK(γE-palmitato)ESKAAQDFIEWLKAGGPSSGAPPPS-NH₂). Las curvas de calibración se generan utilizando un péptido C-terminal sintético sin marcar correspondiente al producto de digestión proteolítica, y se emplea un péptido C-terminal marcado con isótopos pesados como patrón interno. 20 a 40 μg de péptido se digirieron con 1,20 a 0,4 μg de Asp-N (Sigma-Aldrich) (relación 1:100) en bicarbonato de amonio 100 mM a 37 °C durante la noche o utilizando un Bio ciclador a presión alternando entre la presión atmosférica y 40 KPSI (0,40 bares), tiempos de ciclo 1 min, 37 °C, durante 1 hora.

La **FIG. 4** muestra la digestión de xHA-L-P utilizando una hialuronoglucosidasa (hialuronidasa (HAasa)) seguida de digestión con AspN y posterior inactivación. La hidrólisis se realizó a 37 °C durante 24 horas para liberar cualquier péptido intacto unido. Se añadió un patrón interno (IS) antes del análisis LC/MS. AspN digirió SAR425899 completamente en tampón en presencia de productos de digestión de HA. La relación de péptido intacto liberado con respecto al péptido C-terminal fue de 0,0006.

La **FIG. 5** muestra que la digestión del profármaco SAR425899 con Asp-N produce un producto de digestión del péptido C-terminal detectable por cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS). El profármaco SAR425899 es xHA-enlazador-SAR425899; SAR425899 es HdSQGTFTSDLSKQK(E-palm)ESKAAQDFIEWLKAGGPSSGAPPPS-NH₂. El producto de digestión peptídica C-terminal de la digestión HA-enlazador-SAR425899 con Asp-N se pudo detectar mediante LC/MC, mostrando un rendimiento modesto.

La **FIG. 6** representa esquemáticamente la cuantificación de una escisión del profármaco SAR425899. El patrón interno (IS) del péptido marcado se refiere a un péptido C-terminal marcado con $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Lys. 200 μL de péptido enlazador de HA 1 mg/mL se digirieron con 30 μL 100 U/mL de hialuronato liasa EC 4.2.2.1 (Sigma-Aldrich) en bicarbonato de amonio 100 mM durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente se realizó la digestión con Asp-N.

Las **FIG. 7A - FIG. 7F** muestran que los productos de digestión de HA no produjeron efectos matriciales importantes. La **FIG. 7A** muestra HA digerida con HAasa 1, con un producto de digestión con Asp-N C-terminal añadido. La **FIG. 7B** muestra HA digerida con HAasa 2, con un producto de digestión con Asp-N C-terminal añadido. La **FIG. 7C** es un control que muestra SAR425899 intacto digerido con Asp-N en tampón. La **FIG. 7D** muestra HA digerida con HAasa 1, con el péptido SAR425899 intacto añadido. A continuación, se realizó la digestión con Asp-N. La **FIG. 7E** muestra HA digerida con HAasa 2, con el péptido SAR425899 intacto añadido. A continuación, se realizó la digestión con Asp-N. La **FIG. 7F** es un control que muestra SAR425899 intacto digerido con Asp-N en tampón. Se observó el mismo nivel de intensidad del péptido C-terminal para las dos digestiones de HAasa con péptido C-terminal y el control y para las dos digestiones de HAasa aumentaron con SAR425899 y el control digerido con Asp-N.

Las **FIG. 8A - FIG. 8B** muestran que HAasa 2 produjo una digestión posterior mejorada con Asp-N en comparación con HAasa 1. La **FIG. 8A** muestra HA-enlazador-SAR425899 digerido con HAasa 1, seguido de digestión con Asp-N. La **FIG. 8B** muestra HA-enlazador-SAR425899 digerido con HAasa 2, seguido de digestión con Asp-N. El producto de digestión con Asp-N C-terminal se muestra por los picos a 956,99 m/z.

Las **FIG. 9A - FIG. 9B** muestran la cuantificación de los productos de digestión. La **FIG. 9A** muestra que se observó una linealidad aceptable para la curva de péptido C-terminal estándar de 10 ng/mL a 10 $\mu\text{g/mL}$. La **FIG. 9B** muestra una fragmentación muy buena del péptido C-terminal derivado de la digestión con Asp-N, lo que lo hace adecuado para métodos de monitorización de reacción múltiple (MRM, por sus siglas en inglés).

La **FIG. 10** representa esquemáticamente la evaluación de la integridad de la digestión de HAasa/Asp-N. Se detecta el péptido C-terminal, lo que indica el rendimiento del proceso. Se detecta el péptido intacto, lo que indica la liberación del péptido mediante hidrólisis posterior. Sólo se detectó un 0,05 % de proteína intacta, lo que indica un proceso de digestión previsto cercano al 100 % completo.

Las **FIG. 11A - FIG. 11B** muestran ácido hialurónico reticulado (xHA) digerido con HAasa en matriz y xHA digerido con HAasa en tampón. La **Fig. 11A** representa los datos sin procesar. La **FIG. 11B** representa una representación gráfica de curvas en matriz y curvas en tampón. Se observó una excelente linealidad. Las pendientes de la curva se desviaron entre sí en un 3,1 %. Por lo tanto, el efecto de la matriz era insignificante y las curvas de tampón se podían aplicar para el análisis cuantitativo.

Las **FIG. 12A - FIG. 12B** representan que la intensidad estándar interna no mostró efecto de matriz. Se obtuvieron resultados uniformes en curvas tampón y curvas matriciales.

Las **FIG. 13A - 13B** muestran la cuantificación por triplicado del péptido enlazador de HA. Se observó una buena reproducibilidad (CV fue del 7,4 %). Con el factor de dilución aplicado, se encontró que el porcentaje de péptido total era del 18 %.

La **FIG. 14** representa la carga del péptido (P) para tres lotes de xHA-L-P, en donde P es SAR425899. Se observó una excelente linealidad sin efectos de matriz. Se observó una buena reproducibilidad de las réplicas de proceso completas. Estos resultados fueron coherentes con los resultados obtenidos por RMN ortogonal.

La **FIG. 15** representa resultados obtenidos utilizando condiciones de hidrólisis suaves, que dieron como resultado un aumento significativo en la velocidad de digestión enzimática. El enlazador-péptido previsto como control para la liberación hidrolítica del péptido mostró un alto nivel de impurezas de síntesis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se basa en el desarrollo de un método de cuantificación novedoso para determinar la cantidad de fármaco cargado en un polímero. De acuerdo con la presente invención, el método comprende escindir ácidos hialurónicos (HAs) presentes en una muestra de fármaco ácido hialurónico reticulado-enlazador-péptido (xHA-L-P) para formar una mezcla heterogénea de fármaco ácido hialurónico oligomérico-enlazador-péptido (oHA-L-P). A continuación, el oHA-L-P se digiere proteolíticamente para producir un producto de digestión peptídica homogéneo que se puede detectar y cuantificar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como, p. ej., cromatografía de líquidos, espectrometría de masas, absorbancia UV, ensayos basados en fluorescencia y similares. También se describen, pero no forman parte de la invención, composiciones que comprenden xHA-L-P (p. ej., el profármaco SAR425899) en las que "P" es el fármaco peptídico SAR425899, "L" es un reticulador auto-escindible y "xHA" es ácido hialurónico reticulado (**Fig. 2**).

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "profármaco" pretende referirse a un compuesto que se somete a biotransformación antes de exhibir sus efectos farmacológicos. Por lo tanto, los profármacos pueden considerarse restos biológicamente activos que contienen grupos protectores no tóxicos especializados utilizados de manera transitoria para alterar o para eliminar propiedades indeseables en la molécula precursora. Profármacos típicos pueden ser un profármaco unido al soporte que contiene un enlace temporal de una sustancia activa dada con un grupo de soporte transitorio que produce propiedades fisico-químicas o farmacocinéticas mejoradas y que se puede eliminar fácilmente *in vivo*, habitualmente mediante una escisión hidrolítica; un profármaco en cascada para el que la escisión del grupo de soporte se vuelve eficaz sólo después de desenmascarar un grupo activador.

Para potenciar las propiedades fisico-químicas o farmacocinéticas de un fármaco tal como SAR425899 *in vivo*, dicho fármaco puede conjugarse con un soporte (p. ej., xHA). Si el fármaco está unido transitoriamente a un soporte y/o un enlazador, dichos sistemas se asignan comúnmente como profármacos unidos al soporte. De acuerdo con las definiciones proporcionadas por la IUPAC, un profármaco enlazado al soporte es un profármaco que contiene un enlace temporal de una sustancia activa dada con un grupo de soporte transitorio que produce propiedades fisico-químicas o farmacocinéticas mejoradas y que se puede eliminar fácilmente *in vivo*, habitualmente mediante una escisión hidrolítica.

Los enlazadores empleados en profármacos unidos al soporte descritos en esta memoria pueden ser cualquier enlazador escindible conocido o enlazador no escindible, p. ej., enlazadores lábiles enzimáticos (p. ej., enlazadores escindibles por ácido, enlazadores reducibles (p. ej., enlazadores disulfuro), enlazadores β -glucurónido, y similares), enlazadores fotoescindibles, enlazadores tioéter, enlazadores maleimidocaproilo, enlazadores peptídicos (p. ej., enlazadores dipeptídicos), reticuladores y similares. Enlazadores adecuados están disponibles comercialmente de una diversidad de proveedores, tales como, p. ej., Sigma-Aldrich, Millipore Sigma, Creative Biolabs y similares.

Los enlazadores empleados en profármacos enlazados al soporte descritos en esta memoria pueden ser transitorios (p. ej., auto-escindibles), lo que significa que son no enzimáticamente, hidrolíticamente degradables (escindibles) en condiciones fisiológicas con semividas que varían de, por ejemplo, una hora a tres meses.

Tal como se utiliza en esta memoria, "condiciones fisiológicas" se refieren a la temperatura, pH y similares con respecto a un entorno particular del cuerpo en donde se pretende que se libere un fármaco. Por ejemplo, la liberación en plasma se produciría a un pH de entre 7,35 y 7,45 a una temperatura de aproximadamente 37 °C (p. ej., entre aproximadamente 36 °C y aproximadamente 38 °C), y la liberación en un lisosoma se produciría a un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 4,5 a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

Un fármaco (p. ej., un fármaco peptídico) puede enlazarse transitoriamente a un soporte de hidrogel a través de un enlazador auto-escindible, p. ej., un soporte de hidrogel xHA. Las expresiones "profármaco hidrogel" y "profármaco unido a hidrogel" se refieren a profármacos de agentes biológicamente activos enlazados transitoriamente a un hidrogel y se utilizan de manera sinónima.

El término "fármaco" y las expresiones "fármaco peptídico", "molécula biológicamente activa", "fracción biológicamente activa", "agente biológicamente activo" y similares, se refieren a cualquier sustancia que pueda afectar a cualesquiera propiedades físicas o bioquímicas de un organismo biológico, incluyendo, pero no limitados a virus, bacterias, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, tal como se utiliza en esta memoria, las moléculas biológicamente activas incluyen cualquier sustancia destinada al diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales, o para potenciar de otro modo el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. En determinadas realizaciones ejemplares, el término "fármaco" y las expresiones "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo", "agente biológicamente activo", "agente activo" y similares se refieren a un fármaco peptídico tal como, p. ej., SAR425899.

Una "forma libre" de un fármaco se refiere a un fármaco (p. ej., SAR425899) en su forma farmacológicamente activa no modificada, tal como después de ser liberado de un profármaco conjugado de hidrogel (p. ej., profármaco SAR425899).

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "agente terapéutico anticanceroso" o "agente anticanceroso" se refiere a una molécula que es perjudicial para el crecimiento y/o la proliferación de células neoplásicas o tumorales o cancerosas y puede actuar para reducir, inhibir o destruir la neoplasia maligna.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "citostático" se refiere a una molécula que inhibe el crecimiento y la multiplicación celular.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "nucleósido citotóxico" se refiere a una nucleobase o análogo de nucleósido que ejerce efectos citotóxicos imitando nucleósidos endógenos.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "agente de unión a tubulina" se refiere a una molécula que se asocia directamente con el sistema de tubulina.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "hormona" se refiere a cualquier miembro de una clase de moléculas de señalización que son producidas por glándulas en organismos multicelulares y que son transportadas por el sistema circulatorio para fijar como objetivo órganos distantes para regular la fisiología y/o el comportamiento. Un "antagonista hormonal" es un tipo específico de antagonista del receptor que actúa sobre los receptores hormonales.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "agente anti-angiogénesis" se refiere a una molécula que inhibe el proceso fisiológico de la angiogénesis, a través del cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "inhibidor enzimático" se refiere a una molécula que inhibe la función de una enzima particular.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "regulador génico" se refiere a una molécula que puede influir positiva o negativamente en la transcripción de un gen.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "agente citotóxico", se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. La expresión "agente citotóxico" pretende incluir agentes quimioterapéuticos, enzimas, antibióticos y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticáncer descritos más adelante. En algunos casos, el agente citotóxico es un taxoide, una vincas, un maitansinoide o análogo de maitansinoide tal como DM1 o DM4, un fármaco pequeño, un derivado de leptomicina, un análogo de auristatina o dolastatina, un profármaco, inhibidores de la topoisomerasa II, un agente alquilante del ADN, un agente anti-tubulina, un CC-1065 o análogo de CC-1065.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "soporte farmacéuticamente aceptable" se refiere a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de soportes, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, aminoácidos, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, fosfato tamponado, acetato, citrato, succinato; aminoácidos y derivados tales como histidina, arginina, glicina, prolina, glicina; sales inorgánicas NaCl, cloruro de calcio; azúcares o polialcoholes, tales como dextrosa, glicerol, etanol, sacarosa, trehalosa, manitol; tensioactivos, tales como polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 188; y similares, así como una combinación de los mismos. En muchos casos, será adecuado incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio en la composición, y la formulación también puede contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizante tal como Tween 20.

Tal como se utilizan en esta memoria, la expresión "ácido hialurónico" y los términos "HA" e "hialuronano" se utilizan indistintamente, y se refieren a un polisacárido lineal no sulfato compuesto por unidades disacáridas repetitivas de ácido d-glucurónico y N-acetil-d-glucosamina enlazados por enlaces glicosídicos β -1-3 y β -1-4 (p. ej., $\rightarrow 4$)- β -d-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 3)- β -d-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$). El HA se produce con diferentes pesos moleculares. El HA de alto peso molecular (HMWHA) es mayor que aproximadamente 1×10^6 Da y el HA de bajo peso molecular (LMWHA) es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 8×10^5 Da. El HA oligomérico es típicamente inferior a aproximadamente 6×10^3 Da.

HA está disponible comercialmente de proveedores tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Novozymes (Blair, NE) y Stanford Chemicals (Lake Forest, CA). El HA aprobado por la FDA incluye, pero no se limita a Hyalovet (Boehringer Ingelheim Vetmedica, aprobado para uso veterinario), Hylira (Hawthorn), Hylase (ECR), Hylartina V (Zoetis, aprobado para uso veterinario), Hyvisc (Anika Therapeutics, aprobado para uso veterinario), Legend (Bayer Animal Health, aprobado para uso veterinario), NexHA (Vetoquinol, aprobado para uso veterinario), Orthovisc (DePuy Mitek), ProVisc (Alcon), Shellgell (Cytosol Ophthalmics), Solesta (Salix), Supartz (Bioventus), Synacid (Intervet, aprobado para uso veterinario), Healon5 (Abbott Medical Optics), Healon GV (Abbott), Healon Endocoat (Abbott Medical Optics), Healon (Abbott), Euflexxa (Ferring Pharmaceuticals), Equiron (Zoetis, aprobado para uso veterinario), Coease (Abbott Medical Optics), Bionect (Cipher), Amvisc (Chiron), Synvisc (Genzyme), Gel-One (Zimmer Biomet) y Hyaglan (Fidia Pharma).

Para mejorar las propiedades mecánicas y prolongar la duración de HA *in vivo*, se puede formar un hidrogel reticulando covalentemente cadenas poliméricas de HA en una red tridimensional (véase, p. ej., Ågerup, Berg y Åkermarck (2005) BioDrugs 19:23; Edsman et al. (2011) Cartilage 2:384). Las propiedades mecánicas y físicas de los hidrogeles HA reticulados (xHA) dependen de los grados de modificación y reticulación (La Gatta, Schiraldi, Papa y De Rosa (2011) Polymer Degradation and Stability 96:603;).

Tal como se utilizan en esta memoria, la expresión "agente de reticulación" y el término "reticulador" pretenden cubrir un agente químico que podría reaccionar con ácido hialurónico a través de al menos uno de los enlaces covalentes y/o no covalentes. Ejemplos no limitantes de enlaces no covalentes incluyen enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals (atracciones de dispersión, interacciones dipolo-dipolo e interacciones inducidas por dipolo).

El término "reticulado", tal como se utiliza en esta memoria, pretende referirse a dos o más cadenas poliméricas de ácido hialurónico que se han unido de forma covalente y/o no covalente a través de un agente de reticulación. Una reticulación de este tipo se diferencia de la deshidratación intermolecular o intramolecular que da como resultado la formación de lactona, anhídrido o éster dentro de una única cadena polimérica o entre dos o más cadenas. Aunque, se contempla que la reticulación intramolecular también puede ocurrir en las composiciones como se describe en esta memoria. Los agentes reticulantes contienen al menos dos grupos funcionales que crean enlaces covalentes y/o no covalentes entre dos o más moléculas (es decir, cadenas de ácido hialurónico). Los agentes de reticulación pueden comprender grupos funcionales complementarios a los del ácido hialurónico de modo que pueda proceder la reticulación.

La reticulación física de HA se puede lograr utilizando una diversidad de pH, temperatura, condiciones de fuerza iónica e interacciones físico-químicas, por ejemplo, interacciones hidrófobas, unión de hidrógeno, interacción de carga o estereocomplejación. En particular, se han examinado ampliamente los hidrogeles que responden a la temperatura para diversas aplicaciones. Polímeros termogelizantes comunes que se utilizan con frecuencia para modificar el HA para preparar hidrogeles de HA térmicamente sensibles incluyen poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM), ácido plurónico, metilcelulosa y polietilenglicol (PEG).

Métodos de reticulación de HA para formar hidrogeles incluyen, pero no se limitan a métodos que modifican grupos -COOH, métodos que modifican grupos -OH, métodos que modifican grupos -NHCOCH₃ y métodos de reticulación química que utilizan reticulación de base de Schiff, ácido dialdehído hialurónico (CHO-HA), modificaciones de tiol, reacciones Diels-Alder y enlace mediado por enzimas.

Métodos de reticulación de hidrogeles de HA se describen en Kenne et al. (2013) Carb. Polymers 91:410; y Khunmanee, *Supra*; Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. Polymer 2008; 49(8): 1993-2007; Gupta D, Tator CH, Shoichet MS. Mezcla inyectable de gelificación rápida de hialuronano y metilcelulosa para la administración intratecal localizada a la médula espinal lesionada. Biomaterials 2006; 27(11): 2370-2379; Fang, J-Y, Chen, J-P, Leu, Y-L. Temperature-sensitive hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid as injectable carriers for drug delivery. Eur J Pharm Biopharm 2008; 68(3): 626-636; y Ha DI, Lee SB, Chong MS, et al. Preparation of thermo-responsive and injectable hydrogels based on hyaluronic acid and poly(N-isopropylacrylamide) and their drug release behaviors. Macromol. Res. 2006; 14(1): 87-93.

El HA reticulado está disponible comercialmente de proveedores tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y Stanford Chemicals (Lake Forest, CA).

Tal como se utiliza en esta memoria, se pretende que el término "hidrogel" se refiera a una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfifílica capaz de absorber grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas por homopolímeros o copolímeros, son insolubles debido a la presencia de reticulaciones químicas o físicas covalentes (interacciones iónicas, hidrófobas, enmarañamientos). Las reticulaciones proporcionan la estructura de la red y la integridad física. Los hidrogeles exhiben una compatibilidad termodinámica con el agua que les permite hincharse en medios acuosos. Las cadenas de la red están conectadas de tal manera que existen poros y que una fracción sustancial de estos poros tienen dimensiones comprendidas entre 1 nm y 1000 nm.

Los métodos descritos en esta memoria utilizan una o más hialuronoglucosidasas, p. ej., hialuronidasas (HAAsas) para escindir xHA, p. ej., para escindir xHA presente en xHA-L-P para formar oHA-L-P. En determinadas realizaciones ejemplares, se utiliza una combinación de dos, tres, cuatro, cinco o más HAAsas para escindir xHA. En otras realizaciones, se utiliza una única HAasa para escindir xHA.

Tal como se utiliza en esta memoria, "hialuronidasa" se refiere a una hialuronoglucosidasa que escinde los enlaces (1->4) (EC 3,2,1,35) o los enlaces (1->3) (EC 3,2,1,36) entre N-acetilglucosamina y glucuronato con el fin de catalizar la degradación de HA.

Existen tres clases generales de hialuronidasas: 1. Hialuronidasas de tipo mamífero, (EC 3,2,1,35) que son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas con tetrasacáridos y hexasacáridos como los principales productos finales. Tienen actividades tanto hidrolíticas como trans glucosidasa, y pueden degradar sulfatos de hialuronano y condroitina (CS), específicamente C4-S y C6-S; 2. Las hialuronidasas bacterianas (EC 4,2.99.1) degradan el hialuronano y, y en diferentes grados, CS y DS. Son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas que operan mediante una reacción de eliminación beta que produce principalmente productos finales de disacárido; y 3. Las hialuronidasas (EC 3,2,1,36) de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos son endo-beta-glucuronidasas que generan productos finales de tetrasacáridos y hexasacáridos a través de la hidrólisis del enlace beta 1-3.

Las hialuronidasas de mamífero se pueden dividir adicionalmente en dos grupos: enzimas activas neutras y enzimas activas ácidas. Existen seis genes similares a hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3 HYAL4, HYALP1 y PH20/SPAM1. HYALP1 es un pseudogen, y no se ha demostrado que HYAL3 posea actividad enzimática hacia sustrato conocido alguno. HYAL4 es una condroitinasa y carece de actividad hacia el hialuronano. HYAL1 (también conocido como LUCA1, MPS9 y NAT6) es la enzima ácido-activa prototípica y PH20 es la enzima neutra-activa prototípica. Las hialuronidasas activas ácidas, tales como HYAL1 y HYAL2, carecen de actividad catalítica a pH

neutro. Por ejemplo, HYAL1 no tiene actividad catalítica *in vitro* sobre el pH 4,5 (Frost et al. (1997) Anal. Biochemistry). HYAL2 es una enzima activa ácida con una actividad específica muy baja *in vitro*.

HYAL5 es una HAasa descubierta originalmente en ratones que se encuentra en el plasma y las membranas acrosómicas de espermatozoides inalterados en acrosoma que se libera durante la reacción acrosoma. HYAL6 es una HAasa que también se descubrió en ratones.

Las HAasas de grado químico están disponibles comercialmente de proveedores tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Millipore Sigma (Burlington, MA) y Calzyme Laboratories (San Luis Obispo, CA). Las HAasas aprobadas por la FDA incluyen, pero no se limitan a anfasa (hialuronidasa bovina; nueva solicitud de fármaco (NDA) N° 021665; Amphastar Pharmaceuticals), hidasa (hialuronidasa bovina; NDA N° 021716; Akorn Inc.), Hylenex (hialuronidasa humana recombinante; NDA N° 021859; Halozyme); Vitrase (hialuronidasa ovina; NDA N° 021640; Bausch and Lomb) y Wydase (hialuronidasa bovina; NDA N° 006343; Baxter Healthcare).

HAasas adecuadas adicionales para uso en esta memoria se describen en: worldwide web site: brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.35; Karl Meyer y Maurice M. Capítulo de informe sobre "Hyaluronidasas" Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology pp. 199-236 vol. 13 (doi.org/10.1002/9780470122587.ch6); Stern y Jedrzejewski Chem. Rev. 2006, 106, 818-839 Hyaluronidasas: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action; Stern y Jedrzejewski, Chem. Rev. 2008, 108, 5061-5085; Yoshida et al (2013) "KIAA1199, A deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 5612-5617; Nagaoka et al. 2015 Regulation of Hyaluronan (HA) Metabolism Mediated by HYBID, doi: 10.1074/jbc.M115.673566 publicado originalmente en línea el 30 de octubre de 2015; Yoshino et al. 2018 Biochemical and Biophysical Research Communications Volumen 505, Edición 1, 20 de octubre de 2018; Yamaguchi et al. 2019 (Matrix Biol. (2019) 78-79, 139-146 "TMEM2: A missing link in hyaluronan catabolism identified?"

"Hialuronidasa liasa", "hialuronato liasa", "HA liasa", "EC 4,2,2,1" o "HA liasa 4,2,2,1" se refieren a una hialuronoglucosidasa (es decir, una liasa de carbono-oxígeno bacteriana) que escinde las cadenas de hialuronano en un enlace beta-D-GalNAc-(1->4)-beta-D-GlcA, digiriendo en última instancia el polisacárido a 3-(4-deoxi-beta-D-gluc-4-enuronosil)-N-acetil-D-glucosamina. Las hialuronato liasas se pueden aislar de bacterias y *Streptomyces*, y difieren de las hialuronidasas de otras fuentes por su modo de acción, ya que catalizan una reacción de eliminación, en lugar de hidrólisis, del enlace beta 1,4-glicosídico entre los residuos de N-acetil-beta-D-glucosamina y ácido D-glucurónico.

El método de la invención utiliza una o más endoproteinasas seleccionadas del grupo que consiste en Glu-C, Asp-N, Lys-C, Arg-C, tripsina y quimotripsina para escindir un fármaco peptídico presente como un fármaco libre o un profármaco, p. ej., como SAR425899 libre o como profármaco SAR425899, con el fin de generar un producto de digestión peptídico del fármaco o profármaco. Los criterios utilizados para elegir una endoproteinasa adecuada fueron los siguientes: 1) generar el menor número posible de fragmentos altamente específicos; 2) generar un fragmento C-terminal que no contenga glutamato-palmitato enlazado a lisina; y 3) utilizar enzimas comunes disponibles comercialmente.

En determinadas realizaciones ejemplares, la endoproteinasa Asp-N se utiliza en los métodos descritos en esta memoria. Las endoproteinasas están disponibles comercialmente de compañías tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), New England Biolabs (Ipswich, MA), Thermo Scientific (Lenexa, KS) y Promega (Fitchburg, WI).

En determinadas realizaciones, se puede utilizar un ciclador de presión para mejorar (p. ej., disminuir) el tiempo de digestión de xHA y/u oHA. En determinadas realizaciones, la digestión de xHA y/u oHA se puede realizar en un ciclador de presión bajo presión de ciclo que varía entre aproximadamente 5 KPSI (0,05 bares) y aproximadamente 80 KPSI (0,80 bares), p. ej., a aproximadamente 5 KPSI (0,05 bares), aproximadamente 10 KPSI (0,10 bares), aproximadamente 15 KPSI (0,15 bares), aproximadamente 20 KPSI (0,20 bares), aproximadamente 25 KPSI (0,25 bares), aproximadamente 30 KPSI (0,30 bares), aproximadamente 35 KPSI (0,35 bares), aproximadamente 40 KPSI (0,40 bares), aproximadamente 45 KPSI (0,45 bares), aproximadamente 50 KPSI (0,50 bares), aproximadamente 55 KPSI (0,55 bares), aproximadamente 60 KPSI (0,60 bares), aproximadamente 65 KPSI (0,65 bares), aproximadamente 70 KPSI (0,70 bares), aproximadamente 75 KPSI (0,75 bares) o aproximadamente 80 KPSI (0,80 bares).

En determinadas realizaciones, se utiliza un ciclador de presión con una o más hialuronoglucosidasas (p. ej., HAasas) para digerir xHA a una presión inferior a aproximadamente 50 KPSI (0,50 bares), inferior a aproximadamente 40 KPSI (0,40 bares), inferior a aproximadamente 30 KPSI (0,30 bares) o inferior a aproximadamente 20 KPSI (0,20 bares). En determinadas realizaciones, se utiliza un ciclador de presión con una o más hialuronoglucosidasas (p. ej., HAasas) para digerir xHA a una presión de aproximadamente 5 KPSI (0,05 bares), aproximadamente 10 KPSI (0,10 bares) o aproximadamente 15 KPSI (0,15 bares). En determinadas realizaciones, se utiliza un ciclador de presión con una o más hialuronoglucosidasas (p. ej., HAasas) para digerir xHA a una presión de aproximadamente 10 KPSI (0,10 bares).

En determinadas realizaciones, se utiliza un ciclador de presión con una o más enzimas (p. ej., Glu-C, Asp-N, Lys-C, Arg-C, tripsina, o quimotripsina) para digerir el péptido a una presión inferior a aproximadamente 80 KPSI (0,80 bares), inferior a aproximadamente 70 KPSI (0,70 bares), inferior a aproximadamente 60 KPSI (0,60 bares) o inferior a

aproximadamente 500 KPSI (5 bares). En determinadas realizaciones, se utiliza un ciclador de presión con una o más enzimas (p. ej., Glu-C, Asp-N, Lys-C, Arg-C, tripsina, o quimotripsina) para digerir el péptido a una presión de aproximadamente 35 KPSI (0,35 bares), aproximadamente 40 KPSI (0,40 bares) o aproximadamente 45 KPSI (0,45 bares). En determinadas realizaciones, se utiliza un ciclador de presión con una o más enzimas (p. ej., Glu-C, Asp-N, Lys-C, Arg-C, tripsina, o quimotripsina) para digerir el péptido a una presión de aproximadamente 40 KPSI (0,40 bares).

En determinadas realizaciones, un ciclador de presión reduce el tiempo de digestión del péptido, xHA y/u oHA en al menos aproximadamente una hora, aproximadamente dos horas, aproximadamente tres horas, aproximadamente cuatro horas, aproximadamente cinco horas, aproximadamente seis horas, aproximadamente siete horas, aproximadamente ocho horas, aproximadamente nueve horas, aproximadamente diez horas, aproximadamente once horas, aproximadamente doce horas, aproximadamente trece horas, aproximadamente catorce horas, aproximadamente quince horas, aproximadamente dieciséis horas, aproximadamente diecisiete horas, aproximadamente dieciocho horas, aproximadamente diecinueve horas, aproximadamente veinte horas, aproximadamente veintiuna horas, aproximadamente veintidós horas, aproximadamente veintitrés horas, aproximadamente veinticuatro horas o más en comparación con la digestión en condiciones no presurizadas.

Tal como se utiliza en esta memoria, un "producto de digestión peptídica" se refiere a cualquier parte o porción de un fármaco peptídico (p. ej., un fármaco libre o un profármaco) que es generado por una enzima y es más pequeño que el fármaco peptídico intacto. En determinadas realizaciones ejemplares, un producto de digestión peptídica tiene menos de 50 aminoácidos de longitud, p. ej., entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 75 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 aminoácidos de longitud o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20 aminoácidos de longitud o cualquier valor o subintervalo dentro de estos intervalos. En determinadas realizaciones ejemplares, un producto de digestión peptídica es aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, aproximadamente 54, aproximadamente 55, aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58, aproximadamente 59, aproximadamente 60, aproximadamente 61, aproximadamente 62, aproximadamente 63, aproximadamente 64, aproximadamente 65, aproximadamente 66, aproximadamente 67, aproximadamente 68, aproximadamente 69, aproximadamente 70, aproximadamente 71, aproximadamente 72, aproximadamente 73, aproximadamente 74, aproximadamente 75, aproximadamente 76, aproximadamente 77, aproximadamente 78, aproximadamente 79, aproximadamente 80, aproximadamente 81, aproximadamente 82, aproximadamente 83, aproximadamente 84, aproximadamente 85, aproximadamente 86, aproximadamente 87, aproximadamente 88, aproximadamente 89, aproximadamente 90, aproximadamente 91, aproximadamente 92, aproximadamente 93, aproximadamente 94, aproximadamente 95, aproximadamente 96, aproximadamente 97, aproximadamente 98, aproximadamente 99 o aproximadamente 100 aminoácidos de longitud.

En realizaciones particulares, un producto de digestión peptídica es de aproximadamente 19 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones particulares, un producto de digestión peptídica es de aproximadamente 1, aproximadamente 2 o aproximadamente 3 aminoácidos de longitud. En aún otras realizaciones particulares, un producto de digestión peptídica es de una longitud de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 50 aminoácidos. En todavía otras realizaciones particulares, un producto de digestión peptídica es de una longitud de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20 aminoácidos.

En determinadas realizaciones ejemplares, un producto de digestión peptídica se detecta utilizando un método de identificación de péptidos, tal como cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de alto rendimiento (LC-HRMS), nano-LC-MS-MS, cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem de alto rendimiento MS (HPLC-MS-MS), nanoHPLC-MS-MS, tándem de ultra-rendimiento MS (UPLC-MS-MS), nanoUPLC-MS-MS, tándem de ultra-alto-rendimiento MS (UHPLC-MS-MS), nanoUHPLC-MS-MS, espectrometría ultravioleta (UV), espectrometría de fluorescencia o similares.

En ciertas realizaciones ejemplares, los métodos descritos aquí utilizan un procedimiento de separación tal como un método de cromatografía, por ejemplo cromatografía de líquidos. De acuerdo con una realización, la detección de productos de digestión peptídica se realiza mediante: (i) cromatografía de líquidos de alto rendimiento ("HPLC"), (ii) intercambio aniónico, (iii) cromatografía de intercambio aniónico; (iv) intercambio de cationes; (v) cromatografía de

intercambio catiónico; (vi) cromatografía de fase inversa de pares de iones; (vii) cromatografía; (viii) electroforesis unidimensional; (ix) electroforesis multidimensional; (x) exclusión por tamaño; (xi) afinidad; (xii) cromatografía de fase inversa; (xiii) cromatografía de electroforesis capilar ("CEC"); (xiv) electroforesis; (xv) separación por movilidad iónica; (xvi) separación o espectrometría de movilidad iónica asimétrica de campo ("FAIMS"); (xvii) electroforesis capilar; y (xviii) cromatografía de fluidos supercríticos.

La cantidad de productos de digestión peptídica se puede determinar mediante la medición de transiciones de monitorización de reacción múltiple (MRM) que consisten en el ion precursor del péptido, uno o más iones de fragmento y un tiempo de retención. Esta medición se lleva a cabo, por ejemplo, en un instrumento de triple cuadrupolo. La firma también se puede obtener mediante una combinación de tiempo de retención y análisis espectrométrico de masas de alta resolución preciso del péptido intacto. Estos métodos de cuantificación normalmente requieren un patrón interno marcado y una curva de calibración de péptidos sintéticos externos.

En determinadas realizaciones ejemplares, se utilizan patrones internos que incluyen un péptido marcado correspondiente a un fármaco peptídico, p. ej., un péptido C-terminal marcado correspondiente al producto de digestión con Asp-N C-terminal de SAR425899. Los patrones internos tienen típicamente una secuencia peptídica conocida y se proporcionan en una cantidad conocida. En algunas realizaciones, los patrones están marcados, tal como con uno o más isótopos pesados, p. ej., ^{13}C o ^{15}N .

Los métodos de perfilado de productos de digestión peptídica descritos en esta memoria son útiles para medir la cantidad de fármaco presente en una formulación de profármaco de hidrogel. Los métodos descritos en esta memoria también son útiles para realizar evaluaciones de reproducibilidad de lote a lote.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "muestra" se refiere a cualquier composición que contiene un fármaco peptídico (p. ej., en una forma de profármaco). Muestras ejemplares incluyen, pero no se limitan a composiciones farmacéuticas, medios de disolución o liberación y similares. En determinadas realizaciones, una muestra es un hidrogel. En otras realizaciones, una muestra es acuosa.

Una muestra para uso en los métodos de cuantificación descritos en esta memoria puede ser una composición terapéutica, tal como una formulación líquida para administración oral, sublingual, mucosal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, parenteral, o por inhalación.

En otras realizaciones, la muestra incluirá un sustrato, tal como una nanopartícula, una cápsula, una película o un comprimido, o un gel, tal como un hidrogel (p. ej., un hidrogel de xHA). Los métodos de cuantificación descritos en esta memoria son útiles para cuantificar la cantidad de fármaco peptídico en el sustrato, tal como, p. ej., en una nanopartícula o cápsula, o en una película o un hidrogel (por ejemplo, un hidrogel de xHA). La liberación puede ser desde el interior del sustrato, p. ej., una partícula, o desde el exterior (p. ej., una superficie) de un sustrato. En una realización, un perfil de liberación se evalúa llevando a cabo una liberación completa del fármaco peptídico y después evaluando la liberación controlada, tal como durante un período de tiempo o en diferentes condiciones de cultivo o solución (p. ej., a diferentes temperaturas, pH, o similares). La cantidad de fármaco peptídico liberado en el ensayo de liberación controlada se reseña típicamente como una fracción o un porcentaje en comparación con la cantidad de fármaco peptídico liberado en las condiciones de liberación completa.

Como se usa aquí, "medio de disolución", "medios de disolución", "medio de liberación" y "medios de liberación" se refieren a una composición que se usa para proporcionar *in vitro* información de liberación de fármacos. Los medios de disolución o liberación son útiles, por ejemplo, para los ensayos de control de calidad de una muestra para determinar la liberación y/o la estabilidad del fármaco peptídico en una muestra. Al escoger un medio de disolución o liberación adecuado, es útil determinar el perfil diana analítico del fármaco peptídico (p. ej., liberación retardada, liberación constante, liberación prolongada, y similares) y/o el perfil de solubilidad del fármaco peptídico. Para una revisión de la selección de medios de disolución, véase Martin y Gray (Verano 2011) Journal of Validation Technology.

Tal como se utiliza en esta memoria, "velocidad de liberación" se refiere a la velocidad a la que un fármaco peptídico fluye desde una formulación de profármaco de hidrogel y hacia un medio circundante en un ensayo de liberación *in vitro*. En una realización ejemplar, la composición se prepara primero para el ensayo de liberación suspendiendo la composición en el medio de liberación *in vitro* apropiado. Esto se lleva a cabo generalmente intercambiando el tampón después de la centrifugación para peletizar el sustrato (p. ej., un hidrogel), y reconstituyendo el sustrato utilizando condiciones suaves. En determinadas realizaciones, el ensayo se inicia colocando la muestra a 37 °C en un aparato de temperatura controlada apropiado. Típicamente, se retira una muestra en diversos momentos.

Habiendo descrito ahora determinadas realizaciones en detalle, las mismas se entenderán más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente con fines ilustrativos.

EJEMPLO I Cuantificación del Fármaco Peptídico Presente en la Formulación de Profármaco

SAR425899 es un agonista del receptor dual que fija como objetivo los receptores de glucagón y GLP1. Debido al aclaramiento rápido, se requiere una dosis una vez al día. Para reducir la frecuencia de dosificación, el candidato al

fármaco peptídico SAR425899 una vez al día (**Fig. 1**) se unió a un soporte polimérico (ácido hialurónico reticulado (xHA)) a través de un enlazador auto-escindible para proporcionar una liberación lenta de un fármaco peptídico activo del profármaco inactivo (**Fig. 2**). El profármaco SAR425899 comprende ácido hialurónico reticulado (xHA) unido al lipopéptido SAR425899 (P) a través de un enlazador auto-escindible (L).

Se requiere la determinación de la carga peptídica de un hidrogel para la dosificación y el control de calidad. El ácido hialurónico reticulado forma un hidrogel de múltiples millones de Dalton en un entorno acuoso. Mediciones UV simples que típicamente se aplican para la cuantificación básica de péptidos en solución no se pueden aplicar para hidrogeles, ya que este análisis requiere que el hidrogel-enlazador-péptido esté completamente disuelto. Si bien el enlazador es auto-escindible, la escisión completa en condiciones fisiológicas es por diseño muy lenta y, por lo tanto, no adecuada para métodos de cuantificación analítica que requieren certeza de que se ha logrado una liberación completa.

Para abordar este desafío analítico y permitir la determinación de la carga peptídica, se desarrolló un método novedoso que permite la cuantificación precisa de la carga de fármaco peptídico en un profármaco biopolimérico, medida como porcentaje en peso/peso. El fármaco biopolímero-enlazador-péptido puede, en principio, aplicarse a cualquier fármaco de molécula pequeña (p. ej., polipéptido, polinucleótido o similar) que pueda escindirse o hidrolizarse, y el método puede aplicarse ampliamente para la determinación de la carga de fármacos de profármacos que contienen biopolímeros.

El método se basa en una doble digestión enzimática seguida de la cuantificación de un producto de digestión que representa el péptido. Inicialmente, el ácido hialurónico reticulado-enlazador-péptido (xHA-L-P) se digiere con una enzima que digiere el ácido hialurónico reticulado. Posteriormente, se aplica una enzima proteolítica para digerir el péptido fijado y producir productos de digestión proteolítica. Estos productos de digestión proteolítica, que representan el péptido, se cuantifican posteriormente.

xHA-L-P se pesa y se disuelve parcialmente en forma de hidrogel en tampón. El hidrogel se degrada enzimáticamente en una pluralidad de ácido hialurónico oligomérico-enlazador-péptidos (oHA-L-P) que son solubles. Los oligómeros de ácido hialurónico resultantes de oHA-L-P es una mezcla heterogénea, que consiste en péptido, enlazador y oligómeros de ácido hialurónico de diferentes longitudes. La heterogeneidad del ácido hialurónico oligomérico es indeseable para la cuantificación, y por esta razón se introduce una segunda etapa de digestión enzimática (p. ej., proteolítica), en que el resto del fármaco peptídico se digiere para producir un producto homogéneo de digestión del péptido C-terminal de 19 aminoácidos DFIE.....PPPS-NH₂ (**Fig. 3**). Este péptido C-terminal se detecta y cuantifica utilizando LC / HRMS.

La digestión del profármaco usando Asp-N sin tratamiento previo con hialuronoglucosidasa produjo un bajo rendimiento del péptido C-terminal, presumiblemente debido al obstáculo estérico de la actividad de Asp-N por el ácido hialurónico reticulado (**Fig. 5**). Se determinó que la hidrólisis del enlazador era poco práctica como método de liberación de péptidos para la cuantificación.

Se desarrolló un método de digestión de HA. (**Fig. 6.**) Se utilizaron condiciones de digestión que eran adecuadas para la digestión posterior de endoproteinasa (p. ej., Asp-N). Se analizaron varias enzimas (p. ej., HAasas) capaces de digerir HA.

La digestión del ácido hialurónico reticulado no interfirió con la digestión con Asp-N de SAR425899 libre (**Fig. 7A - Fig. 7F**), y se demostró que aumentaba significativamente el rendimiento posterior del producto de digestión peptídica C-terminal de la digestión con Asp-N (**Fig. 8A - Fig. 8B**). De hecho, se determinó que la enzima proteolítica Asp-N proporcionó una eficiencia de digestión cercana al 100 % para el péptido SAR425899.

Se demostró que Asp-N digiere SAR 425899 completamente en tampón y en presencia de productos de digestión de HA (**Fig. 4**). La digestión se realizó por triplicado para HA-enlazador-péptido por parte de HAasa, seguido de digestión con Asp-N e inactivación. La hidrólisis posterior se realizó a 37 °C durante 24 horas para liberar cualquier péptido intacto unido, y se añadió un patrón interno (IS) antes del análisis LC/MS. La relación de péptido intacto liberado con respecto al péptido C-terminal fue de 0,0006.

Se realizó una doble digestión por triplicado en HA-enlazador-péptido con HAasa durante 2 × 24 horas, seguida de digestión con Asp-N e inactivación. La hidrólisis posterior a 37 °C se realizó durante 24 horas para liberar cualquier péptido intacto unido, y se añadió un IS antes del análisis LC/MS. No se observó péptido intacto.

La digestión se realizó por triplicado en HA-enlazador-péptido con HAasa durante 14 días, seguido de la digestión con Asp-N. No se observó aumento en el péptido C-terminal en comparación con la digestión durante 1 día, pero se observó que el isómero del péptido C-terminal eluía ligeramente antes que el péptido C-terminal regular.

La LC/MS de los productos de reacción se realizó de la siguiente manera. La muestra y los patrones se prepararon en acetonitrilo (ACN) al 25 %, ácido fórmico (FA) al 0,1 % para prevenir problemas de adsorción observados. La separación se realizó en un sistema Accela 1250 LC equipado con una columna Luna Omega C18 100 × 2,1 mm, 100 A (parte nº OOD-4742-AN) (S/N H16-168886) hecho funcionar a 50 °C.

Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % aq. Mo; Fase móvil B: ACN ácido fórmico al 0,1 %; el caudal fue de 400 µL/min. Gradiente del 5 % al 50 % de B en 7 min. 99 % de B se mantiene durante 30 s. equilibrar al 5 % de B durante 2,5 min. También se había empleado un gradiente que se iniciaba al 20 % de B y era factible.

- 5 El material eluido se introdujo en una Orbitrap ELITE utilizando una fuente HESI ESlestandar hecha funcionar en modo de iones positivos. Se aplicó la resolución Orbitrap de 60000 a m/z 400, intervalo m/z 350-1500.

Se determinó que todo el péptido se convirtió en productos de digestión sin que quedara péptido intacto alguno.

- 10 **Tabla 1.** xHA digerido con HAasa-1, péptido C-terminal (correspondiente al producto de digestión con Asp-N) añadido, análisis por LC/MS (exp. nº (#) 1); xHA digerido con HAasa-1, péptido de longitud completa añadido, digestión con Asp-N, análisis por LC/MS (exp. nº 2); xHA digerido con HAasa-2, péptido C-terminal correspondiente a la digestión con Asp-N añadido, análisis por LC/MS (exp. nº 3); xHA digerido con HAasa-2, péptido de longitud completa añadido, digestión con Asp-N, análisis mediante LC/MS (exp. nº 4); control - péptido de longitud completa añadido, digestión con Asp-N, análisis mediante LC/MS (exp nº 5); xHA-enlazador-péptido digerido con HAasa-1, luego digerido con Asp-N, análisis mediante LC/MS (exp nº 6); xHA-enlazador-péptido digerido con HAasa-2, luego digerido con Asp-N, análisis mediante LC/MS (exp nº 7).

Exp	Material de partida	Digestión con HA		Dig con ASPN	análisis
Nº 1	HA reticulado	HAasa enz 1	añadir péptido C-terminal		LC/MS
Nº 2			añadir péptido	Y	LC/MS
Nº 3	HA reticulado	HAasa enz 2	añadir péptido C-terminal		LC/MS
Nº 4			añadir péptido	Y	LC/MS
Nº 5			péptido	Y	LC/MS
Nº 6	HA-enlazador péptido	HAasa enz 1		Y	LC/MS
Nº 7	HA-enlazador péptido	HAasa enz 2		Y	LC/MS

- 20 Se demostró de varias maneras un alto rendimiento del péptido C-terminal después de la doble digestión secuencial. (Fig. 10.) Se dejó proceder a la doble digestión, seguida de la inactivación de todas las actividades enzimáticas mediante ebullición. Posteriormente, se realizó la liberación de cualquier péptido intacto que pudiera permanecer fijado a través de un enlazador al ácido hialurónico permitiendo que la hidrólisis procediera a 37 °C. No se observaron cantidades o sólo cantidades muy pequeñas de péptido intacto, lo que indica que la doble digestión dio como resultado una digestión casi completa de todas las moléculas de fármaco peptídico. En un experimento separado, la liberación por hidrólisis durante 2 semanas seguida de digestión con Asp-N no produjo una mayor cantidad de péptido C-terminal que el procedimiento de doble digestión. Como parte de la calificación del método, se demostró analíticamente que el lote de xHA-L-P obtenido tenía una carga peptídica del 18 %, consistente con los resultados obtenidos para varios lotes que mostraban una carga de alrededor del 20 % (sin pretender estar ligado por la teoría científica, la cantidad inferior del 20 % se atribuyó a la captación de agua del material liofilizado). Cuando el hidrogel liofilizado absorbe agua, la cantidad resultante ponderada contiene un porcentaje inferior de péptido debido a la adición de agua. Esto puede llevar el porcentaje de péptido del 20 % al 18 %. El remedio es tener cuidado de que el material ponderado no esté expuesto a condiciones de aire húmedo.
- 35 El HA reticulado que no contenía péptido se digirió y se utilizó como una matriz. El producto de digestión (matriz) se enriqueció con péptido C-terminal sintético no marcado correspondiente al producto de digestión del péptido Asp-N C-terminal de SAR 425899, y se generó una serie de dilución. Se empleó un péptido C-terminal marcado con isótopos pesados como patrón interno. La curva se comparó con la curva equivalente preparada en un 25 % de ACN y tampón de ácido fórmico al 0,1 %.

- 40 Las curvas se analizaron mediante análisis LC/MS para determinar si las pendientes estaban dentro del 15 % entre sí, que es el criterio mínimo para aceptar la curva de calibración de tampón.

- 45 La cuantificación de péptidos utilizando los métodos descritos en esta memoria fue reproducible. Se ponderaron tres partes alícuotas del HA-enlazador-péptido y se digirieron con HAasa y Asp-N. Los productos de digestión se ajustaron al 25 % de ACN y después se diluyeron 100 veces más, seguido de una dilución adicional de 2 veces mediante la adición de patrón interno pesado (HIS, por sus siglas en inglés). Se preparó una curva estándar de 10 puntos de 10 µg/mL a 20 ng/mL con etapas de dilución doble. La curva se diluyó adicionalmente 2 veces mediante la adición 1:1 vol:vol de H-IS.

50

El método toleró firmemente la matriz. (**Fig. 7A - Fig. 7F.**) Las curvas de calibración de péptido C-terminal en tampón mostraron la misma pendiente que las curvas de calibración en la matriz extraída generadas por digestión de ácido hialurónico reticulado (xHA). (**Figs. 9A, 9B, 11A, 11B, 12A, 12B, 13A y 13B.**) También se determinó que la matriz generada por la digestión de xHA no interfirió con la eficiencia de la digestión con Asp-N.

Se testaron varias hialuronidasas comerciales y se determinó que HAasa 2 era superior. Además, se demostró que el péptido C-terminal produjo una serie de fragmentos casi completa cuando se sometió a fragmentación inducida por colisión en fase gaseosa (CID, por sus siglas en inglés), y que estos fragmentos mostraron intensidades que son adecuadas para el desarrollo de un método de cuantificación de monitorización de reacción múltiple MRM (LC/MS MRM) como una alternativa al método basado en espectrometría de masas de alta resolución aplicado en el trabajo inicial (cuantificación por LC/HRMS).

Un requisito previo para la detección de UV o fluorescencia es que el analito sea soluble. xHA-L-P no es soluble. oHA-L-P, por otro lado, es hidrosoluble y, por lo tanto, accesible para el análisis UV o de fluorescencia. Sin embargo, la digestión requerida para producir oHA-L-P a partir de xHA-L-P introduce una hialuronoglucosidasa, p. ej., una hialuronidasa o HA liasa, en la mezcla. La hialuronoglucosidasa, p. ej., hialuronidasa o HA liasa, es una proteína que absorbe el UV. Por consiguiente, la hialuronoglucosidasa se eliminará después de la primera etapa de digestión seguida de una detección UV directa. Este método sería incluso más adecuado para un entorno de desarrollo / fabricación analítico regulado.

Se determinó la carga peptídica de tres lotes separados de xHA-L-P, en donde P es SAR425899 (**Fig. 14**). Se obtuvo una linealidad excelente sin efectos de matriz. Se logró una buena reproducibilidad de las réplicas de proceso completas y los resultados fueron coherentes con los resultados obtenidos utilizando la RMN ortogonal. Los métodos descritos en esta memoria son ampliamente aplicables y se están aplicando para ayudar a la optimización de la formulación. Los métodos descritos en esta memoria son susceptibles a escenarios de enlazadores tanto escindibles como no escindibles utilizando una amplia gama de polímeros y fármacos peptídicos.

Sumario

Se desarrolló un método LC/MS para el análisis de HA-Enlazador-SAR425899, SAR425899 y fragmentos / productos de digestión. Se demostró la escisión completa de SAR425899 con Asp-N para liberar el fragmento peptídico C-terminal para la cuantificación. Se demostró la escisión inicial por Asp-N de HA-Enlazador-SAR425899, pero la digestión probablemente fue incompleta basándose en una respuesta modesta de LC/MS.

Se testaron varias HAasas, y la HA liasa (Sigma-Aldrich) EC 4.2.2.1 demostró un aumento significativo de los rendimientos del producto de digestión con Asp-N. Se introdujeron péptidos C-terminales marcados con isótopos y se demostró el intervalo de linealidad después de que se resolviera el problema de adhesión. Se llevaron a cabo experimentos que evaluaron la eficiencia de la digestión. El examen de la curva de matriz no mostró efecto de matriz alguno y una buena alineación de la curva de matriz frente a la curva de tampón con solo un 3 % de diferencia en la pendiente. El pesaje, procesamiento y análisis por triplicado mostraron una buena reproducibilidad con un CV al 7,5 %.

Se descubrió que el péptido porcentual total en un lote de muestra era del 18 % (el contenido de agua de la muestra se desconocía en particular después de múltiples ciclos de congelación-descongelación (temperatura ambiente)).

EJEMPLO II Ciclador de Presión para la Cuantificación del Fármaco Peptídico Presente en la Formulación de Profármaco

La cantidad de fármaco cargada en el profármaco SAR425899 se determinó utilizando un nuevo proceso de ciclado de presión mediante hidratación y desnaturalización del profármaco. Las reacciones de digestión testaron la digestión de SAR425899 con AspN (se logró una reacción del 100 % en una hora). Se identificaron condiciones que permitían reducir el tiempo de digestión de xHA de 24 horas a 2 horas utilizando un cicladore a presión.

La HAasa parecía ser sensible a una presión muy alta. Por consiguiente, se aplicó una presión máxima de 10 KPSI (0,1 bares) y se utilizó una concentración enzimática más alta. En condiciones optimizadas, se observó una mayor concentración del producto de oHA-L-P para la digestión asistida por cicladore de presión de 2 horas.

16 muestras se ensayaron simultáneamente (50-150 µL/muestra). Se controló la tasa de aumento/disminución de la presión. Se observó la forma del perfil de presión (seno / onda cuadrada, etc.). Las temperaturas de la muestra se controlaron utilizando un calentador eléctrico incorporado. La presión máxima utilizada fue de 40 KPSI (0,4 bares). Un ensayo típico pasó de la presión atmosférica a 10-40 KPSI (0,1-0,4 bares) aplicado con un ciclo de 1 Hz, durante una duración de una hora de tiempo.

Se determinó que la digestión con AspN de oHA-L-P bajo un ciclo de presión de 40 KPSI (0,4 bares) de una vez por minuto a 37 °C era tan eficaz como una digestión con AspN de 12 horas de oHA-L-P a 37 °C a presión atmosférica.

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando un Barocicler de Pressure Biosciences (Modelo 2320EXT, South Easton, MA).

- 5 Se determinó que la digestión con AspN utilizando un ciclo entre la presión de 40 KPSI (0,4 bares) y la presión atmosférica con intervalos de 1 minuto durante 1 hora a 37 °C proporcionó la misma eficiencia de digestión que 12 horas a 37 °C bajo presión atmosférica. Del mismo modo, la HAasa (E.C. 4,2.2,1) se digirió utilizando un ciclo entre una presión de 10 KPSI (0,1 bares) con un tiempo de ciclo de 1 minuto durante 2 horas produjo los resultados, basándose en los oligómeros observados, que la digestión de 24 horas a 37 °C bajo presión atmosférica.
- 10 En general, cada una de las nuevas enzimas se optimiza en términos de temperatura y presión, perfil de presión, frecuencia y duración de la presión aplicada.
- 15 Se analizaron la pureza de la muestra y la determinación de las impurezas principales (**Fig. 15**). Se determinó la liberación del péptido intacto en condiciones de hidrólisis suave (4 °C, 14 días o 37 °C, 24 horas). Ambos métodos de liberación produjeron material suficiente para el análisis de impurezas mediante LC/MS, hasta un 0,01 % o menos. Se demostró que la liberación no produce impurezas.
- 20 Se analizó un control de enlazador-péptido a t=0 y en el tiempo de liberación completo. Se observó un nivel elevado de impurezas para el enlazador-péptido a t=0. Los análisis de impurezas se realizaron mediante el ensayo de LC/MS de péptidos liberados.

Conclusiones Generales

- 25 La calificación del método LC/MS se completó e implementó con éxito. Se demostraron las condiciones de digestión para producir una digestión completa de AspN. Se demostró que la matriz no era un problema. Se demostró una buena reproducibilidad y linealidad del método.
- 30 Los resultados obtenidos mediante LC/MS fueron coherentes con los resultados obtenidos mediante un método de RMN ortogonal. Un método que utiliza un cicladore de presión de segunda generación redujo significativamente el tiempo total de análisis. El método se aplica tanto como método de referencia como para ayudar a los estudios de optimización de la formulación. Se ha establecido un método para la liberación y el análisis de impurezas, p. ej., se han establecido condiciones de liberación y se han detectado e identificado impurezas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la cantidad de fármaco presente en una formulación de profármaco ácido hialurónico reticulado-enlazador-péptido (xHA-L-P) que comprende:

poner en contacto una muestra de la formulación del profármaco xHA-L-P con una hialuronoglucosidasa para generar un fármaco de ácido hialurónico oligomérico-enlazador-péptido (oHA-L-P);
poner en contacto el oHA-L-P con una endoproteinasa para generar productos de digestión peptídica del fármaco; y
detectar los productos de digestión peptídica para determinar la cantidad del fármaco presente en la formulación del profármaco de xHA-L-P,
en el que la endoproteinasa se selecciona del grupo que consiste en Glu-C, Asp-N, Lys-C, Arg-C, tripsina y quimotripsina.

2. El método de la reivindicación 1,

a) en donde los productos de digestión peptídica tienen entre aproximadamente 2 aminoácidos y aproximadamente 100 aminoácidos de longitud;
b) en donde los productos de digestión peptídica tienen entre aproximadamente 3 aminoácidos y aproximadamente 75 aminoácidos de longitud;
c) en donde los productos de digestión peptídica tienen entre aproximadamente 4 aminoácidos y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud;
d) en donde los productos de digestión peptídica tienen entre aproximadamente 6 aminoácidos y aproximadamente 30 aminoácidos de longitud;
e) en donde los productos de digestión peptídica tienen entre aproximadamente 15 aminoácidos y aproximadamente 20 aminoácidos de longitud;
o
f) en donde los productos de digestión peptídica tienen aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 19 aminoácidos o cualquier combinación de estos de longitud.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de detectar los productos de digestión peptídica se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en una o una combinación de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS), absorbancia ultravioleta (UV) y detección de fluorescencia.

4. El método de la reivindicación 1, en el que la hialuronoglucosidasa es una hialuronidasa (HAasa) o hialuronato (HA) liasa EC 4,2.2,1.

5. El método de la reivindicación 4,

a) en el que la HAasa se selecciona del grupo que consiste en HAasa 1, HAasa 2, HAasa 3, HAasa 4, HAasa 5 y HAasa 6;
b) en el que la HAasa es HAasa 1 o HAasa 2;
o
c) en el que la HAasa es HAasa 2.

6. El método de la reivindicación 1, en el que la endoproteinasa es Asp-N.

7. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, el uso de un patrón interno.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el patrón interno comprende uno o más isótopos pesados.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de fármaco presente se determina utilizando una curva de calibración.

10. El método de la reivindicación 1, en el que el xHA-L-P se pone en contacto con la hialuronoglucosidasa en un ciclador a presión.

11. El método de la reivindicación 10, en el que la presión en el ciclador de presión es mayor que la presión atmosférica.

12. El método de la reivindicación 11, en el que la presión es de aproximadamente 5 KPSI (0,05 bares), aproximadamente 10 KPSI (0,10 bares) o aproximadamente 15 KPSI (0,15 bares).

13. El método de la reivindicación 1, en el que el oHA-L-P está en contacto con la segunda enzima en un ciclador a presión.

14. El método de la reivindicación 13, en el que la presión en el ciclador de presión es mayor que la presión atmosférica.
15. El método de la reivindicación 14, en el que la presión es de aproximadamente 35 KPSI (0,35 bares),
5 aproximadamente 40 KPSI (0,40 bares) o aproximadamente 45 KPSI (0,45 bares).

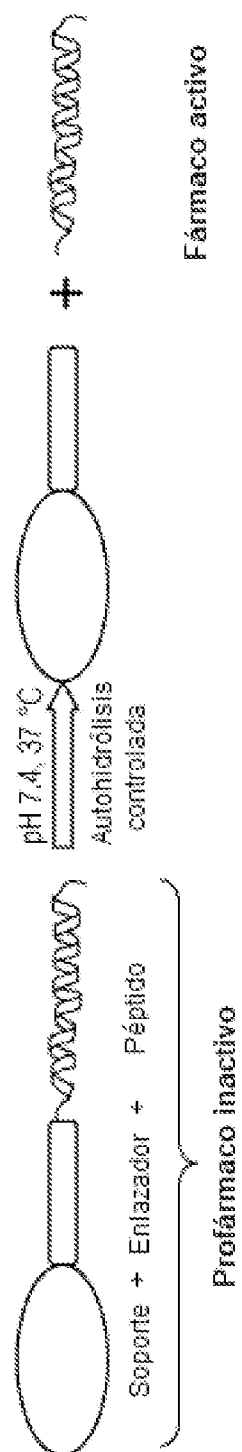


Fig. 1

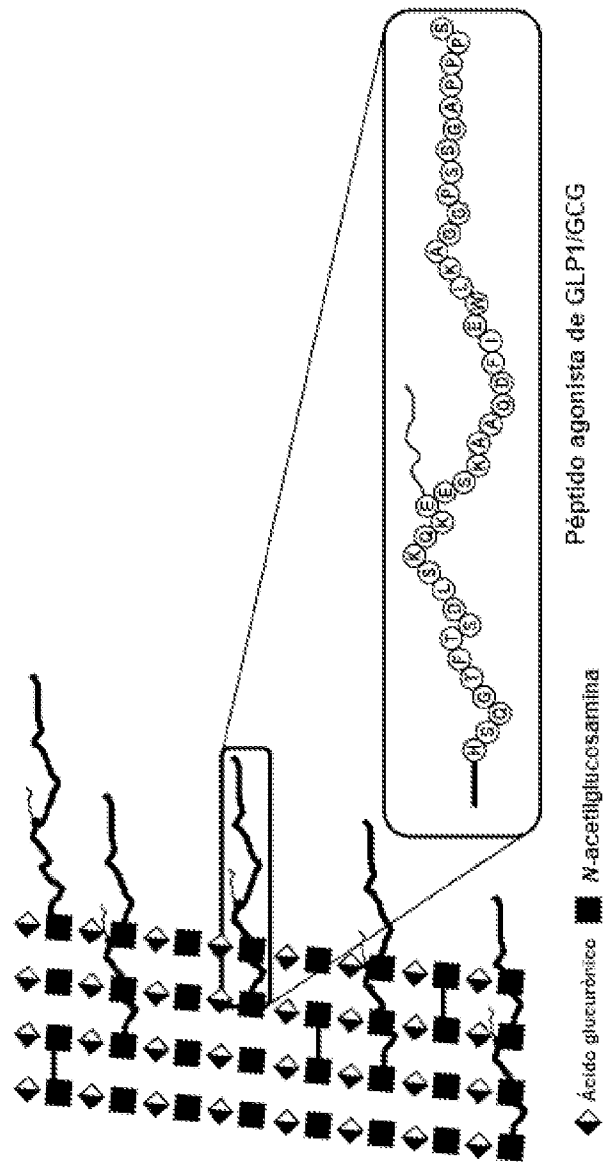


Fig. 2



Fig. 3

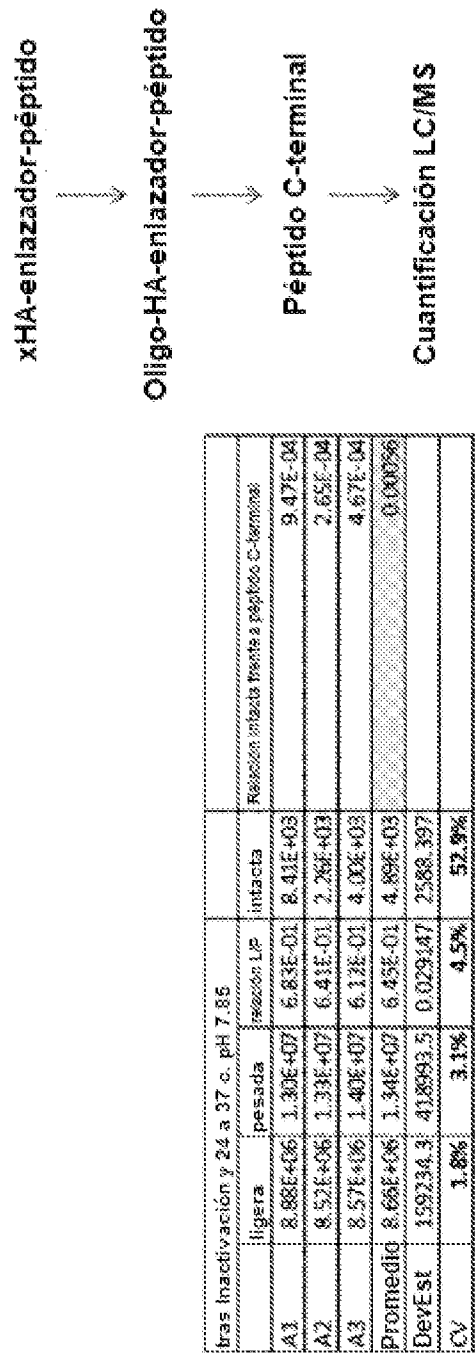


Fig. 4

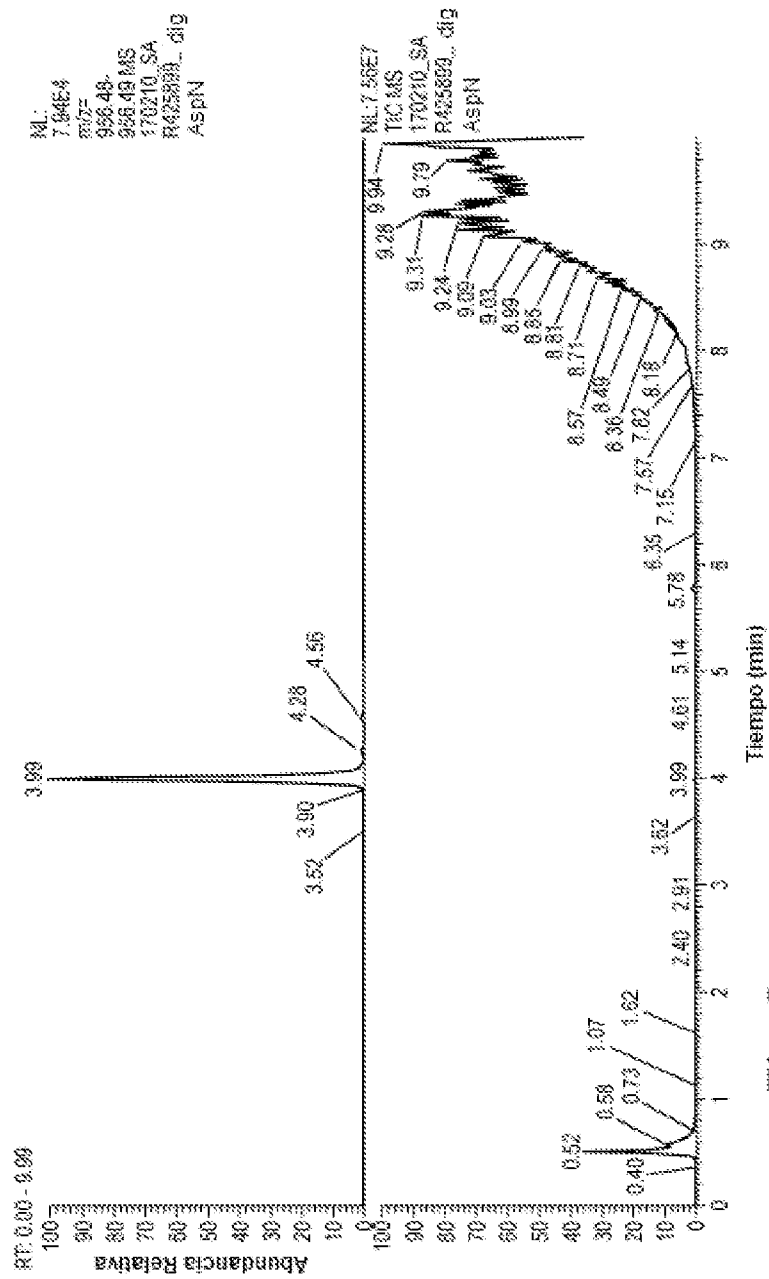


Fig. 5

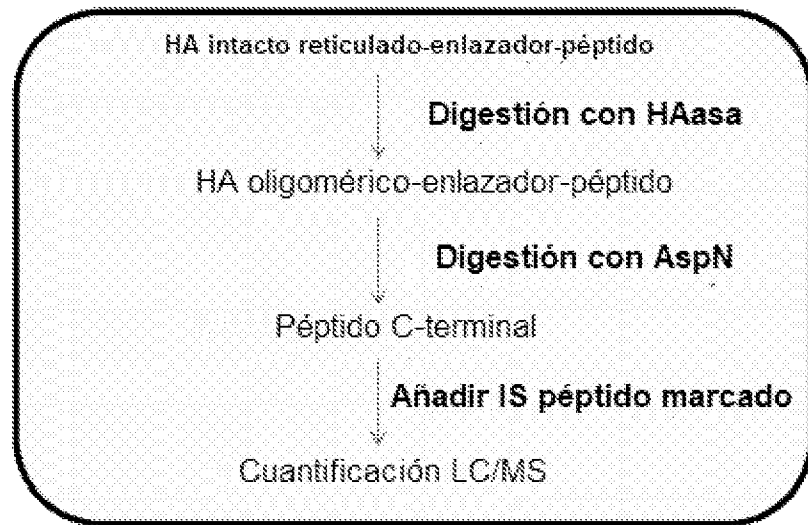
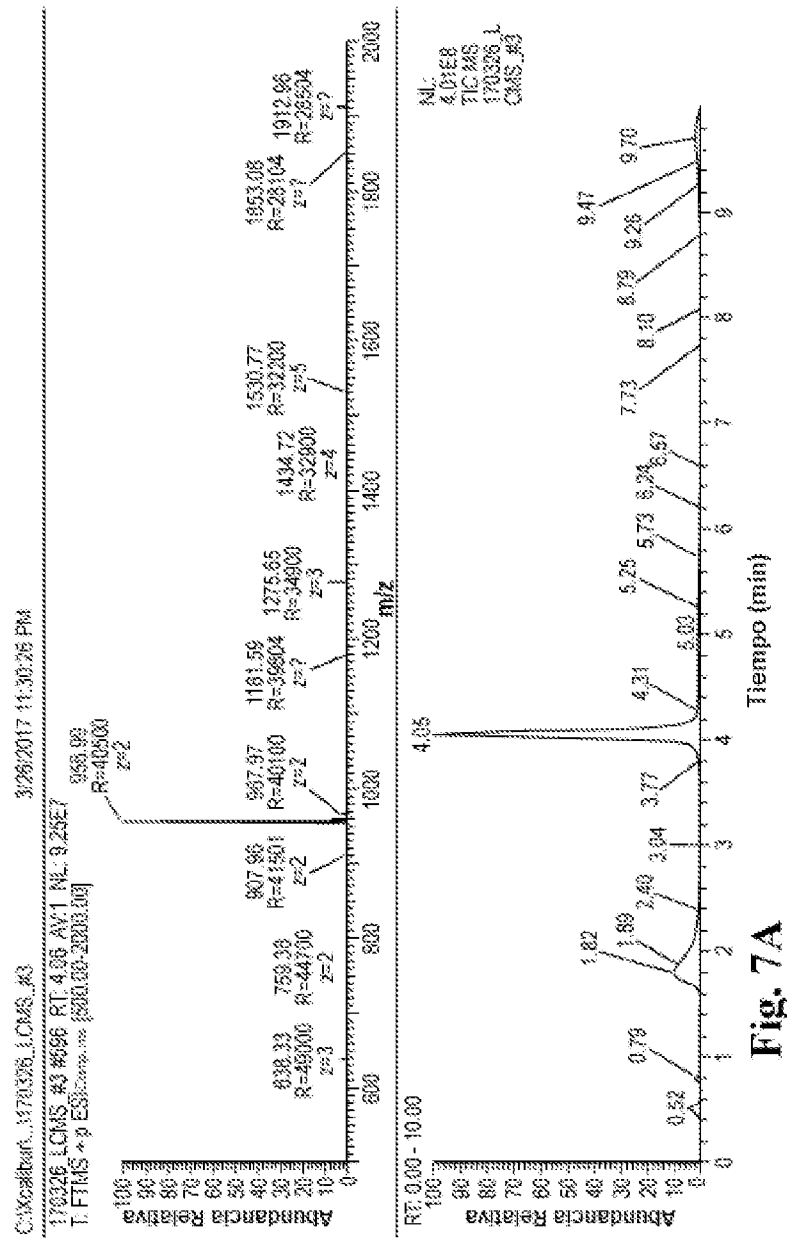
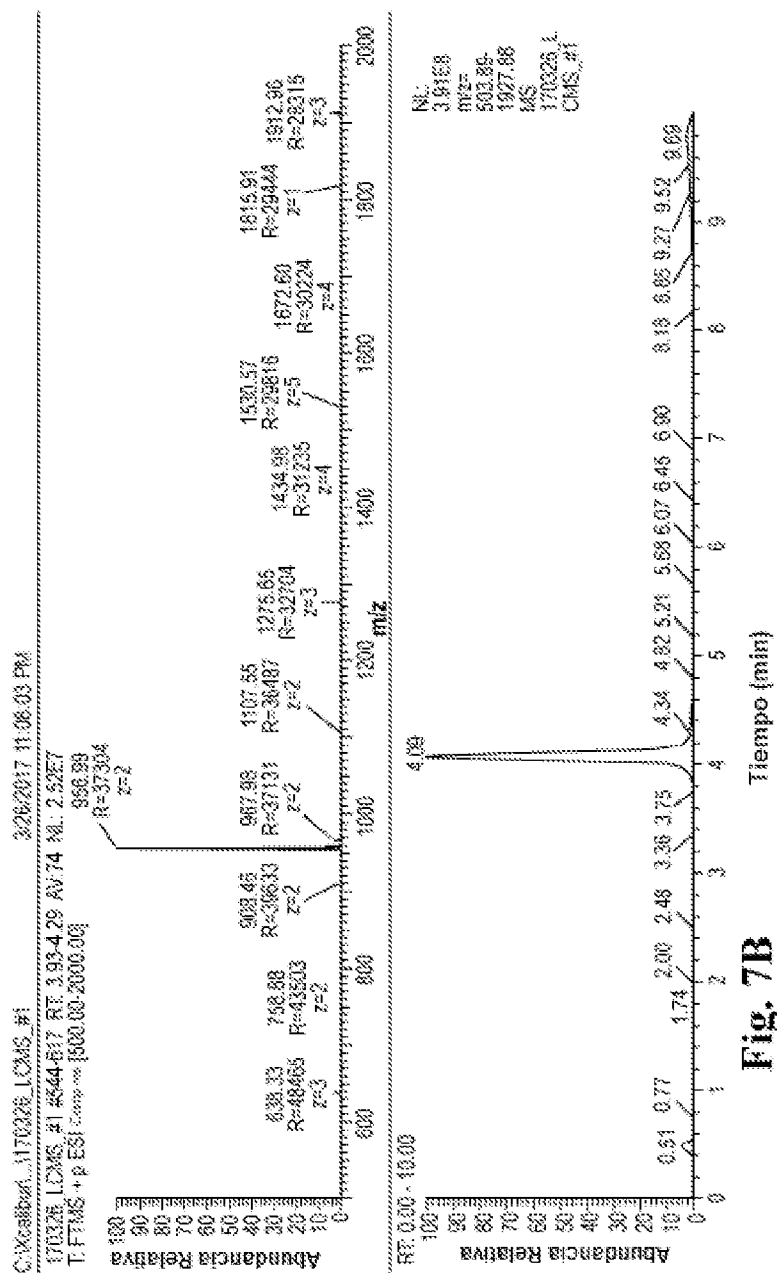
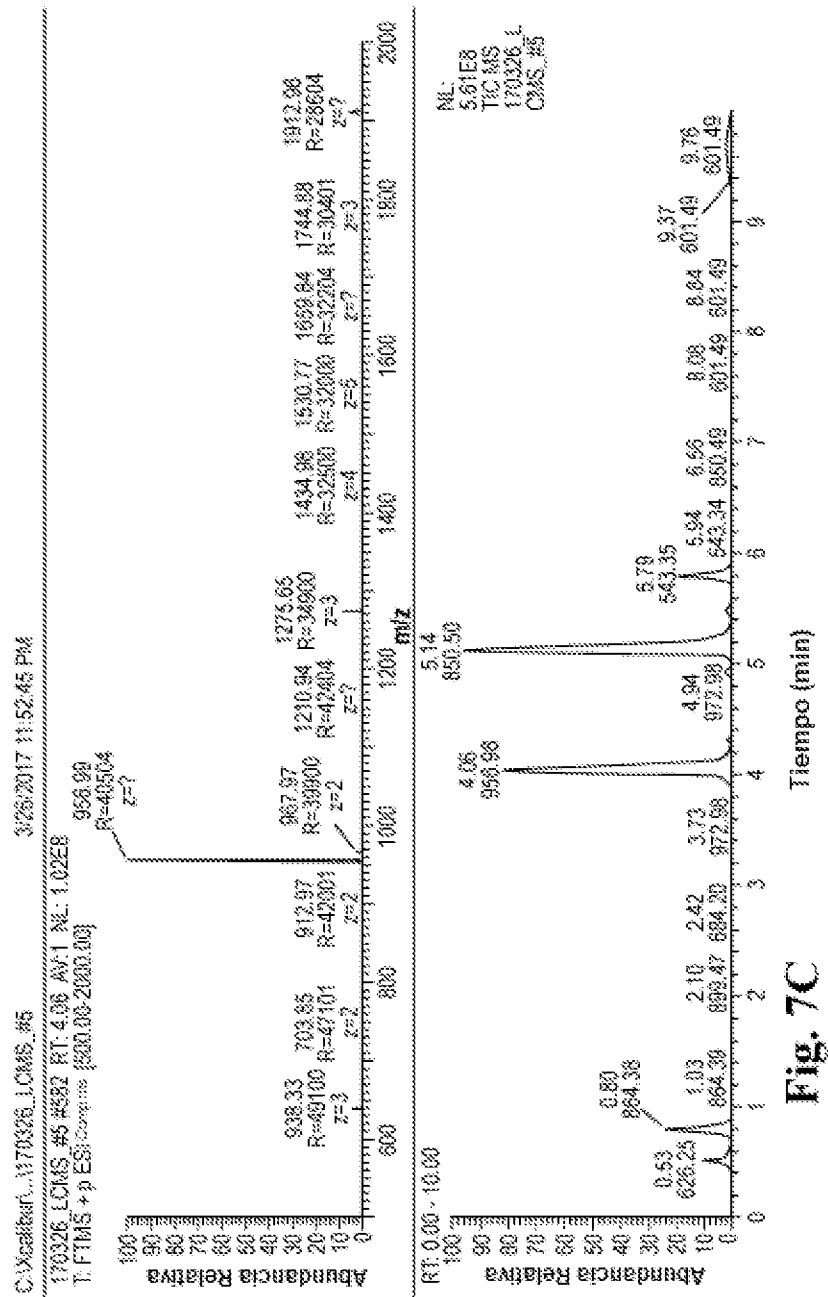


Fig. 6







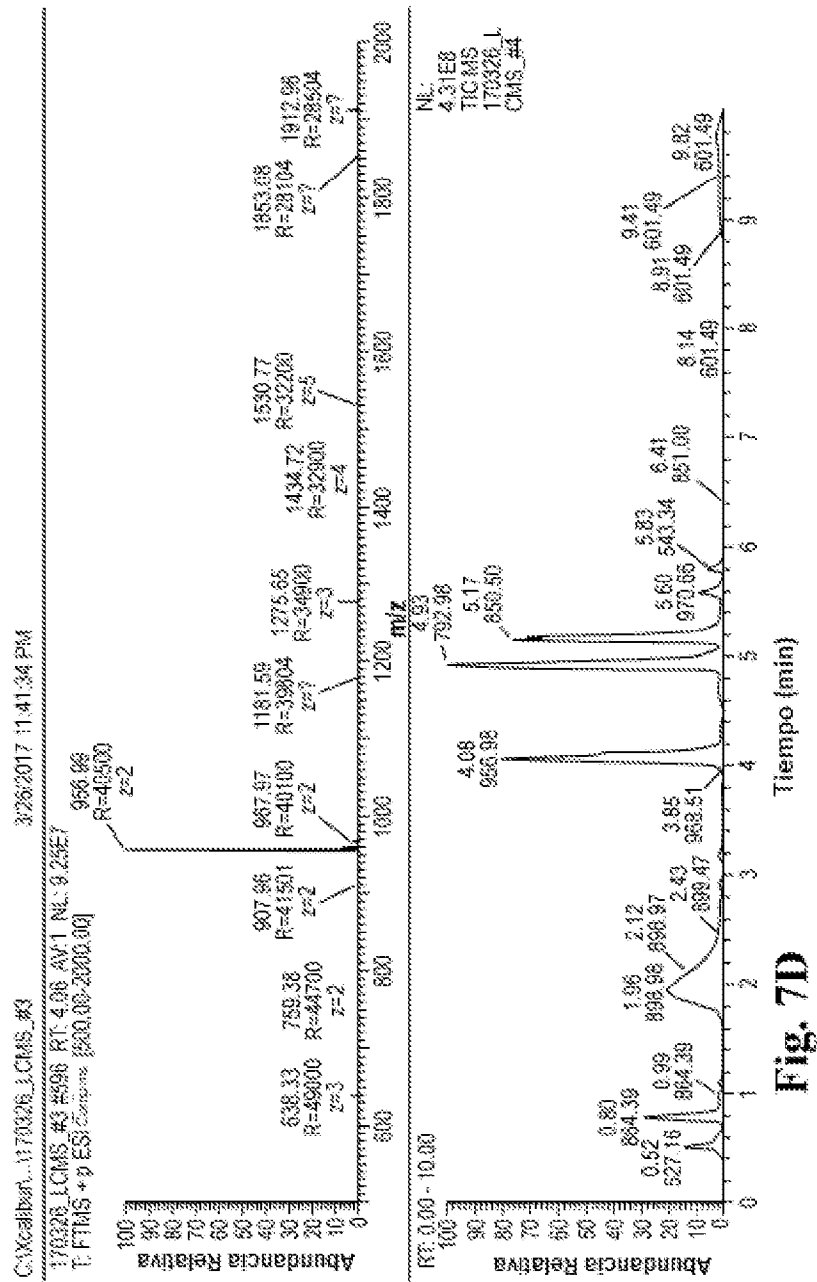
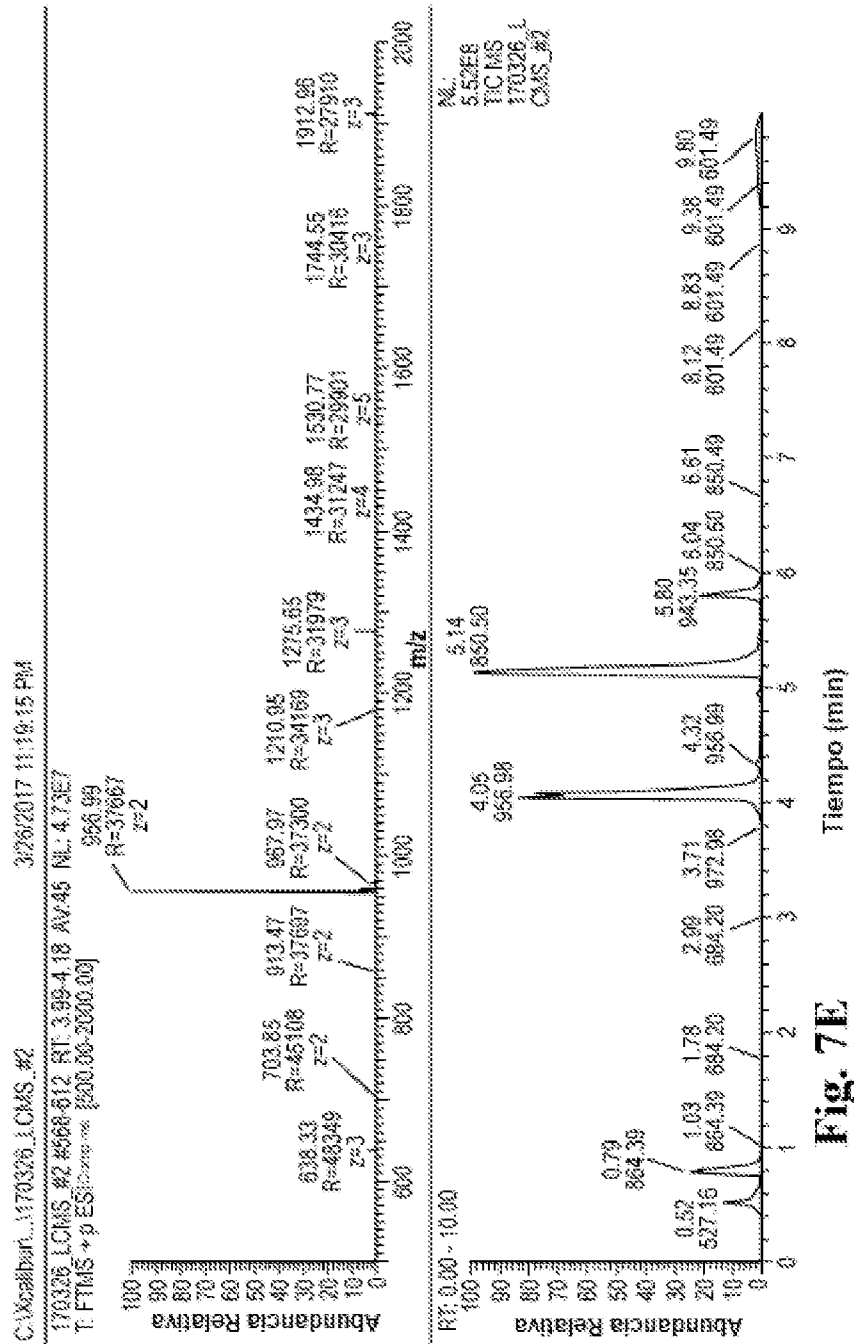
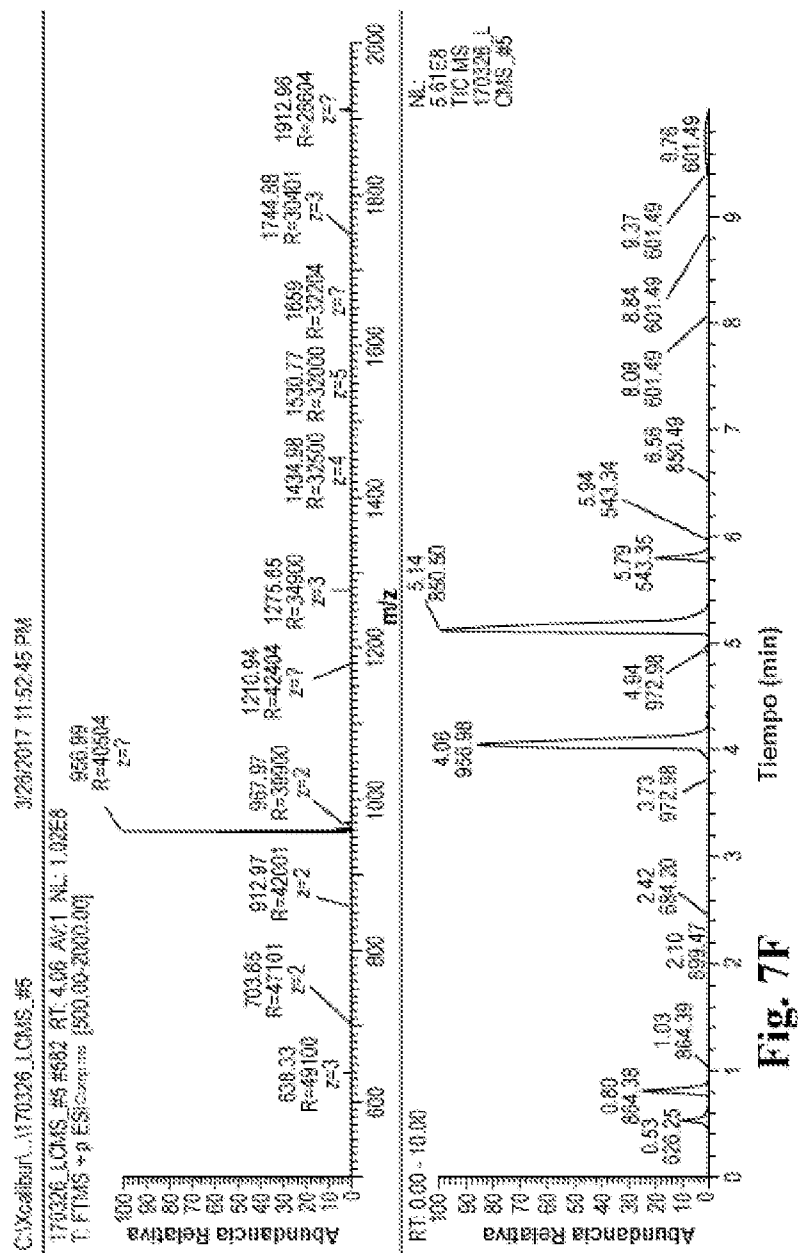
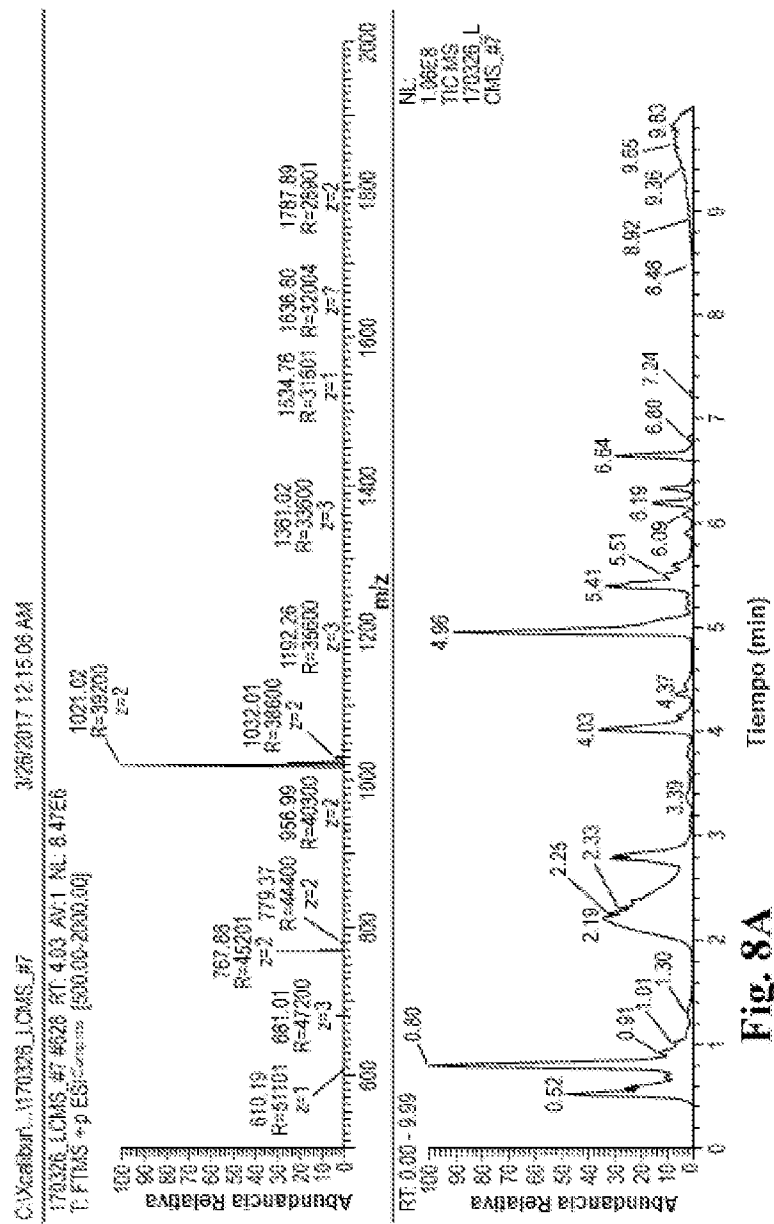
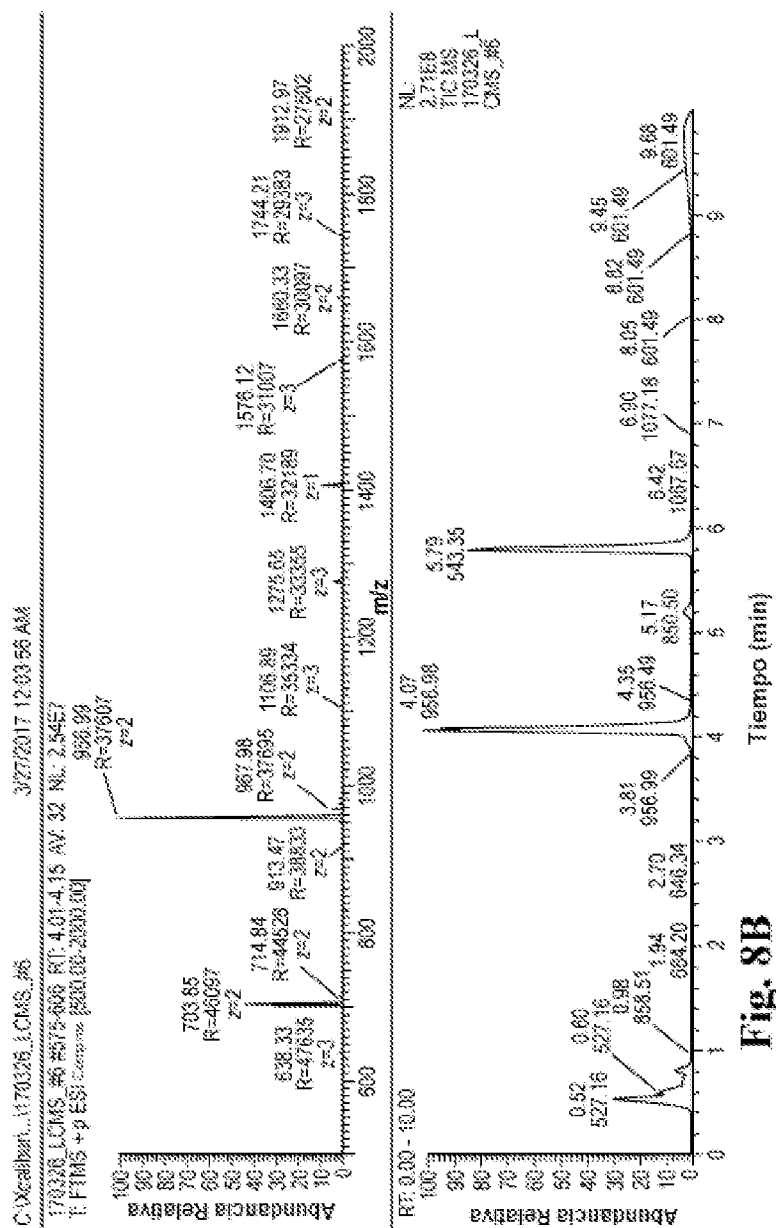


Fig. 7D









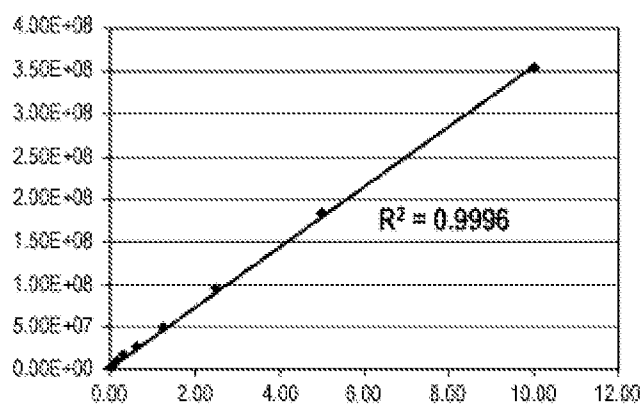


Fig. 9A

170516_LCMS_SAR425899_cleamfragn_170516234630 #242 RT: 5.57 AV: 1 NL:
5.31ES T1FTMS +c ES1d Curves: 2 95% 99 @ cld 35.00 [250.00-1925.00]

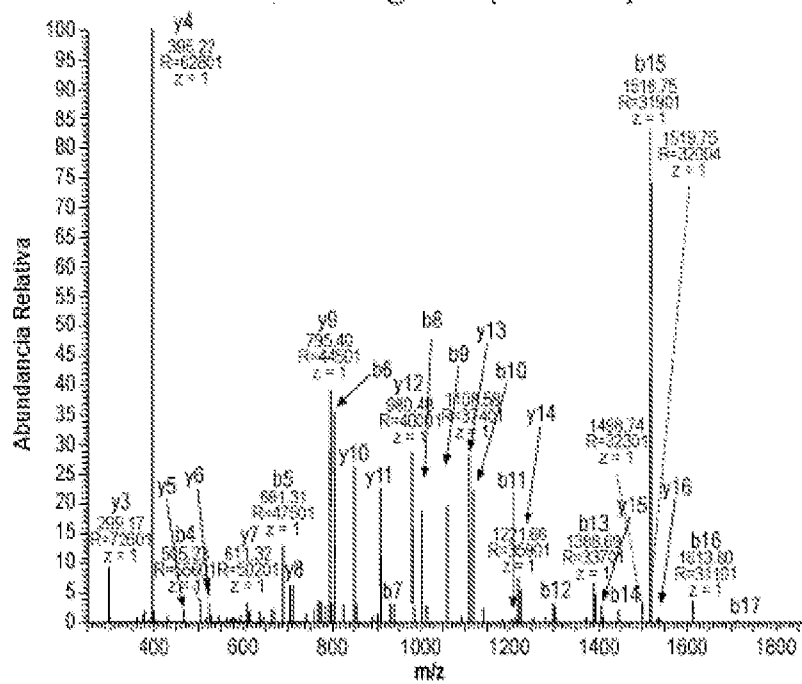


Fig. 9B

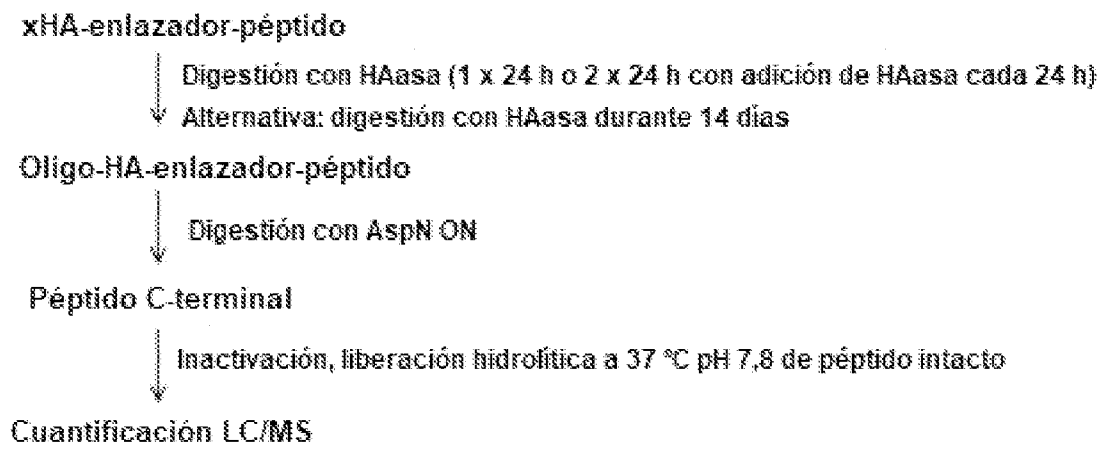


Fig. 10

Conc (ug/mL)	Curva en tampon	Curva en matriz
0.01	2.42E+06	2.64E+06
0.02	3.58E+06	3.96E+06
0.04	6.01E+06	6.30E+06
0.08	1.04E+07	1.16E+07
0.16	2.04E+07	2.11E+07
0.31	3.95E+07	4.00E+07
0.63	7.95E+07	7.54E+07
1.25	1.55E+08	1.50E+08
2.50	3.20E+08	3.07E+08
5.00	6.37E+08	6.20E+08

Fig. 11A

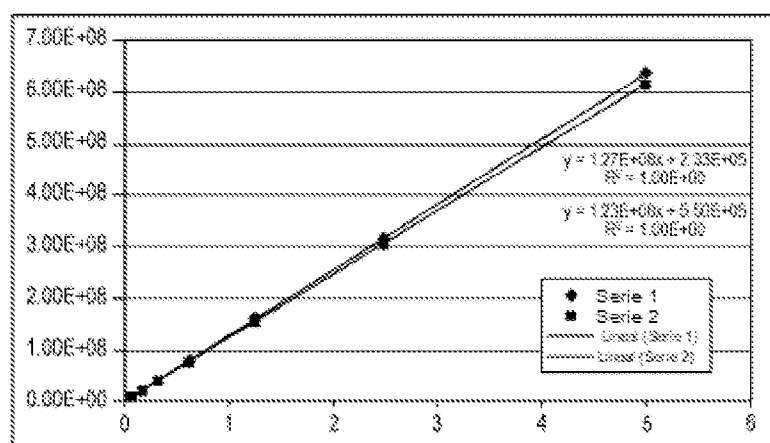


Fig. 11B

IS	7.06E+08
IS	7.16E+08
IS	7.13E+08
IS	7.52E+08
IS	7.32E+08
IS	7.36E+08
IS	7.24E+08
IS	7.12E+08
IS	7.27E+08
IS	7.21E+08
IS	7.47E+08
IS	7.49E+08
IS	7.36E+08
IS	7.56E+08
IS	7.55E+08
IS	7.37E+08
IS	7.28E+08
IS	7.39E+08
IS	7.33E+08
IS	7.24E+08
IS	7.49E+08
Promedio	7.33E+08
DevEst	1.48E+07
CV	2.02

Fig. 12A

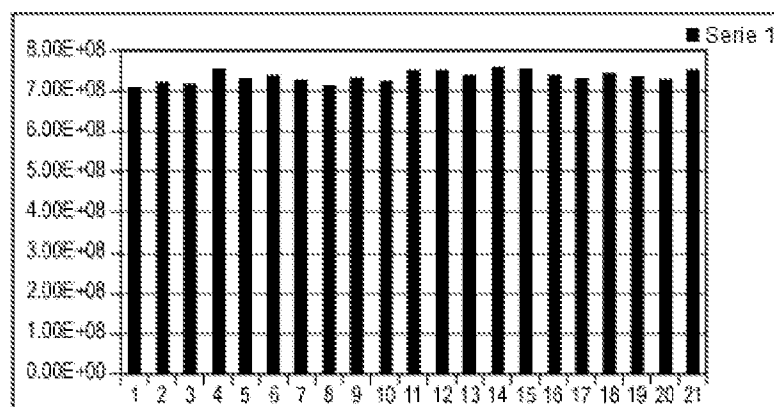


Fig. 12B

Medida ug/mL	Conc. Corregida para dilución total	% péptido
0.82	184.9	18.4
0.54	167.8	16.6
0.59	185.2	18.5
	promedio	1.8E+01
	desvst	1.3E+00
	%CV	7.4E-02

Fig. 13A

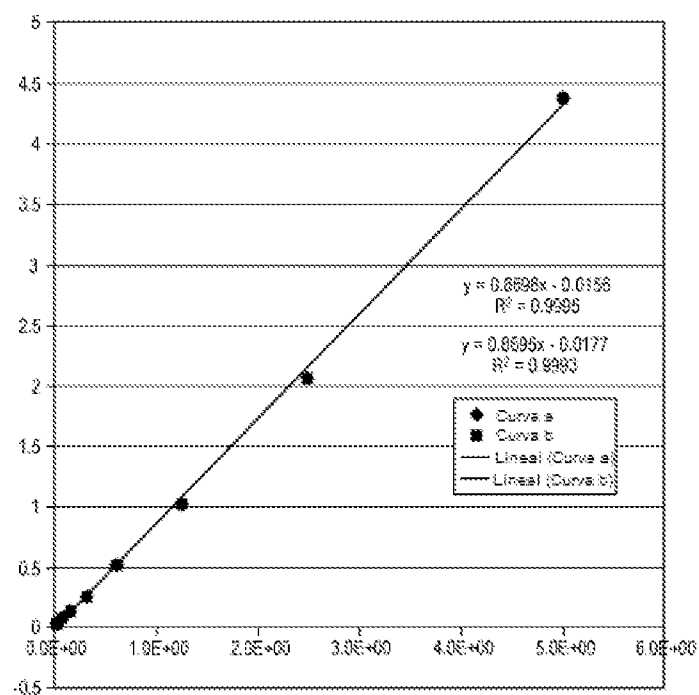
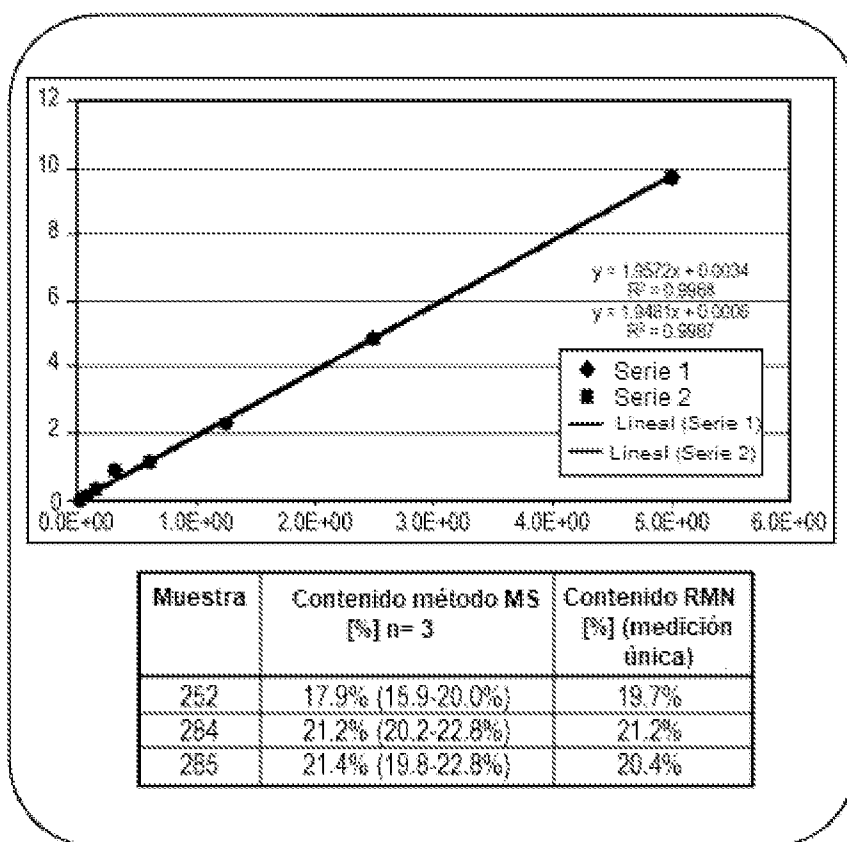


Fig. 13B

**Fig. 14**

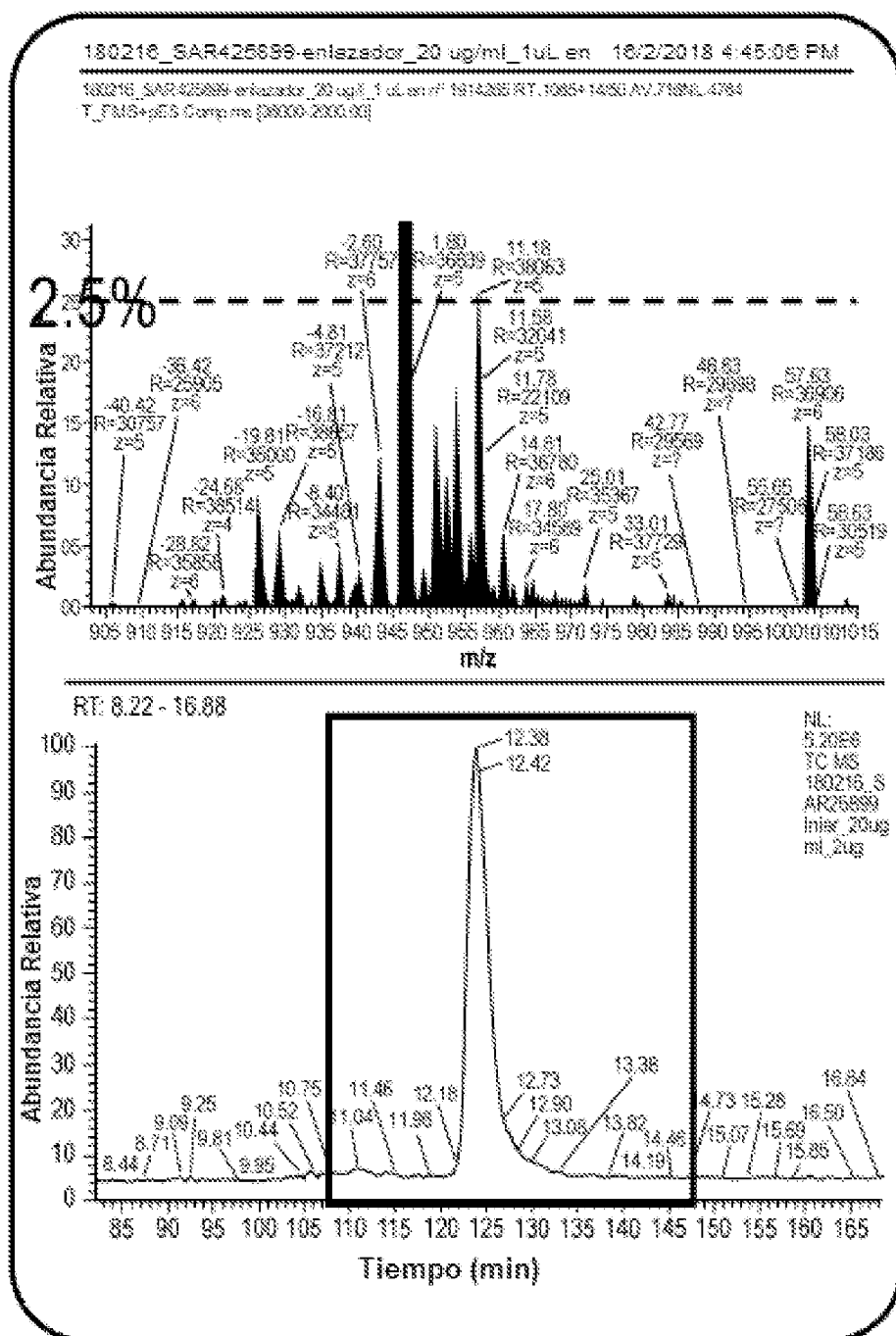


Fig. 15