

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 712**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2013 PCT/EP2013/058619**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13160397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2013 E 13719509 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2841950**

54 Título: **Cuantificación de impurezas para prueba de liberación de productos peptídicos**

30 Prioridad:

27.04.2012 WO PCT/EP2012/057771

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

05.03.2019

73 Titular/es:

**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
(100.0%)**

**Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

**VOGEL, MARTIN y
MUELLER, WERNER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 702 712 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

Cuantificación de impurezas para prueba de liberación de productos peptídicos

5 La presente invención se refiere a un método para la determinación cuantitativa de una impureza presente en un producto peptídico, en donde la impureza no se puede separar del producto principal y, opcionalmente, de otras impurezas. El método implica, particularmente, el uso de detección por espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) de alta resolución con o sin cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés). El método se puede usar para la investigación de la calidad de péptidos y proteínas, particularmente, de péptidos y proteínas farmacéuticos, y formulaciones de estos.

10 Mediante el uso de procesos conocidos de ADN recombinante y síntesis química en fase sólida se han sintetizado diversas proteínas y péptidos para uso farmacéutico. La producción de estas proteínas y péptidos, sin embargo, a menudo conduce a una multiplicidad de subproductos de la síntesis indeseados. Esto se da especialmente cuando se producen mediante síntesis en fase sólida. Con un aumento en la longitud del péptido/proteína, que conduce a un aumento en las etapas de síntesis, estos subproductos pueden estar presentes en 50 a 70 % del producto bruto.

15 Por lo tanto, una parte importante de la síntesis es la purificación del producto principal de los subproductos de la síntesis. Esta purificación se hace principalmente mediante procedimientos cromatográficos. Para su uso como un ingrediente activo en un producto farmacéutico, el producto peptídico purificado final se debe analizar en relación con su pureza, que también se hace principalmente mediante el uso de procedimientos cromatográficos. Dado que las diferencias en la estructura molecular del producto peptídico deseado y los subproductos de síntesis indeseados son a menudo muy menores en comparación con la estructura general, las propiedades cromatográficas de estos productos pueden ser idénticas o casi idénticas. Esto conduce, frecuentemente, a la coelución de estas impurezas con otras impurezas y el propio producto principal en un procedimiento de separación cromatográfica.

20 Leib et al. («Direct Quantitation of Peptide Mixtures without Standards Using Clusters Formed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry», ANALYTICAL CHEMISTRY, tomo 81, n.º 10, págs. 3965-3972) se refieren a un método de cuantificación directa de mezclas peptídicas mediante el uso de aglomeraciones formadas por medio de ionización por electropulverización-espectrometría de masas (ESI-MS, por sus siglas en inglés) sin patrones para determinar las impurezas. El método se describe para cinco mezclas peptídicas diferentes con concentraciones relativas que varían de 0,05 % a 50 % que consisten en leucina/encefalina, metionina/encefalina y bradicinina, fragmento 1-8 de bradicinina y fragmento 2-9 de bradicinina.

30 La solicitud de patente internacional WO 2012/012352A2 describe péptidos modificados o análogos de estos, que ofrecen una afinidad de unión más alta por su diana que la afinidad de unión de un péptido no modificado. Por ejemplo, compuestos con propiedades mejoradas en comparación con enfurvitida útiles para el tratamiento del VIH y el SIDA, o compuestos con propiedades mejoradas en comparación con exenatida (exendina-4) o incluso lixisenatida, útiles para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 en sujetos diagnosticados con diabetes o para el tratamiento de individuos prediabéticos. Para la fabricación de dichos péptidos, se describen diversos métodos de producción y purificación que incluyen la espectrometría de masas. Sin embargo, WO 2012/012352A2 no proporciona un método dirigido a la determinación cuantitativa de las impurezas.

40 El desarrollo de métodos analíticos selectivos es uno de los aspectos clave para las pruebas de liberación de composiciones de producto peptídico usadas como compuestos farmacéuticos. Pero debido a los motivos descritos anteriormente, incluso grandes esfuerzos pueden no resultar en la separación de todas las impurezas relevantes mediante métodos cromatográficos. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar métodos nuevos para determinar las cantidades de impurezas en productos peptídicos, particularmente, la cantidad de impurezas que no se pueden separar cuantitativamente del producto principal deseado mediante métodos cromatográficos.

45 La presente invención proporciona un método para la determinación cuantitativa de impurezas en composiciones de producto peptídico, que no se pueden separar cromatográficamente del producto principal o que se coeluyen con otras impurezas o ingredientes de la composición. Este método se muestra, a modo de ejemplo, para el péptido Lixisenatida (AVE0010), un agonista de GLP-1 que tiene una longitud de 44 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de Lixisenatida se muestra como la SEQ ID NO:1:

H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-
A-P-P-S-K-K-K-K-K-NH₂

50 La Lixisenatida se produce mediante un proceso de síntesis química de fase sólida. Por medio de procedimientos de purificación cromatográfica, la mayoría de las impurezas se puede separar del producto principal deseado.

Sin embargo, dos impurezas, Di-Ser(33)-AVE0010 y Di-Ala(35)-AVE0010, no se pueden separar mediante métodos cromatográficos. Las secuencias de aminoácidos de estas impurezas son las siguientes:

Di-Ser(33)-AVE0010 (SEQ ID NO:2)

H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-S-
G-A-P-P-S-K-K-K-K-K-NH₂

Di-Ala(35)-AVE0010 (SEQ ID NO:3)

H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-
A-A-P-P-S-K-K-K-K-K-NH₂

- 5 Dado que Lixisenatida se usa como producto farmacéutico, particularmente, en el tratamiento de pacientes con diabetes, la presencia y la cantidad de las impurezas mencionadas anteriormente se debe determinar para que se permita la liberación del lote. Los presentes inventores hallaron ahora que se puede lograr una determinación cuantitativa de las impurezas mencionadas anteriormente usando técnicas de espectrometría de masas de alta resolución con o sin cromatografía previa.
- 10 Un objeto de la presente invención es un método para la determinación cuantitativa de una impureza presente en una composición de producto peptídico, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar una composición de producto peptídico que comprende un producto peptídico, que es un producto peptídico de exendina que comprende la secuencia de aminoácidos S-S-G-A y una cantidad desconocida de al menos una impureza, en donde dicha impureza, que es un péptido Di-Ser(33)-exendina y/o un péptido Di-Ala(35)-exendina y que difiere del producto peptídico deseado en un componente básico aminoacídico dimérico de Di-serina y/o Di-alanina, no puede separarse del producto peptídico u otro ingrediente de la composición mediante un procedimiento cromatográfico,
- 15
- (b) proporcionar al menos una muestra de la composición de producto peptídico sin dicha impureza agregada y, opcionalmente, al menos una muestra adicional de la composición con una cantidad conocida de dicha impureza agregada,
- 20
- (c) determinar cuantitativamente dicha impureza en dicha al menos una muestra de la etapa (b) mediante espectrometría de masas, y
- (d) calcular la cantidad de dicha impureza en la composición de producto peptídico en base a los resultados de (c).
- Un objeto adicional de la presente invención es un método para la determinación cuantitativa de una impureza presente en una composición de producto peptídico, que comprende las etapas de:
- 25
- (a) proporcionar una composición de producto peptídico que comprende un producto peptídico, que es un producto peptídico de exendina que comprende la secuencia de aminoácidos S-S-G-A y una cantidad desconocida de al menos una impureza, en donde dicha impureza, que es un péptido Di-Ser(33)-exendina y/o un péptido Di-Ala(35)-exendina y que difiere del producto peptídico deseado en un componente básico aminoacídico dimérico de Di-serina y/o Di-alanina, no puede separarse del producto peptídico u otro ingrediente de la composición mediante un procedimiento cromatográfico,
- 30
- (b) proporcionar al menos tres muestras de la composición de producto peptídico, en donde una primera muestra comprende la composición de producto peptídico sin dicha impureza agregada, y en donde al menos dos muestras adicionales comprenden la composición de producto peptídico, cada una con una cantidad conocida diferente de dicha impureza agregada,
- 35
- (c) determinar cuantitativamente dicha impureza en dichas al menos tres muestras de la etapa (b) mediante espectrometría de masas, y
- (d) calcular la cantidad de dicha impureza en la composición de producto peptídico en base a los resultados de (c).
- Un objeto adicional de la invención es un kit de reactivos para determinar la cantidad de impurezas en una composición del producto de Lixisenatida (AVE 0010), que comprende:
- 40
- (i) al menos una preparación concentrada de Di-Ser(33)-AVE0010 y/o
- (ii) al menos una preparación concentrada de Di-Ala(35)-AVE0010.
- Además, un objeto adicional de la invención es un método para el control de la calidad de una composición que comprende un producto peptídico de exendina que comprende la secuencia de aminoácidos S-S-G-A, preferiblemente de una composición que comprende un producto de Lixisenatida (AVE0010), que comprende
- 45

determinar cuantitativamente la cantidad de un Di-Ser(33)-péptido, p. ej. Di-Ser(33)-AVE0010 y/o un Di-Ala(35)-péptido, p. ej. Di-Ala(35)-AVE0010, en dicha composición.

5 La presente invención se refiere a la determinación de una impureza presente en una composición de producto peptídico. El término «*producto peptídico*» abarca péptidos y proteínas que tienen una longitud de al menos 5 o al menos 10 aminoácidos y hasta 50 o hasta 100 aminoácidos o incluso más largos. El producto peptídico puede consistir en componentes básicos aminoacídicos codificados genéticamente o puede comprender componentes básicos aminoacídicos no codificados genéticamente, p. ej., aminoácidos de origen no natural, D-aminoácidos o aminoácidos modificados químicamente o puede consistir en diversas cadenas peptídicas enlazadas, p. ej., mediante puentes disulfuro. El producto peptídico puede contener, además, modificaciones en los extremos N y/o C 10 y/o en las cadenas laterales, p. ej., una acilación, una amidación o la adición de grupos de cadena lateral no peptídicos tales como grupos lipófilos. El producto peptídico puede ser lineal o circular. El producto peptídico tiene una longitud de 5-100 aminoácidos.

15 La síntesis del producto peptídico puede implicar procesos de ADN recombinante y/o procesos de síntesis química. Preferiblemente, el producto peptídico se ha sintetizado químicamente, particularmente mediante un procedimiento de síntesis en fase sólida que se conoce en la técnica, p. ej., un procedimiento que implica una etapa de alargamiento de una cadena peptídica acoplada a un portador, p. ej., una resina sintética. En una realización preferida de la invención, el producto peptídico es un péptido de Exendina, p. ej. exendina-4, Liraglutida o Lixisenatida (AVE0010). Más preferiblemente, el producto peptídico es un péptido de Exendina, p. ej., un péptido de Exendina que comprende la secuencia de aminoácidos S-S-G-A, lo más preferiblemente, Lixisenatida (AVE0010).

20 El método de la presente invención implica la determinación cuantitativa de una impureza presente en un producto peptídico después de sus síntesis, p. ej. después de su síntesis mediante un procedimiento de síntesis de fase sólida o como un producto de degradación después del almacenamiento. La impureza es normalmente una impureza peptídica, p. ej., un péptido que difiere del producto peptídico principal deseado en al menos un componente básico aminoacídico y/o una modificación química. Por ejemplo, la impureza puede ser un péptido que difiere del producto peptídico deseado en al menos un componente básico aminoacídico dimérico, es decir, un componente básico de Di-serina o Di-alanina. En el caso de un péptido de Exendina, p. ej., un péptido de Exendina que comprende la secuencia de aminoácidos S-S-G-A, la impureza puede ser, p. ej., un péptido de Di-Ser(33)-exendina, un péptido de Di-Ala(35)-exendina o combinaciones de estos. En el caso de Lixisenatida, la impureza puede, p. ej., ser Di-Ser(33)-AVE0010, Di-Ala(35)-AVE0010 o combinaciones de estos.

30 El método de la presente invención comprende la determinación cuantitativa de al menos una impureza en una composición de producto peptídico. La composición de producto peptídico comprende al menos un producto peptídico y al menos una impureza por determinar. Además, la composición puede comprender otros ingredientes, p. ej., ingredientes peptídicos o no peptídicos, incluidas otras impurezas. La composición de producto peptídico puede ser, p. ej., una formulación farmacéutica o una composición prevista para la fabricación de una formulación farmacéutica, p. ej. un lote sintetizado del producto peptídico.

35 En el método de la presente invención, el producto peptídico comprende una cantidad desconocida de al menos una impureza, que no se puede separar cuantitativamente del producto peptídico mediante un procedimiento cromatográfico o que se coeluye con otras impurezas o ingredientes presentes en la muestra de producto peptídico. En algunos casos, la composición de producto peptídico comprende cantidades desconocidas de una impureza. En otros casos, el producto peptídico comprende cantidades desconocidas de al menos dos, p. ej., 2, 3, 4, 5 o incluso más impurezas, que no se pueden separar cuantitativamente del producto peptídico mediante un procedimiento cromatográfico o que se coeluye con otras impurezas o ingredientes presentes en la muestra de producto peptídico. Preferiblemente, la al menos una impureza no se puede separar cuantitativamente del producto peptídico.

45 El término «*procedimiento cromatográfico*» implica un procedimiento cromatográfico adecuado para la purificación de productos peptídicos, que incluye, p. ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y, particularmente, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y, más particularmente, HPLC de fase inversa, o combinaciones de diversos procedimientos.

50 La impureza que se determina mediante el método de la presente invención no se puede separar cuantitativamente del producto peptídico o de otros ingredientes de la composición. Esto significa que la impureza se coeluye o se coeluye sustancialmente con el producto peptídico deseado o con otras impurezas o ingredientes después de un procedimiento de separación cromatográfica, particularmente después de un procedimiento de separación cromatográfica, según se describió anteriormente, de tal manera que la cuantificación por métodos ópticos, p. ej., detección de UV o fluorescencia no es posible. Esto significa que la impureza no se puede separar del producto peptídico deseado o de otros ingredientes, incluidas impurezas, mediante esfuerzos razonables y su cantidad cuantitativa en un lote dado de la composición de producto peptídico debe determinarse cuantitativamente mediante el método de la presente invención.

La etapa (a) del método de la invención comprende proporcionar una composición de producto peptídico que comprende una cantidad desconocida de al menos una impureza, en donde dicha impureza no puede separarse del producto peptídico u otro ingrediente de la composición mediante un procedimiento cromatográfico, según se describió anteriormente. El producto peptídico puede ser, p. ej., un producto para su uso en aplicaciones farmacéuticas, p. ej., para su uso como un medicamento en medicina humana o veterinaria.

La etapa (b) del método de la invención implica proporcionar al menos una muestra de la composición de producto peptídico sin impureza agregada y al menos una muestra adicional de la composición de producto peptídico con una cantidad conocida de impureza agregada. En una realización preferida, la etapa (b) implica proporcionar al menos tres muestras de la composición de producto peptídico, en donde la primera muestra comprende la composición de producto peptídico sin impureza agregada, y en donde al menos dos muestras adicionales comprenden la composición de producto peptídico y cada una de estas muestras comprende adicionalmente una cantidad conocida diferente de impureza agregada.

Al menos una muestra es una muestra que comprende la composición de producto peptídico sin impureza agregada, es decir, una muestra sin adiciones que comprende una cantidad desconocida de la impureza por determinar. Además de esta muestra, se puede proporcionar al menos una, p. ej. al menos dos, tres o cuatro muestras adicionales que son muestras con adicionales que comprenden la composición de producto peptídico con la cantidad desconocida de impureza y además con cantidades conocidas diferentes de impureza agregada por determinar. Estas muestras con adiciones se pueden preparar al agregar la impureza a las muestras de composición de producto peptídico sin adicionales a partir de una preparación concentrada de la impureza, preferiblemente, a partir de al menos dos preparaciones concentradas que comprenden diferentes concentraciones de la impureza. Las preparaciones concentradas pueden estar presentes en cualquier forma adecuada, p. ej., preparaciones en forma seca o líquida. Preferiblemente, las preparaciones concentradas son disoluciones concentradas.

Las muestras de prueba comprenden el producto peptídico con una cantidad desconocida de la impureza por determinar y la impureza agregada. Estos compuestos están presentes en concentraciones, que permiten el análisis mediante espectrometría de masas. La concentración del producto peptídico puede variar en gran medida. Puede estar, p. ej., en el intervalo de 0,001 - 50 mg/ml, preferiblemente, 0,01-10 mg/ml y más, preferiblemente 0,02 - 5,0 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 1,0 mg/ml. En las muestras con adiciones, la cantidad de impureza agregada está preferiblemente en el intervalo de 0,1 %-5 %, preferiblemente de 0,1-2 % sobre la base de la concentración del producto peptídico en la muestra.

En una realización preferida, el método de la invención comprende someter a prueba una muestra de producto peptídico sin adiciones junto con al menos una, preferiblemente al menos dos, tres o cuatro o incluso más muestras de producto peptídico con adición de al menos una impureza. En una realización diferente, el método de la invención implica someter a prueba solo una muestra de producto peptídico sin adiciones. La cantidad desconocida de impureza presente en la muestra sin adiciones se puede determinar mediante mediciones de referencia de muestras con adiciones y/o al comparar el valor medido de la impureza en la muestra sin adiciones con una referencia, p. ej., una curva normalizada o de calibración.

La etapa (c) del método de la invención comprende determinar cuantitativamente dicha impureza en dicha al menos una muestra de la etapa (b) mediante espectrometría de masas de alta resolución. Además de la espectrometría de masas, la determinación puede implicar un procedimiento cromatográfico previo, p. ej., a efectos de separar otras impurezas del producto peptídico o de otros ingredientes de la composición. Preferiblemente, la espectrometría de masas se combina con la HPLC. Cada muestra se puede someter a diversas determinaciones individuales a efectos de aumentar la precisión de la medición.

La espectrometría de masas se basa en una medición de la relación entre masa y carga de partículas cargadas. En un procedimiento de espectrometría de masas típico, la muestra se carga sobre el instrumento de espectrometría de masas y se volatiliza. Los componentes de la muestra se ionizan y los iones resultantes se separan en el analizador de masa por campos electromagnéticos. Los iones resultantes se detectan y la señal se procesa en un espectro de masas. Para la ionización de los productos peptídicos, se puede usar ionización por electropulverización (ESI) y desorción/ ionización láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés). Los iones resultantes se pueden detectar mediante métodos de elevada sensibilidad tales como los sistemas de detección Orbitrap o transformada de Fourier (FT, por sus siglas en inglés)-Resonancia ciclónica de iones (ICR, por sus siglas en inglés).

Según la etapa (c), al menos un pico asociado con la impureza por determinar se analiza mediante espectrometría de masas. Este pico puede derivarse de un espectro de masas desconvoluto o no desconvoluto. Preferiblemente, el método implica la determinación de uno o varios picos monoisotópicos asociados con la impureza por determinar. En el caso de la impureza Di-Ser(33)-AVE0010, se puede usar un pico cuádruplemente cargado de un espectro de masas no desconvoluto a p. ej., 1237,1529 Da o del espectro de masas desconvoluto a 4944,5822 Da. En el caso de la impureza Di-Ala(35)-AVE0010, se puede analizar un pico cuádruplemente cargado de un espectro de masas no desconvoluto a 1233,1550 Da o del espectro de masas desconvoluto a 4928,5908 Da.

El al menos un pico por analizar se puede identificar en un espectro de masas de la impureza usando una configuración de alta resolución y una detección de sensibilidad elevada, según se describieron anteriormente.

5 La etapa (d) comprende calcular la cantidad de la impureza en la composición de producto peptídico en base a los resultados del análisis de espectrometría de masas. En una realización preferida, el cálculo se lleva a cabo mediante un método que comprende un análisis de regresión, particularmente, un análisis de regresión lineal. El análisis de regresión puede comprender generar una curva, p. ej., una línea recta, a partir de los valores medidos de las impurezas en al menos dos muestras con adiciones, es decir, muestras que comprenden el producto peptídico con la cantidad desconocida de impureza y que tiene agregadas las dos cantidades conocidas diferentes de impurezas (o a partir de valores de referencia de dichas muestras que se han generado en mediciones de normalización o calibración). En esta curva, p. ej., una línea recta, se inserta el valor medido de la impureza en la muestra sin adiciones para permitir, de esta manera, la determinación cuantitativa de la cantidad desconocida de la impureza presente en dicha muestra.

Preferiblemente, el cálculo se lleva a cabo de acuerdo con la ecuación de línea recta lineal:

$$y = ax + b$$

15 en donde y corresponde al área pico determinada de la impureza en una muestra (sea una muestra con adiciones o sin adiciones), x corresponde a la cantidad agregada conocida de la impureza en una muestra con adiciones, a es la pendiente de línea recta y b es la interceptación con el eje y, que corresponde a la señal de medición de la impureza en una muestra sin impureza agregada ($x = 0$). La cantidad cuantitativa de la impureza en la muestra sin adiciones x_i se puede obtener usando los parámetros de regresión obtenidos de la siguiente manera:

$$20 \quad x_i = b \cdot a^{-1}$$

La invención también abarca un kit de reactivos para determinar la cantidad de impurezas en un producto de Lixisenatida que comprende al menos una preparación concentrada de Di-Ser(33)-AVE0010 y/o Di-Ala(35)-AVE0010 y opcionalmente reactivos adicionales tales como disolventes, tampones, etc. El kit de reactivos se puede usar en un método para el control de calidad de un producto de Lixisenatida para la determinación cuantitativa de la cantidad de Di-Ser(33)-AVE0010 y/o Di-Ala(35)-AVE0010 en dicho producto de Lixisenatida. Preferiblemente, la determinación cuantitativa se lleva a cabo de acuerdo con un método espectrométrico de masas, p. ej., un método espectrométrico de masas, según se describió anteriormente.

La presente invención se explica con más detalles mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Leyendas de las figuras:

30 La figura 1 muestra la coelución de los picos de Lixisenatida (AVE0010), Di-Ser(33)-AVE0010 y Di-Ala(35)-AVE0010 en un cromatograma de HPLC.

La figura 2 muestra el espectro de masas de los iones moleculares cuádruplamente cargados de AVE0010 y las impurezas Di-Ser(33)-AVE0010 y Di-Ala(35)-AVE0010.

35 La figura 3 muestra una comparación de espectros de masas de preparaciones de AVE0010 sin adiciones y con adiciones (1 % de cada impureza).

La figura 4 muestra una vista ampliada del intervalo de masa de Di-Ser(33)-AVE0010 en la configuración de resolución de 60 000 y 100 000, respectivamente, a m/z 400 y el patrón teórico calculado de las especies superpuestas.

La figura 5 muestra espectros de masas desconvolutos con patrones teóricos calculados de especies superpuestas.

40 La figura 6 muestra una vista ampliada del pico de impureza usado para la cuantificación de Di-Ser(33)-AVE0010.

La figura 7 muestra un cromatograma de ion simple extraído de un isótopo cuádruplamente cargado de Di-Ala(35)-AVE0010 y Di-Ser(33)-AV0010 en una muestra de prueba, como un espectro de masas no desconvoluto.

La figura 8 muestra un cromatograma de ion simple extraído de Di-Ala(35)-AVE0010 y Di-Ser(33)-AV0010 en una muestra de prueba, como un espectro de masas desconvoluto.

45 La figura 9 muestra un ejemplo para el cálculo de la concentración de la impureza Di-Ala(35)-AVE0010 en una muestra de prueba.

Ejemplos

ES 2 702 712 T3

Procedimiento analítico para la cuantificación de Di-Ser(33)-Lixisenatida y Di-Ala(35)-Lixisenatida mediante HPLC/MS

1. Materiales y métodos

1.1 Materiales de referencia

5 Material de referencia de Lixisenatida (AVE0010); producido mediante síntesis en fase sólida y posterior purificación.

Material de referencia de Di-Ser(33)-AVE0010; producido mediante un proceso de síntesis en fase sólida con etapas de doble acoplamiento del aminoácido Serina protegido en la posición 33 y posterior purificación.

Material de referencia de Di-Ala(35)-AVE0010; producido mediante un proceso de síntesis en fase sólida con etapas de doble acoplamiento del aminoácido Alanina protegido en la posición 35 y posterior purificación.

10 Se preparó una preparación de muestra sin adiciones de Lixisenatida (que contenía cantidades desconocidas de impurezas DiSer(33)-AVE0010 y DiAla(35)-AVE0010) a una concentración de 1,0 mg Lixisenatida/ml.

Se prepararon cuatro preparaciones de muestra con adiciones para cada una de las impurezas mediante incorporación de 0,2 %, 0,4 %, 0,6 % y 0,8 % en peso de las impurezas Di-Ser(33)-AVE0010 o Di-Ala(35)-AVE0010, respectivamente, en una preparación de muestra con 1,0 mg de Lixisenatida/ml.

15 1.2 Condiciones analíticas

Se usó un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento con gradiente que consistía en una bomba de HPLC binaria, un automuestreador, un horno de columna y un espectrómetro de masas de alta resolución, p. ej., LTQ-Orbitrap (ThermoFisher) con una configuración de resolución de 100 000 (a m/z 400), o equivalente.

20 La cromatografía se llevó a cabo con una columna de HPLC analítica de fase inversa C18 (Jupiter C18 3 µm 300A) con una longitud de 150 mm y un diámetro interno de 2,0 mm.

La fase móvil A consistía en 850 partes de volumen de agua, 150 partes de volumen de acetonitrilo y 1 parte de volumen de ácido trifluoroacético. La fase móvil B consistía en 250 partes de volumen de agua, 750 partes de volumen de acetonitrilo y una parte de volumen de ácido trifluoroacético. El gradiente se fijó de la siguiente manera:

Tiempo [minutos]	Fase móvil A [%]	Fase móvil B [%]
0,00	77,5	22,5
17,50	28,0	72,0
17,51	77,5	22,5
26,00	77,5	22,5

25 El espectrómetro de masas se operó en modo de ionización por electropulverización positiva y se barrió en un modo para medir las señales de iones de los analitos por determinar.

Las condiciones de prueba fueron las siguientes:

Velocidad de flujo: 0,25 mL/min

Volumen de inyección: 10 µL

Temperatura de automuestreador: Temperatura de automuestreador fijada a +10 °C±2 °C

Temperatura de columna: Temperatura de horno fijada a +25 °C±2 °C

Método de ionización: ESI positiva

Medición/Detección:

ES 2 702 712 T3

ITMS:	modo:	positivo
	intervalo de masa:	700,0-2000,0
FTMS:	modo:	positivo
	intervalo de masa (SIM):	1232,0-1239,0
	resolución:	100 000
Válvula de desviación:	desecho	0 – 1,5 min
	inyectar	1,5 2,25,5 min
Barrido total PDA (UV), opcional		

El procedimiento se basó en los métodos descritos en la Farmacopea Europea 7.0 (2011) (2.2.43 Espectrometría de Masas) y la Farmacopea de los Estados Unidos 34 (2011) (<736> Espectrometría de Masas).

1.3 Integración

- 5 Las determinaciones se llevaron a cabo a partir de los espectros de masa desconvolutos o los espectros de masas no desconvolutos de los iones cuádruplamente cargados $[M+4H^+]^{4+}$.

Después de la selección de la masa precisa de un único pico isotópico del patrón:

a) usando un pico cargado cuádruplamente de los espectros de masas no desconvolutos:

- o DiSer(33)-AVE0010: p. ej., 1237,1529 Da
- 10 o DiAla(35)-AVE0010: p. ej., 1233,1550 Da,

o b) usando los espectros de masas desconvolutos:

- o DiSer(33)-AVE0010: p. ej., 4944,5822 Da
- o DiAla(35)-AVE0010: p. ej., 4928,5908 Da,

15 se llevaron a cabo cromatogramas de iones extraídos. Solo se extrajo el isótopo de interés. Los picos de los cromatogramas de iones extraídos se integraron.

2. Resultados

20 La figura 1 muestra la coelución de los picos de Lixisenatida y las impurezas Di-Ala(35)-AVE0010 y Di-Ser(33)-AVE0010 en un cromatograma de HPLC. Debido a estas superposiciones en los picos cromatográficos, Di-Ala(35)-AVE0010 y Di-Ser(33)-AVE0010 constituyen impurezas que no se pueden separar cuantitativamente del producto peptídico deseado AVE0010 mediante un procedimiento cromatográfico.

25 Para el desarrollo del método, se tuvieron que tener en cuenta algunas características específicas de la espectrometría de masas. El espectro de masas de Lixisenatida muestra además las especies múltiple protonadas que típicamente se aglomeran con cationes que son ubicuos en disolución, p. ej., sodio o potasio. La figura 2 muestra la sección del espectro de los iones moleculares cuádruplamente cargados de AVE0010 que se superponen con los espectros de masas de las impurezas y, de esta manera, ocultan el analito.

30 En la figura 3, una muestra de AVE0010 con adición de 1 % de las dos impurezas se compara con una muestra sin adiciones que contiene una cantidad baja de las impurezas. En la vista ampliada de la tira se puede ver que puede haber una superposición de los patrones moleculares con aglomeraciones subyacentes. En el caso de Di-Ser(33)-AVE0010, el aumento en la masa con respecto a Lixisenatida es de 87 Da. Por otro lado, la Lixisenatida se puede aglomerar con 4 iones de sodio que conducen a un desplazamiento de la masa de 88 Da. Estos dos patrones se superponen y se deben separar por espectrometría de masas, de lo contrario la impureza Di-Ser-AV0010 no se puede cuantificar específicamente.

5 Como se puede observar en la figura 4, los picos que se superponen no se separaron con una configuración de resolución de 60 000, sino que solo con una configuración de resolución de 100 000. En la parte más baja de la figura 4, se muestra el espectro teórico de Di-Ser-AVE0010 que se superpone con la aglomeración de sodio de Lixisenatida. Dichas resoluciones altas se suministran preferiblemente mediante espectrometría de masas por transformada de Fourier, ya sea por FT-ICR o como se usó en la presente mediante un espectrómetro de masas FT-Orbitrap.

Después de la desconvolución y formación del centroide de los espectros, estas dos especies se pueden separar mediante espectrometría de masas, c.f. figura 5.

10 En la figura 6, se han agregado todos los espectros de masas individuales medidos del pico cromatográfico completo. El pico de masa usado para la medición de Di-Ser(33)-AVE0010 se muestra en una vista ampliada. Es suficientemente distante del pico correspondiente a la aglomeración de sodio de AVE0010 para permitir una medición precisa. Todos los picos de masa de analitos están dentro de una ventana de masa estrecha, lo que muestra la estabilidad de masa del instrumento, bien separados de cualquier pico interferente. Por lo tanto, este método es adecuado para determinar específicamente las cantidades de Di-Ser(33)-AVE0010 y Di-Ala(35)-AVE0010 en un producto peptídico de Lixisenatida.

15 Los cromatogramas de iones extraídos de un isótopo cuádruplamente cargado de Di Ala(35)-AVE0010 y Di-Ser(33)-AVE0010 en una muestra de prueba se muestran como espectros de masa no desconvolutos en la Figura 7 y como espectros de masa desconvolutos en la figura 8.

20 La cantidad de Di-Ser(33)-AVE0010 y Di-Ala(35)-AVE0010 se puede calcular mediante un análisis de regresión lineal. Al usar cada inyección de las disoluciones de prueba con adiciones y sin adiciones, se puede establecer una curva de regresión de acuerdo con la ecuación:

$$y = ax+b$$

a = Pendiente

y = Área de pico de las disoluciones de prueba (disoluciones de prueba sin adiciones y con adiciones)

25 x = Cantidad agregada de Di-Ser(33)-AVE0010 o Di-Ala(35)-AVE0010 en las disoluciones de prueba (disoluciones sin adiciones y con adiciones).

b = Interceptación

La concentración x_t de Di-Ser(33)-AVE0010 y Di-Ala(35)-AVE0010 en la muestra de prueba se puede calcular usando los parámetros de regresión obtenidos de la siguiente manera:

30 $x_t = b \cdot a^{-1}$

La figura 9 muestra un ejemplo para el cálculo de la concentración de Di-Ala(35)-AVE0010 en la muestra de prueba.

El resultado final se determinó como la media aritmética de todas las determinaciones individuales expresadas en porcentaje de Lixisenatida. En el caso específico, el valor medio de la impureza Di-Ala(35)-AVE0010 en la muestra se determinó como 0,4260 % en base a la cantidad de Lixisenatida.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> Cuantificación de impurezas para prueba de liberación de productos peptídicos

<130> 52972PWO

5 <160> 3

<170> BISSAP 1.0

<210> 1
 < 211> 44
 < 212> PRT
 10 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..44
 < 223> /mol_tipo="proteína"
 15 /nota="Lixisenatida-(AVE0010)"
 /organismo="Secuencia artificial"

<220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> 44
 20 < 223> La lisina se modifica con un grupo NH2.

<400> 1
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 35 40

<210> 2
 < 211> 45
 25 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 221> FUENTE
 < 222> 1..45
 30 < 223> /mol_tipo="proteína"
 /nota="Di-Ser(33)-AVE0010"
 /organismo="Secuencia artificial"

<220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> 45
 35 < 223> La lisina se modifica con un grupo NH2.

ES 2 702 712 T3

```

<400> 2
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1          5          10          15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20          25          30
Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35          40          45
  
```

```

<210> 3
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
  
```

```

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..45
<223> /mol_tipo="proteína"
/nota="Di-Ala(35)-AVE0010"
/organismo="Secuencia artificial"
  
```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> 45
<223> La lisina se modifica con un grupo NH2.
  
```

```

<400> 3
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1          5          10          15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20          25          30
Ser Gly Ala Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35          40          45
  
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación cuantitativa de una impureza presente en una composición de producto peptídico, que comprende las etapas de:
 - 5 (a) proporcionar una composición de producto peptídico que comprende un producto peptídico, que es un producto peptídico de exendina que comprende la secuencia de aminoácidos S-S-G-A y una cantidad desconocida de al menos una impureza que es un péptido Di-Ser(33)-exendina y/o un péptido Di-Ala(35)-exendina y que difiere del producto peptídico deseado en un componente básico aminoacídico dimérico de Di-serina y/o Di-alanina, en donde dicha impureza no puede separarse del producto peptídico u otro ingrediente de la composición mediante un procedimiento cromatográfico y en donde dicha impureza se coeluye o se coeluye sustancialmente con el producto peptídico deseado después del procedimiento de separación cromatográfica,
 - 10 (b) proporcionar al menos una muestra de la composición de producto peptídico sin dicha impureza agregada y al menos una muestra adicional de la composición de producto peptídico con una cantidad conocida de dicha impureza agregada,
 - 15 (c) determinar cuantitativamente dicha impureza en dicha muestra de la etapa (b) mediante espectrometría de masas, y
 - (d) calcular la cantidad de dicha impureza en la composición de producto peptídico en base a los resultados de (c).
2. Un método para la determinación cuantitativa de una impureza presente en una composición de producto peptídico, que comprende las etapas de:
 - 20 (a) proporcionar una composición de producto peptídico que comprende un producto peptídico, que es un producto peptídico de exendina que comprende la secuencia de aminoácidos S-S-G-A y una cantidad desconocida de al menos una impureza que es un péptido Di-Ser(33)-exendina y/o un péptido Di-Ala(35)-exendina y que difiere del producto peptídico deseado en un componente básico aminoacídico dimérico de Di-serina y/o Di-alanina, en donde dicha impureza no puede separarse del producto peptídico u otro ingrediente de la composición mediante un procedimiento cromatográfico,
 - 25 (b) proporcionar al menos tres muestras de la composición de producto peptídico, en donde una primera muestra comprende la composición de producto peptídico sin dicha impureza agregada, y en donde al menos dos muestras adicionales comprenden la composición de producto peptídico, cada una con una cantidad conocida diferente de dicha impureza agregada,
 - 30 (c) determinar cuantitativamente dicha impureza en dichas muestras de la etapa (b) mediante espectrometría de masas, y
 - (d) calcular la cantidad de dicha impureza en la composición de producto peptídico en base a los resultados de (c).
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el producto peptídico se ha sintetizado químicamente, particularmente mediante un procedimiento de síntesis en fase sólida, o producido mediante procesos de ADN recombinante.
- 35 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la composición de producto peptídico es una formulación farmacéutica o una composición prevista para la fabricación de una formulación farmacéutica.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el producto peptídico es Lixisenatida (AVE0010).
- 40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el producto peptídico comprende cantidades desconocidas de al menos 2 impurezas, que no se pueden separar cuantitativamente del producto peptídico o de otro ingrediente de la composición mediante un procedimiento cromatográfico.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la impureza se agrega a al menos una muestra de composición de producto peptídico a partir de una preparación concentrada, preferiblemente, a partir de al menos dos preparaciones concentradas que comprenden diferentes concentraciones de la impureza.
- 45 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde se proporcionan al menos 3 o 4 muestras adicionales con diferentes cantidades conocidas de impureza agregada y se someten a determinación por espectrometría de masas.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la espectrometría de masas es espectrometría de masas de alta resolución, p. ej., que comprende espectrometría de masas por transformada de Fourier.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el cálculo comprende un análisis de regresión lineal.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el cálculo se lleva a cabo de acuerdo con la ecuación:

$$y = ax+b$$

5 en donde

a = pendiente

y = área de pico determinada de la impureza en una muestra

x = cantidad agregada de la impureza en una muestra

b = interceptación

10 y la cantidad desconocida de la impureza x_t se obtiene de la siguiente manera:

$$x_t = b \cdot a^{-1}$$

12. Un kit de reactivos para determinar la cantidad de impurezas en una composición del producto de Lixisenatida (AVE 0010), que comprende:

(i) al menos una preparación concentrada de Di-Ser(33)-AVE0010 (SEQ ID NO:2)

H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-S-G-A-P-

15 P-S-K-K-K-K-K-NH₂

y/o

(ii) al menos una preparación concentrada de Di-Ala(35)-AVE0010 (SEQ ID NO:3)

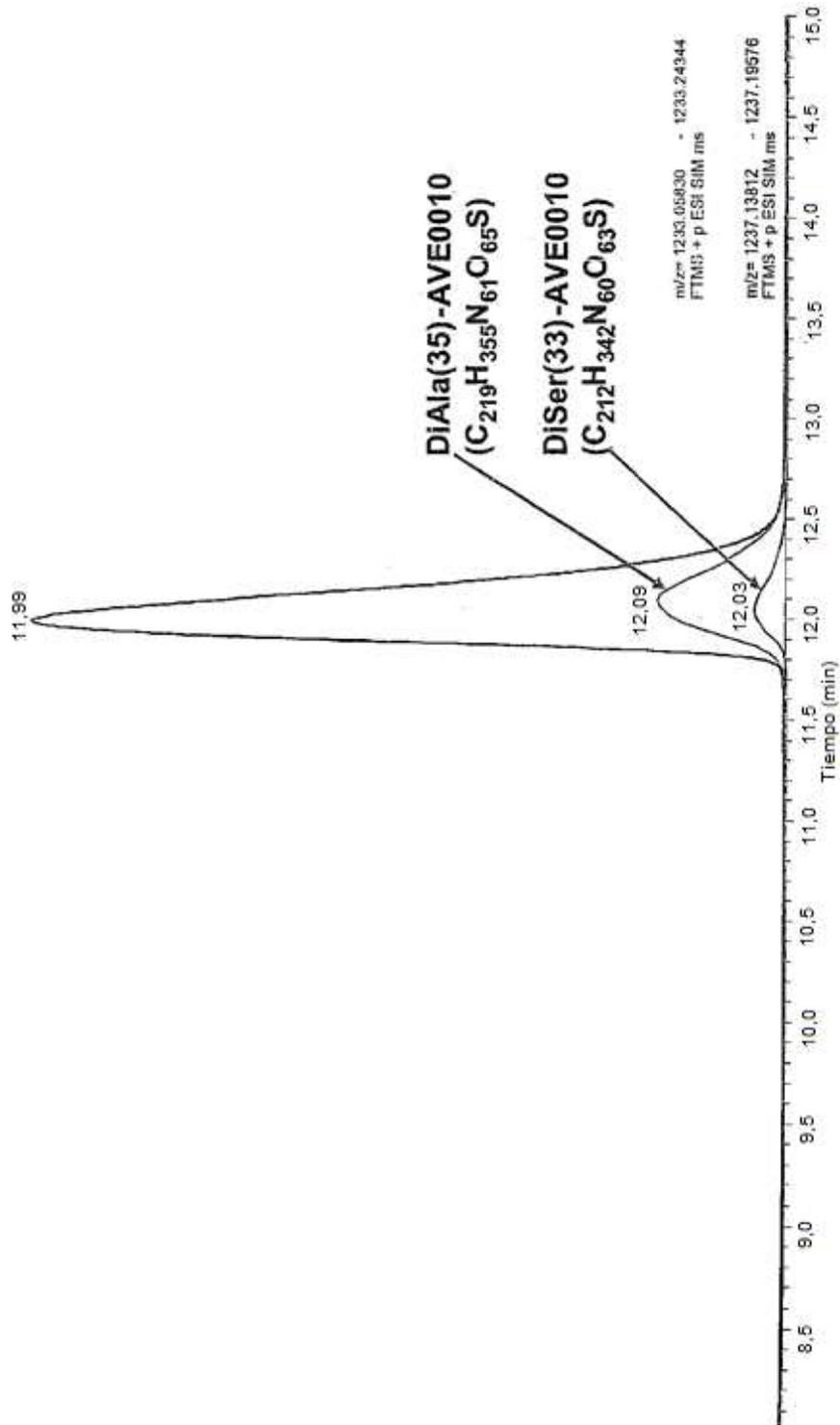
H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-A-P-

P-S-K-K-K-K-K-NH₂.

20 13. Un método para el control de la calidad de una composición que comprende un producto peptídico de exendina que comprende la secuencia de aminoácidos S-S-G-A, que comprende determinar cuantitativamente según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, la cantidad de al menos una impureza que es un péptido Di-Ser(33)-exendina y/o un péptido Di-Ala(35)-exendina y que difiere del producto peptídico deseado en un componente básico aminoacídico dimérico de Di-serina y/o Di-alanina en dicha composición.

25 14. Un método para el control de la calidad de una composición que comprende un producto de Lixisenatida (AVE0010), que comprende determinar cuantitativamente según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, la cantidad de al menos una impureza que es un Di-Ser(33)-AVE0010 y/o Di-Ala(35)-AVE0010 y que difiere del producto peptídico deseado en un componente básico aminoacídico dimérico de Di-serina y/o Di-alanina en dicha composición.

Figura 1



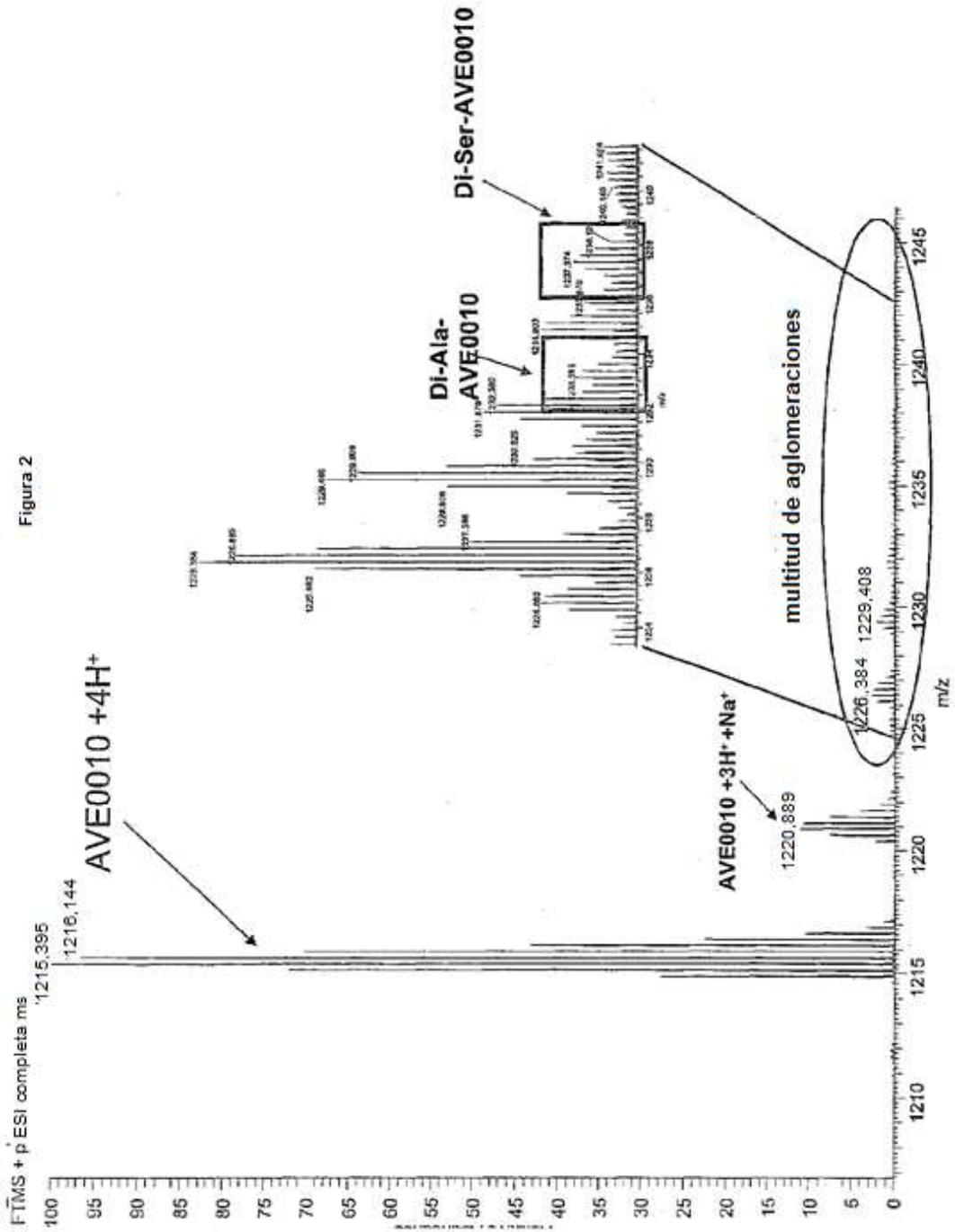


Figura 3

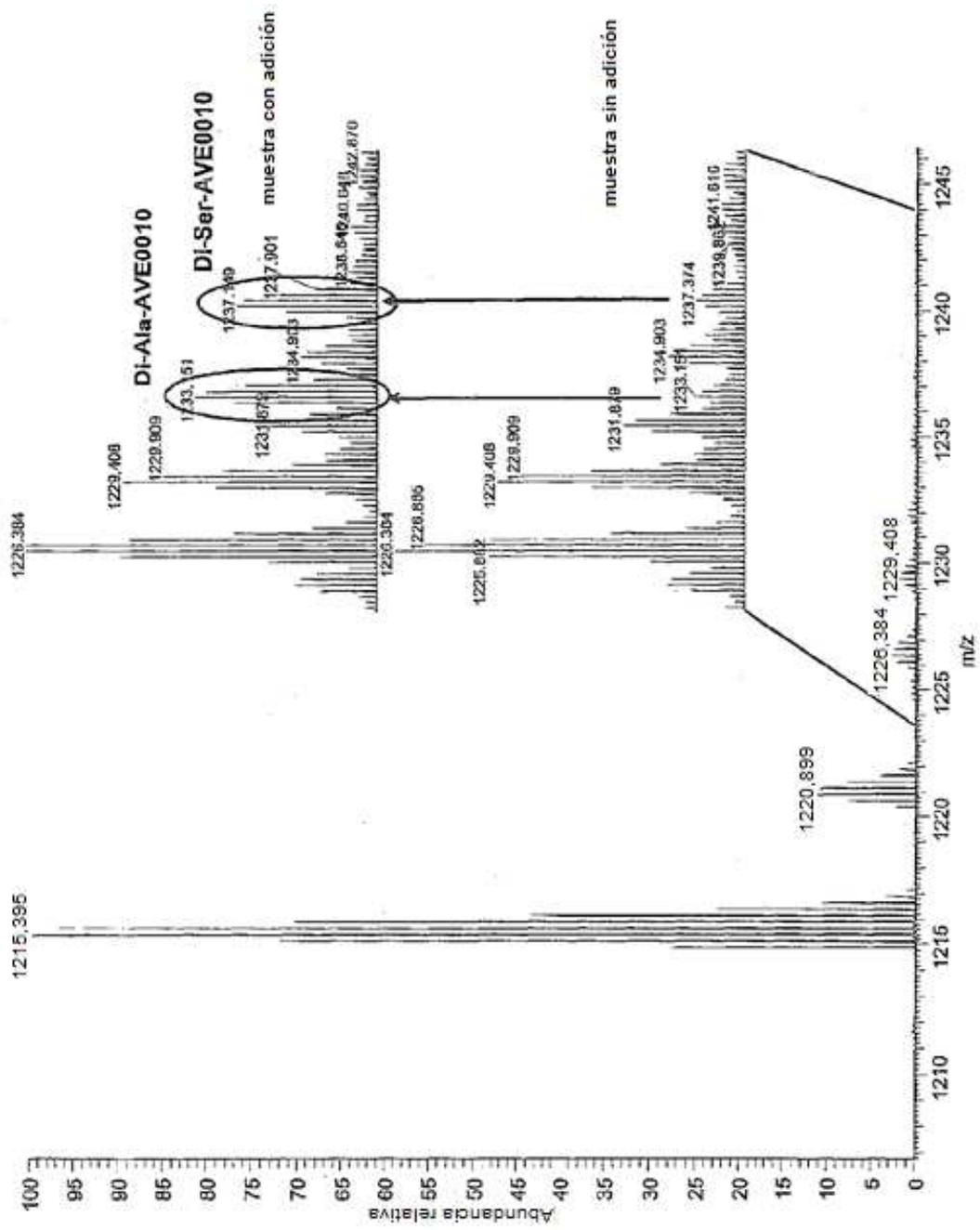


Figura 4

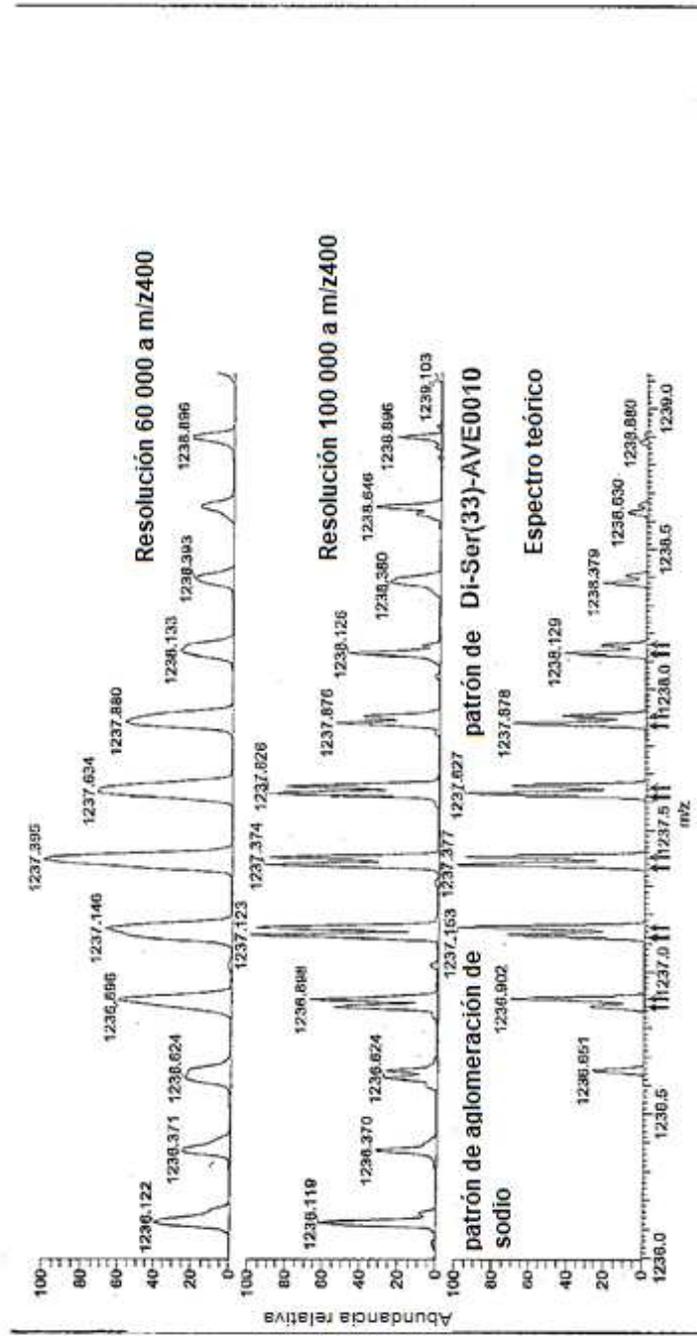


Figura 5

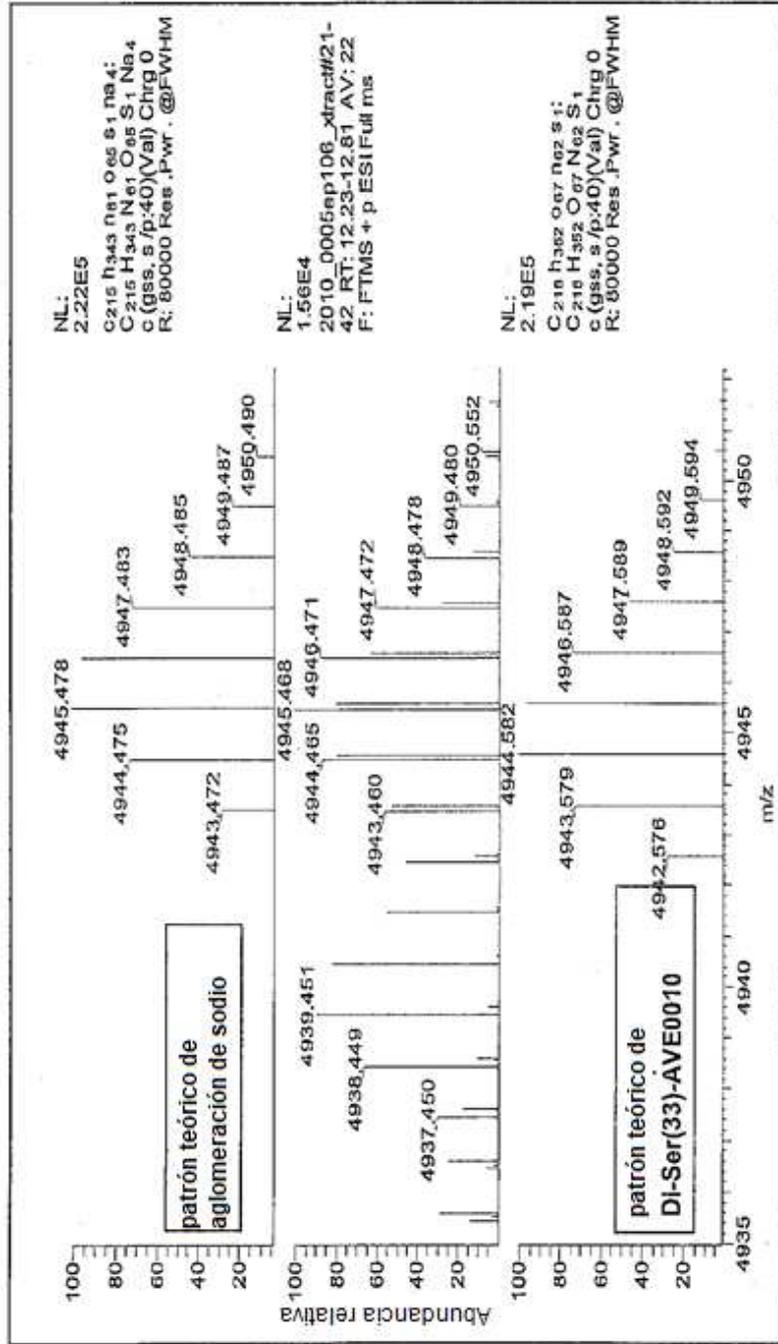
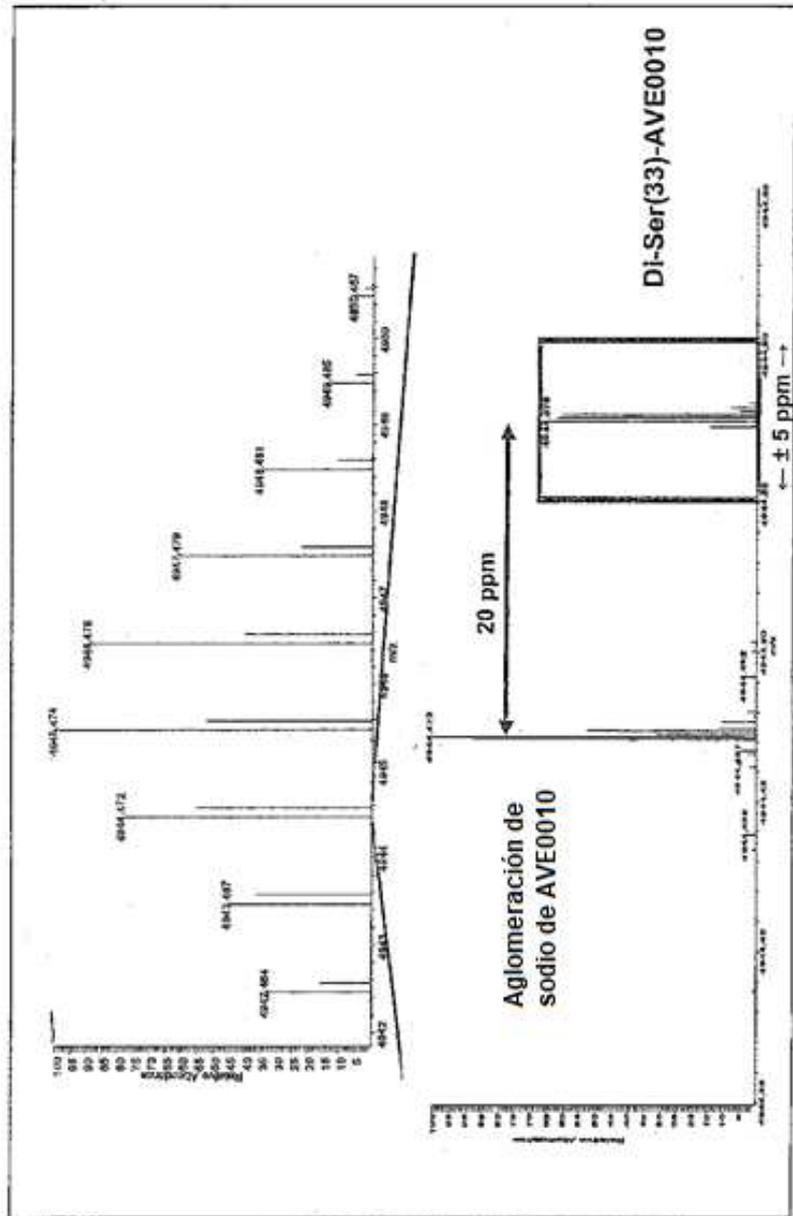
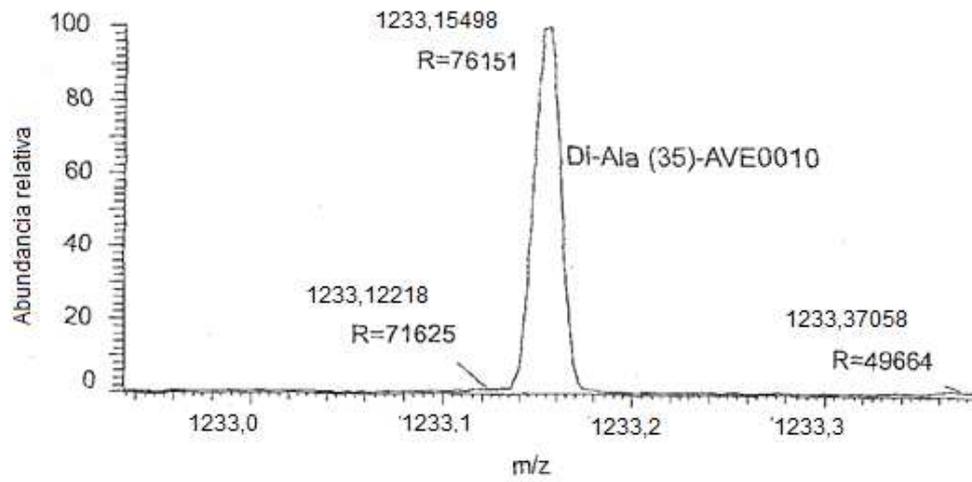
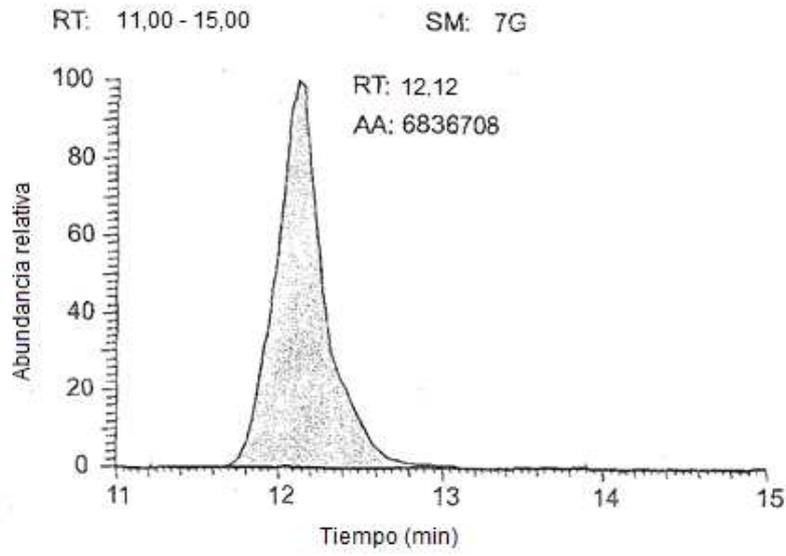
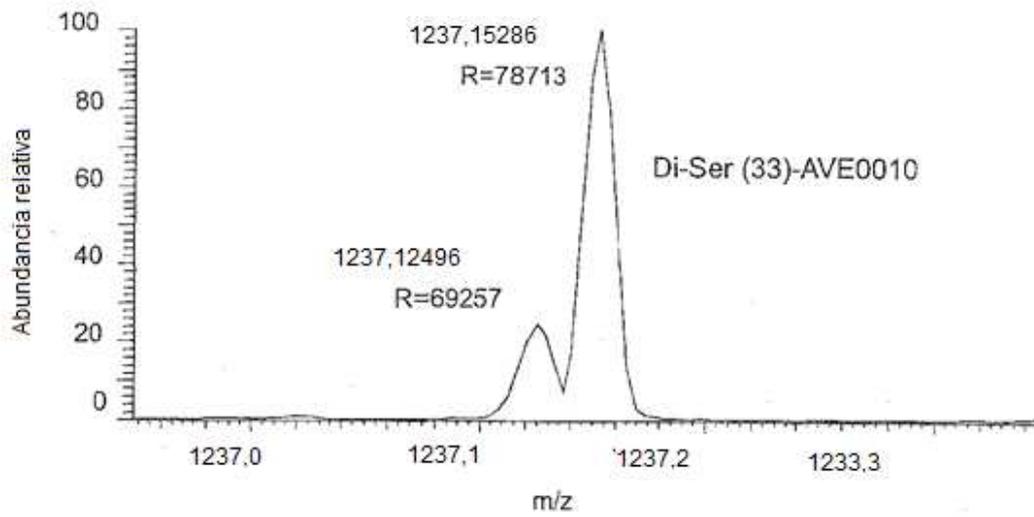
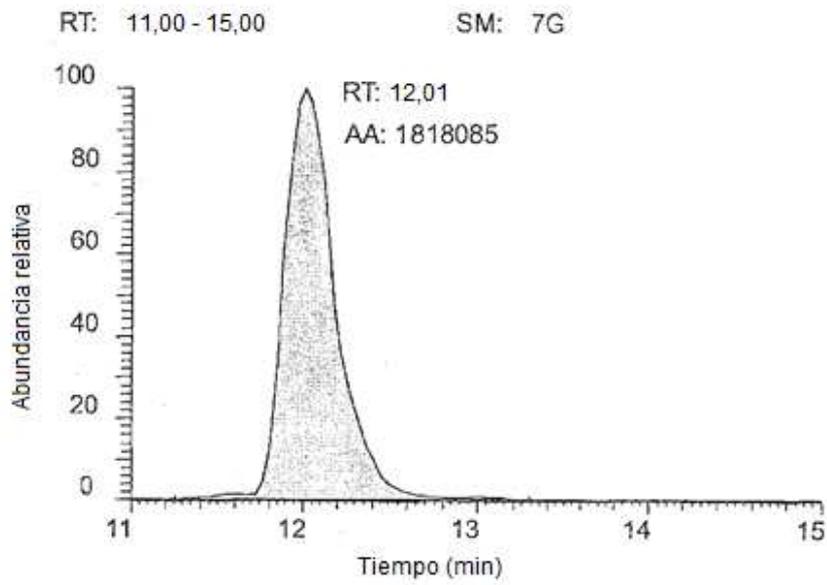


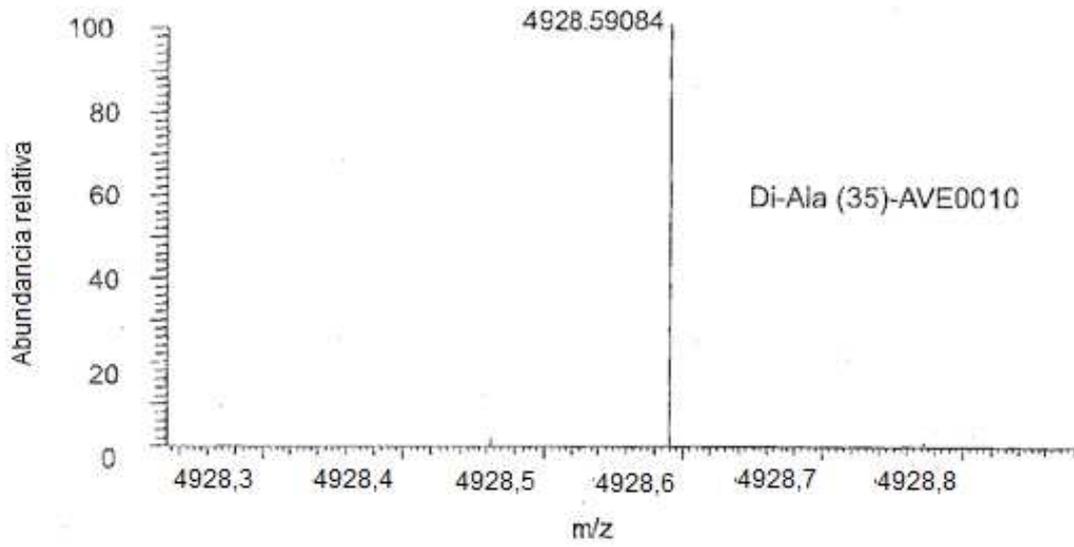
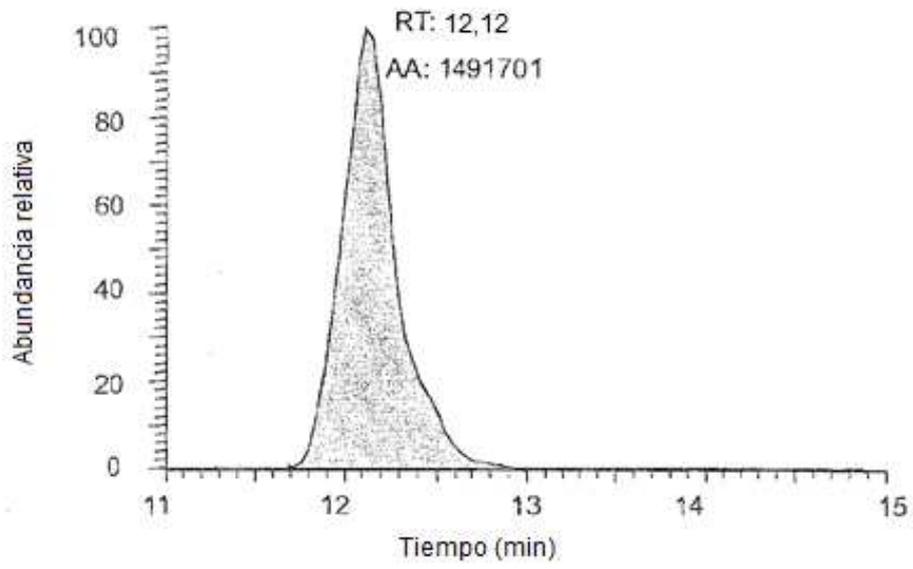
Figura 6







RT: 11,00 - 15,00 SM: 7G



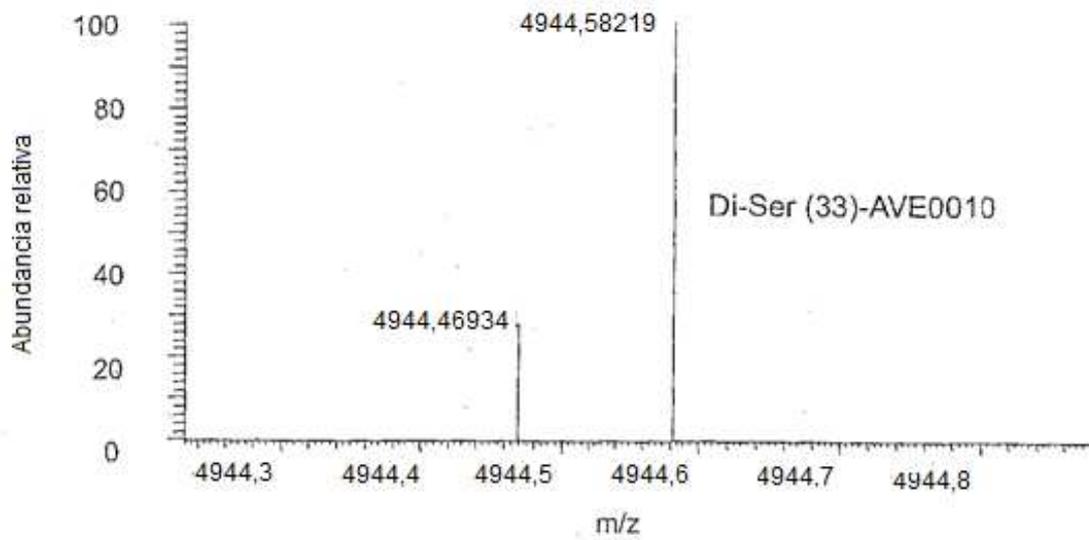
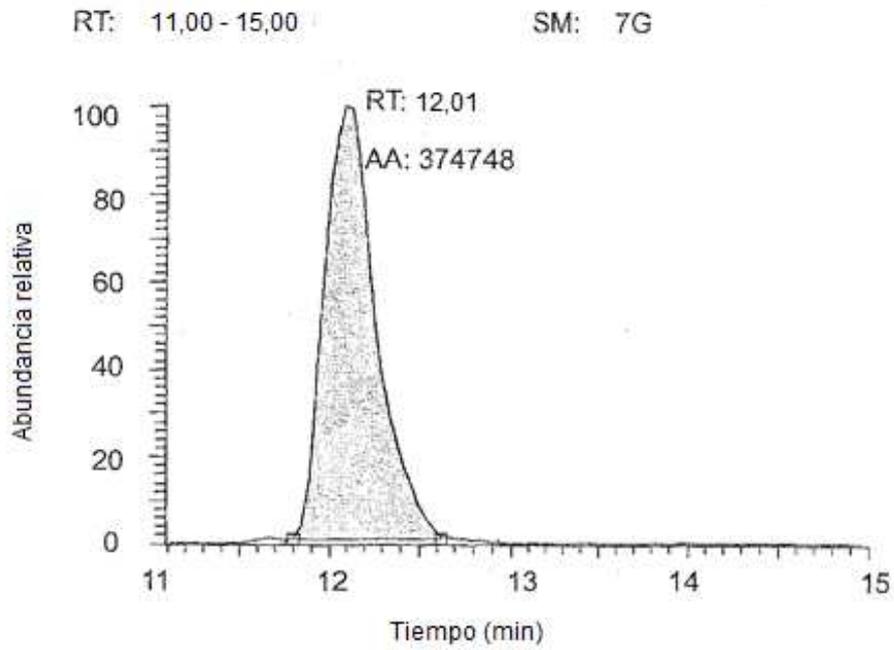


Figura 9

