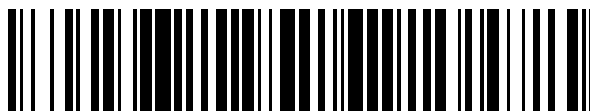


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 298**

51 Int. Cl.:
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C08G 69/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10150124 .5**
96 Fecha de presentación: **09.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **2177528**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de mezclas de acetato de trifluoroacetilglatirámero usando ácido bromhídrico purificado**

30 Prioridad:
09.09.2004 US 608843 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.06.2012

73 Titular/es:
**TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD.
5 BASEL STREET P.O. BOX 3190
49131 PETAH TIQVA, IL**

72 Inventor/es:
Dolitzky, Ben-Zion

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 382 298 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).

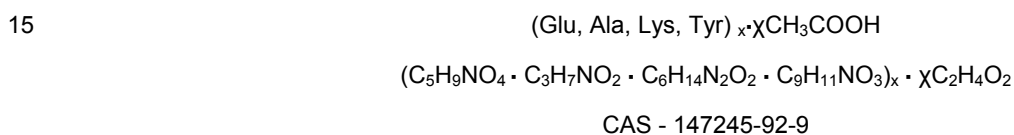
DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de mezclas de acetato de trifluoroacetilglatirámero usando ácido bromhídrico purificado.

5 A lo largo de esta solicitud se hace referencia a diversas publicaciones por sus citas completas. Las revelaciones de estas publicaciones en su totalidad se incorporan en esta solicitud por referencia con el fin de describir con más detalle el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

Antecedentes de la invención

10 Una mezcla de polipéptidos que no tienen todos la misma secuencia de aminoácidos referidos como acetato de glatirámero (GA) se comercializa con el nombre comercial Copaxona® y comprende las sales de acetato de polipéptidos que contienen ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina en fracciones molares promedio de 0,141, 0,427, 0,095 y 0,338, respectivamente. El peso molecular promedio de Copaxona® está entre 4.700 y 11.000 daltons. ("Copaxone", Physician's Desk Reference, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115). Químicamente, acetato de glatirámero se designa polímero de ácido L-glutámico con L-alanina, L-lisina, L-tirosina, acetato (sal). Su fórmula estructural es:



("Copaxone", Physician's Desk Reference, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115).

20 El acetato de glatirámero está aprobado para reducción de la frecuencia de recaídas en pacientes con esclerosis múltiple remitente que provoca recaídas. La esclerosis múltiple se ha clasificado como una enfermedad autoinmune. El acetato de glatirámero también se ha descrito para usar en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes (documento WO-A-2003040809), enfermedades no autoinmunes inflamatorias (Publicación N.º: US 2005/0014694 A1 por V. Wee Yong y cols., y Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º: 2002/0077278 A1, publicada el 20 de junio de 2002 (Young y cols.)) y para promover la regeneración neural y/o para evitar o inhibir degeneración secundaria que puede seguir a daño principal del sistema nervioso (Publicación N.º: US 2003/0004099 A1 por M. Eisenbach-Schwartz y cols., y Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º: 2002/0037848 A1, publicada el 28 de marzo de 2002 (Eisenbach-Schwartz)). Además, el acetato de glatirámero se ha revelado como un tratamiento para enfermedades mediadas por el sistema inmune (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º: 6.514.938 B1, publicada el 4 de febrero de 2003 (Gad y cols.); Publicación Internacional PCT N.º WO 01/60392, publicada el 23 de agosto de 2001 (Gilbert y cols.); y Publicación Internacional PCT N.º: WO 00/27417, publicada el 19 de mayo de 2000 (Aharoni y cols.), así como enfermedades asociadas con desmielinización (Publicación Internacional PCT N.º WO-1/97846, publicada el 27 de diciembre de 2001/(Moses y cols.). Otros documentos que hacen referencia a la preparación de glatirámero son los documentos WO-A-9632119 y WO-A-9531990.

35 El procedimiento de fabricación como se detalla en las patentes anteriores implica hacer reaccionar polipéptidos protegidos con ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético. (Patente de los Estados Unidos N.º: 5.800.808, concedida el 1 de septiembre de 1998 a Konfino y cols.). Esta reacción de desprotección elimina el grupo protector de bencilo en gamma del 5-carboxilato del residuo de glutamato y escinde el polímero a polipéptidos menores para formar un trifluoroacetilpolipéptido. (Patente de los Estados Unidos N.º: 5.800.808, concedida el 1 de septiembre de 1998 a Konfino y cols.). El tiempo necesario para obtener GA del peso molecular promedio apropiado de entre 7.000 ± 2.000 daltons depende de la temperatura de reacción y del perfil de peso molecular del acetato de glatirámero protegido. (Patente de los Estados Unidos N.º: 5.800.808, concedida el 1 de septiembre de 1998 a Konfino y cols.). La desprotección ocurre a una temperatura de entre 20 °C y 28 °C (Patente de los Estados Unidos N.º: 5.800.808, concedida el 1 de septiembre de 1998 a Konfino y cols.). Una prueba de la reacción se lleva a cabo en cada lote a diferentes periodos de tiempo para determinar el tiempo de reacción necesario a una temperatura dada para lograr trifluoroacetilpolipéptidos de un perfil de peso molecular apropiado. (Patente de los Estados Unidos N.º: 5.981.589, concedida el 9 de noviembre de 1999 a Konfino y cols.) La cantidad de tiempo necesaria para los intervalos de reacción, por ejemplo, entre 10 y 50 horas. (Patente de los Estados Unidos N.º: 5.800.808, concedida el 1 de septiembre de 1998 a Konfino y cols.). Además, las Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 5.981.589, 6.048.898, 6.054.430, 6.342.476, 6.362.161 y 6.620.847, también se refieren a composiciones y procedimientos para elaboración de mezclas de polipéptidos, incluyendo GA.

50 Esta invención proporciona un procedimiento de fabricación mejorado.

Sumario de la invención

55 La invención objeto proporciona un procedimiento para obtener una mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y trifluoroacetil-lisina, en el que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado y en el que durante el procedimiento un lote de una mezcla de polipéptidos, cada uno de los cuales consta de alanina, γ-bencilglutamato,

tirosina y trifluoroacetil-lisina se desprotege con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, comprendiendo la mejora el uso de una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, solución que comprende menos de 0,5 % de bromo libre.

5 La invención objeto también proporciona un procedimiento para obtener una mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y trifluoroacetil-lisina, en el que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado y en el que durante el procedimiento un lote de una mezcla de polipéptidos, cada uno de los cuales consta de alanina, γ -bencilglutamato, tirosina y trifluoroacetil-lisina se desprotege con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, comprendiendo la mejora el uso de una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, solución que comprende menos de 1000 ppm de impurezas iónicas metálicas.

10 La invención objeto proporciona además procedimiento de producir una mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y trifluoroacetil-lisina, en el que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado que comprende desproteger una mezcla de polipéptidos que consta cada uno de alanina, γ -bencilglutamato, tirosina y trifluoroacetil-lisina con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, solución que comprende menos de 0,5 % de bromo libre y menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos.

La presente invención también proporciona una composición que comprende el producto de trifluoroacetilo producido por uno cualquiera de los procedimientos de la invención objeto y un vehículo.

20 La invención objeto proporciona adicionalmente una mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y trifluoroacetil-lisina, en la que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado, no más de 0,1% de tirosina bromada y menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos. La invención objeto también proporciona una composición que comprende la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos y un vehículo.

25 La presente invención también proporciona procedimiento para obtener una composición farmacéutica que contiene una mezcla de polipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina y en el que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado, que comprende

- a) polimerizar N-carboxianhídridos de tirosina, alanina, γ -bencilglutamato y N- trifluoroacetil-lisina para formar una mezcla de polipéptidos protegidos;
- 30 b) desproteger los polipéptidos protegidos con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, la solución comprende menos de 0,5 % de bromo libre y menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos para formar una mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos;
- c) hacer reaccionar la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos con piperidina acuosa para formar una solución de mezcla acuosa de polipéptidos, cada uno de los cuales constade alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina; y
- 35 d) purificar la mezcla de polipéptidos.

La invención expuesta proporciona adicionalmente procedimiento de producir acetato de glatirámero, que comprende las etapas de:

- a) polimerizar N-carboxianhídridos de tirosina, alanina, γ -bencilglutamato y N-trifluoroacetil-lisina para formar acetato de glatirámero protegido;
- 40 b) desproteger acetato de glatirámero protegido con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, la solución comprende menos de 0,5 % de bromo libre y menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos, para formar acetato de trifluoroacetilglatirámero;
- c) hacer reaccionar acetato de trifluoroacetilglatirámero con piperidina acuosa para formar una solución de acetato de glatirámero; y
- 45 d) purificar el acetato de glatirámero.

La invención objeto proporciona adicionalmente un procedimiento para analizar el porcentaje de tirosina bromada en una muestra de acetato de glatirámero que comprende las etapas de:

- a) hidrolizar el acetato de glatirámero para obtener un hidrolizado;
- b) eluir el hidrolizado a través de una columna cromatográfica;
- 50 c) medir el nivel de bromotirosina en el hidrolizado;

- d) preparar soluciones de muestra de los componentes aminoacídicos de acetato de glatirámero y de bromotirosina;
- e) eluir las soluciones de muestra a través de la columna de la etapa b); y
- f) calcular el porcentaje de tirosina bromada en el acetato de glatirámero.

5 La invención objeto también proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que contiene una mezcla de polipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de ácido glutámico, alanina, tirosina y lisina, en el que la mezcla tiene un porcentaje predeterminado de tirosina bromada aceptable para la inclusión en una composición farmacéutica, que comprende obtener un lote de una mezcla de polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos no uniformes, donde cada polipéptido consta de ácido glutámico, alanina, tirosina y lisina;

10

medir el porcentaje de tirosina bromada del lote por un procedimiento que comprende

- a) hidrolizar el lote para obtener un hidrolizado;
- b) eluir los hidrolizados a través de una columna cromatográfica;
- c) medir el nivel de bromotirosina en el hidrolizado;

15

- d) preparar soluciones de muestra de los componentes aminoacídicos del lote y de bromotirosina;
- e) eluir las soluciones de muestra a través de la columna de la etapa b); y
- f) calcular el porcentaje de la tirosina bromada en el lote; e

incluir en la composición farmacéutica un lote sólo si su porcentaje de tirosina bromada así medido es menor de 0,3 %.

Descripción detallada de la invención

20 La invención objeto proporciona un procedimiento para obtener una mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y trifluoroacetil-lisina, en el que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado y en el que durante el procedimiento un lote de una mezcla de polipéptidos, cada uno de los cuales consta de alanina, γ -bencilglutamato, tirosina y trifluoroacetil-lisina se desprotege con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, comprendiendo la mejora el uso de una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, solución que comprende menos de 0,5 % de bromo libre.

25

En una realización, la mejora comprende adicionalmente el uso de una solución de ácido bromhídrico en ácido acético que comprende menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos.

30 La invención objeto proporciona adicionalmente un procedimiento para obtener una mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y trifluoroacetil-lisina, en el que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado y en el que durante el procedimiento un lote de una mezcla de polipéptidos, cada uno de los cuales consta de alanina, γ -bencilglutamato, tirosina y trifluoroacetil-lisina se desprotege con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, comprendiendola mejora el uso de una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, solución que comprende menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos.

35

La invención objeto proporciona todavía adicionalmente un procedimiento de producir una mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y trifluoroacetil-lisina, en el que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado que comprende desproteger una mezcla de polipéptidos que consta cada uno de alanina, γ -bencilglutamato, tirosina y trifluoroacetil-lisina con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, solución que comprende menos de 0,5 % de bromo libre y menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos.

40

En una realización, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 0,1 % de bromo libre.

En otra realización, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 0,05 % de bromo libre.

45

En una realización adicional, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 0,01 % de bromo libre.

En todavía otra realización, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 0,001 % de bromo libre.

En una realización adicional, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético está exenta de bromo libre.

- En otra realización, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos.
- En todavía otra realización, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 500 ppm de impurezas de iones metálicos.
- 5 En una realización, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 100 ppm de impurezas de iones metálicos.
- En otra realización, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 30 ppm de impurezas de iones metálicos.
- 10 En todavía otra realización, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 20 ppm de impurezas de iones metálicos.
- En una realización adicional, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 10 ppm de impurezas de iones metálicos.
- En otra realización, la solución de ácido bromhídrico en ácido acético está exenta de impurezas de iones metálicos.
- En todavía otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos es acetato de trifluoroacetilglatirámico ("TFA-GA").
- 15 En una realización, el ácido bromhídrico en solución de ácido acético es desde el 10 % hasta el 36 % de ácido bromhídrico en ácido acético. En otra realización, el ácido bromhídrico en ácido acético es desde ácido bromhídrico al 16 % hasta ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 18 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 20 % a ácido bromhídrico al 37 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 20 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 22 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 24 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 25 % a ácido bromhídrico al 35 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 26 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 28 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 30 % a ácido bromhídrico al 34 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 30 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; o ácido bromhídrico al 32 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético. En una realización adicional, la solución es ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético.
- 20 En otra realización, la solución es ácido bromhídrico al 16 % en ácido acético.
- 25 En otra realización, la solución se trata previamente con un aceptor de bromo, con el fin de eliminar bromo libre.
- En una realización, el aceptor de bromo es fenol.
- En una realización adicional, la solución se produce en un reactor no metálico.
- En otra realización, la solución se prepara en un reactor esmaltado o en un reactor revestido de teflón.
- 30 En todavía otra realización, el color del ácido bromhídrico en solución de ácido acético es menor de 2000 APHA.
- En una realización adicional, el color del ácido bromhídrico en solución de ácido acético es menor de 1000 APHA.
- En otra realización, el color del ácido bromhídrico en solución de ácido acético es menor de 700 APHA.
- En todavía otra realización, el color del ácido bromhídrico en solución de ácido acético es menor de 500 APHA.
- 35 La invención objeto también proporciona un producto de trifluoroacetilo producido por uno cualquiera de los procedimientos revelados.
- La invención objeto proporciona adicionalmente una composición que comprende el producto de trifluoroacetilo producido por uno cualquiera de los procedimientos revelados y un vehículo.
- La invención objeto proporciona adicionalmente una mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y trifluoroacetil-lisina, en la que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado, no más de 0,1% de tirosina bromada y menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos.
- 40 En una realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos tiene un peso molecular promedio desde 2.000 daltons hasta 40.000 daltons.
- 45 En otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos tiene un peso molecular promedio desde 4.000 daltons hasta 18.000 daltons.
- En una realización adicional, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos tiene un peso molecular promedio desde 4.000 daltons hasta 13.000 daltons.

En otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos tiene un peso molecular promedio desde 13.000 daltons hasta 19.000 daltons. En todavía otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos tiene un peso molecular promedio desde 13.500 daltons hasta 18.500 daltons.

5 En una realización adicional, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos tiene un peso molecular promedio de 7.000 ± 2.000 daltons.

En todavía otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos tiene un peso molecular promedio de 7.000 daltons.

En otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos tiene un peso molecular promedio de 14.000 daltons.

En todavía otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos tiene un peso molecular promedio desde 4.700 – 11.000 daltons.

10 En una realización adicional, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos comprende menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos.

En todavía otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos comprende menos de 500 ppm de impurezas de iones metálicos.

15 En una realización adicional, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos comprende menos de 100 ppm de impurezas de iones metálicos.

En otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos comprende menos de 30 ppm de impurezas de iones metálicos.

En una realización adicional, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos comprende menos de 20 ppm de impurezas de iones metálicos.

20 En otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos comprende menos de 10 ppm de impurezas de iones metálicos.

En todavía otra realización, la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos está exenta de impurezas de iones metálicos.

La invención objeto también proporciona una composición que comprende la mezcla de trifluoroacetilpolipéptidos y un vehículo.

25 La invención objeto proporciona adicionalmente un procedimiento para obtener una composición farmacéutica que contiene una mezcla de polipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina y en el que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado, que comprende

30 a) polimerizar N-carboxianhídridos de tirosina, alanina, γ -benzilglutamato y N- trifluoroacetil-lisina para formar una mezcla acuosa de polipéptidos protegidos;

b) desproteger los polipéptidos protegidos con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, solución que comprende menos de 0,5 % de bromo libre y menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos, para formar una mezcla acuosa de trifluoroacetilpolipéptidos;

35 c) hacer reaccionar la mezcla acuosa de trifluoroacetilpolipéptidos con piperidina acuosa para formar una solución de mezcla acuosa de polipéptidos, cada uno de los cuales consta de alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina; y

d) purificar la mezcla acuosa de polipéptidos.

40 En una realización, la fracción molar promedio en la mezcla es el ácido glutámico 0,129-0,159; alanina 0,392-0,462; tirosina 0,086-0,100; y lisina 0,300-0,374. En una realización específica, la fracción molar promedio en la mezcla de ácido glutámico es 0,141, de alanina es 0,427, de tirosina es 0,093 y de lisina es 0,337.

La invención objeto también proporciona un procedimiento de producir acetato de glatirámero que comprende las etapas de:

a) polimerizar N-carboxianhídridos de tirosina, alanina, γ -bencilglutamato y N-trifluoroacetil-lisina para formar acetato de glatirámero protegido;

45 b) desproteger acetato de glatirámero protegido con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, la solución comprende menos de 0,5 % de bromo libre y menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos, para formar acetato de trifluoroacetilglatirámero;

- c) hacer reaccionar acetato de trifluoroacetilglatirámero con piperidina acuosa para formar una solución de acetato de glatirámero; y
- d) purificar el acetato de glatirámero.

5 En una realización, el producto de la etapa d) se somete adicionalmente a ultrafiltración para eliminar las especies polipeptídicas con peso molecular menor de 5.000 daltons.

10 En una realización, el ácido bromhídrico en solución de ácido acético es desde el 10 % hasta el 36 % de ácido bromhídrico en ácido acético. En otra realización, el ácido bromhídrico en ácido acético es desde ácido bromhídrico al 16 % hasta ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 18 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 20 % a ácido bromhídrico al 37 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 20 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 22 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 24 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 25 % a ácido bromhídrico al 35 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 26 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 28 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 30 % a ácido bromhídrico al 34 % en ácido acético; ácido bromhídrico al 30 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético, o ácido bromhídrico al 32 % a ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético. En una realización adicional, la solución es ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético. En otra realización, la solución es ácido bromhídrico al 16 % en ácido acético.

15 En otra realización, el ácido bromhídrico en solución de ácido acético se trata previamente con un aceptor de bromo con el fin de eliminar el bromo libre.

En todavía otra realización, el aceptor de bromo es fenol.

20 En una realización adicional, el ácido bromhídrico en solución de ácido acético se produce en un reactor no metálico.

En otra realización, el ácido bromhídrico en solución de ácido acético se prepara en un reactor esmaltado o revestido de teflón.

En una realización, el color del ácido bromhídrico en solución de ácido acético es menor de 2000 APHA.

En otra realización, el color del ácido bromhídrico en solución de ácido acético es menor de 1000 APHA.

25 En todavía otra realización, el color del ácido bromhídrico en solución de ácido acético es menor de 700 APHA.

En una realización adicional, el color del ácido bromhídrico en solución de ácido acético es menor de 500 APHA.

La invención objeto proporciona adicionalmente procedimiento de analizar el porcentaje tirosina bromada en una muestra de acetato de glatirámero que comprende las etapas de:

- a) hidrolizar el acetato de glatirámero para obtener un hidrolizado;
- 30 b) eluir el hidrolizado a través de una columna cromatográfica;
- c) medir el nivel de bromotirosina en el hidrolizado;
- d) preparar soluciones de muestra de los componentes aminoacídicos de acetato de glatirámero y de bromotirosina;
- e) eluir las soluciones de muestra a través de la columna de la etapa b); y
- 35 f) calcular el porcentaje de tirosina bromada en el acetato de glatirámero.

40 La invención objeto también proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que contiene una mezcla de polipéptidos que no todos tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consiste en ácido glutámico, alanina, tirosina y lisina, en el que la mezcla tiene un porcentaje predeterminado de tirosina bromada aceptable para la inclusión en una composición farmacéutica, que comprende obtener un lote de una mezcla de polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos no uniformes, donde cada polipéptido consta de ácido glutámico, alanina, tirosina y lisina;

medir el porcentaje de tirosina bromada del lote por un procedimiento que comprende

- a) hidrolizar el lote para obtener un hidrolizado;
- b) eluir el hidrolizado a través de una columna cromatográfica;
- 45 c) medir el nivel de bromotirosina en el hidrolizado;
- d) preparar soluciones de muestra de los componentes aminoacídicos del lote y de bromotirosina;

- e) eluir las soluciones de muestra a través de la columna de la etapa b); y
 f) calcular el porcentaje de tirosina bromada en el lote; e

incluir en la composición farmacéutica un lote sólo si su porcentaje de tirosina bromada así medido es menor del 0,3 %.

5 En una realización, el lote es aceptable para inclusión en la composición farmacéutica sólo si su porcentaje de tirosina bromada así medido es menor del 0,2 %.

En otra realización, el lote es aceptable para inclusión en la composición farmacéutica sólo si su porcentaje de tirosina bromada así medido es menor del 0,1 %.

En una realización adicional, la mezcla de polipéptidos es el acetato de glatirámico ("GA").

Términos

10 El término "peso molecular promedio" como se usa en esta solicitud quiere decir el peso molecular de las especies de polipéptidos presentes en la mezcla en la proporción relativa más alta (es decir, el pico máximo) cuando la mezcla se somete a separación por peso molecular en una columna de permeación de gel de HPLC. Este valor se puede obtener en varias maneras, por ejemplo, a partir del tiempo de retención en una columna calibrada; o a partir de una correlación entre la localización del pico y la localización de los marcadores de copolímeros cromatografiados de forma conjunta
 15 de secuencia definida y de peso molecular definido. Otros procedimientos de determinar un peso molecular promedio tales como por dispersión de la luz se pueden emplear y corresponderán sustancialmente al valor obtenido a partir del pico máximo.

Una mezcla de polipéptidos de acuerdo con esta invención como se ejemplifica es la sal de acetato de polipéptidos sintéticos preparada haciendo reaccionar químicamente cuatro derivados aminoacídicos activados (dos de ellos ácido
 20 L-glutámico y L-lisina protegidos): ácido L-glutámico (L-Glu), L-alanina (L-Ala), L-tirosina (L-Tyr) y L-lisina (L-Lys) (dos de ellos protegidos es decir derivado 5Bz-glutamato y derivado 6N-TFA-lisina) en un plazo especificado. El término "mezcla" como se usa en el presente documento se refiere generalmente a en la "mezcla de polipéptidos de la invención" que comprende ácido L-glutámico, L-alanina L-tirosina y L-lisina y ambos términos se desea que incluyan impurezas residuales en el proceso de elaboración.

25 El intervalo de fracción molar de cada residuo de aminoácido es: L-Glu 0,129-0,153, L-Ala 0,392-0,462, L-Tyr 0,086-0,100 y L-Lys 0,300-0,374.

Debido a que ninguna reacción va a finalización al 100 %, y aunque prácticamente todas las impurezas se eliminan, pueden quedar pequeñas cantidades. Tales impurezas pueden ser de los tres tipos siguientes:

30 • sustancias relacionadas con la estructura, que son residuos de aminoácidos protegidos tales como residuos de 5-Bz-glutamilo y/o N6-TFA-L-lisilo, que se originan de eliminación incompleta de los grupos protectores. Además, la mezcla polipeptídica de las moléculas de la invención puede contener residuos de L-tirosilo bromados, formados durante la producción debido a la presencia de bromo libre en el reactivo de HBr/ácido acético.

Las estructuras moleculares de las impurezas relacionadas con la estructura identificadas pueden derivarse de los monómeros que participan, es decir, materiales de partida.

35 Estas impurezas identificadas se cuantifican (después de conversión química) por comparación con los Estándares de Referencia específicos, que bien son derivados o bien son parte de las propias impurezas:

- Compuestos de trifluoroacetilo residuales (expresados como fluoruro)
- Residuos de glutamilo bencilado residuales (expresados como bromuro de bencilo)
- Residuos de tirosilo bromado residuales (expresados como bromotirosina)

40 • Sustancias relacionadas no identificadas (determinadas por RP-HPLC): estos son polipéptidos de tamaño molecular pequeño del mismo origen con estructuras similares. Estas sustancias tienen probablemente factores de respuesta similares y la concentración (%) de cada impureza se puede calcular como % de área de pico con relación a la mezcla polipeptídica del área de pico de la invención.

45 La caracterización de las impurezas se basa en su tiempo de retención cromatográfico relativo (RRT) en relación con el L-triptófano estándar.

• Disolventes residuales e impurezas inorgánicas abarcados en la memoria descriptiva tales como el disolvente residual 1,4-dioxano, la piperidina residual y los metales pesados.

Discusión

Bromo libre

5 En el procedimiento de elaboración de mezclas de los polipéptidos, tales como GA, se usa ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético para desproteger GA protegido. Por ejemplo, durante el desarrollo del procedimiento de producción de GA se encontró que se bromaron algunos de los residuos de tirosina en trifluoroacetil-GA (TFA GA) y en GA. Esta impureza se aisló e identificó usando un procedimiento analítico que se describe en detalle en los ejemplos. Se encontró que el residuo de tirosina reacciona con bromo para formar un resto de monobromotirosina que comprende bien 2-bromotirosina o bien 3-bromotirosina.

10 Después de mucha investigación los inventores descubrieron que la impureza de tirosina bromada se introdujo en el GA a través de bromo libre en HBr/ácido acético. El bromo libre estuvo presente en HBr al 33 %/ácido acético adquirido a un suministrador y usado en el procedimiento de producción.

Se tomaron medidas con el fin de disminuir el nivel de bromo libre en HBr al 33 %/ácido acético. Por ejemplo, el pretratamiento de HBr/ácido acético con un aceptor de bromo fue eficaz para eliminar parte del bromo libre de la solución de HBr/ácido acético.

15 Uno de los aceptores de bromo usado en el procedimiento de purificación de HBr fue fenol. Además de fenol, se pueden usar otros agentes reductores, tales como bisulfito de sodio. Se eligió fenol como aceptor de bromo debido a que él y su producto de reacción con bromo (bromofenoles) son ambos no reactivos con polipéptidos protegidos, tales como GA protegido, TFA-polipéptidos, tales como TFA-GA y polipéptidos, tales como GA y son fáciles de eliminar de la solución de GA durante el procedimiento de purificación. De forma similar, cualquier agente de aceptación de bromo se puede usar siempre y cuando él y su producto de reacción con bromo no sean reactivos con polipéptidos protegidos, tales como GA protegido, TFA-polipéptidos, tales como TFA-GA y polipéptidos, tales como GA y sean fáciles de eliminar de la solución de GA durante el procedimiento de purificación final.

Impurezas metálicas

25 GA se comercializa en dos formas de dosificación farmacéuticas, polvo liofilizado y jeringuillas precargadas. Las jeringuillas comercializadas con el nombre comercial Inyección de Copaxona®, contenían generalmente solución transparente. Las instrucciones de almacenamiento fueron guardar las jeringuillas refrigeradas. Sin embargo, se detectó color rojo en soluciones acuosas de soluciones precargadas de Copaxona®. La fuente del color en las soluciones era desconocida.

El color apareció cuando las soluciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante 12 a 24 horas.

30 Se determinó que la producción de HBr en aparatos metálicos condujo a impurezas de iones metálicos traza en el HBr. Cuando HBr se mezcló posteriormente con GA protegido, las impurezas de iones metálicos en el HBr se quelaron por TFA-GA y GA. Estos complejos de TFA-GA y GA/metales contribuyeron a la coloración.

35 Como resultado, otra medida tomada para asegurar pureza, por ejemplo, en el producto GA, fue el uso de un reactor no metálico para la producción de solución de HBr al 33%/ácido acético. El reactor usado para la producción de solución de HBr/ácido acético se esmaltó con el fin de evitar la formación de impurezas que podrían afectar a la pureza de, por ejemplo, el GA. Con el fin de evitar el contacto de solución de HBr con metal, se revistieron con teflón partes de los conductos usados. De forma similar, otros tipos de aparatos no reactivos, no metálicos resistentes a ácidos se pueden usar para evitar la formación de iones metálicos traza en la solución de HBr/ácido acético. El uso de un aparato no metálico para la producción de solución de HBr/ácido acético fue exitoso en eliminar el color de rojo del GA. Cuando el aparato no metálico se usó para la producción de la solución de HBr/ácido acético, el resultado fue que la solución se liberó de iones metálicos y el GA rojo no se formó.

45 Además, el color de cada lote de HBr/ácido acético se mide para determinar el nivel de impurezas antes de que se use para desproteger GA protegido. Se encontró que los niveles de impurezas iónicas metálicas en la solución de HBr se pudieron determinar por análisis visual. Una solución de HBr con un color por debajo de 2.000 APHA se mostró que producía acetato de glatirámico sin color rojo.

La invención se ejemplificará pero no estará limitada por los siguientes ejemplos.

Detalles experimentales

Ejemplo 1 - Influencia de la concentración de bromo en HBr/ácido acético sobre resto de tirosina bromada en TFA-GA y en GA

50 Con el fin de determinar el efecto del bromo libre en el ácido bromhídrico/ácido acético sobre el nivel de impureza de restos de tirosina bromada en TFA-GA y en GA, se contaminó ácido bromhídrico en ácido acético con diversas cantidades de bromo. En el experimento, HBr que no estaba pretratado con aceptor de bromo se usó en el procedimiento de fabricación. Se añadieron diversos niveles de impureza de bromo (medidos según porcentaje de solución de HBr/ácido acético). El nivel de la impureza del resto de tirosina bromada en TFA-GA y en GA se midió

hidrolizando TFA-GA y GA a sus componentes aminoácidos y después usando HPLC determinando la cantidad de bromotirosina en relación con el TFA-GA y el GA.

Procedimiento

Preparación de soluciones estándar

- 5 Se prepararon soluciones estándar que contienen bromotirosina a 2 µg/ml usando agua destilada. La solución madre estándar de aminoácidos se preparó usando los siguientes aminoácidos:

L-Glu	Aproximadamente 100 mg
L-Ala	Aproximadamente 130 mg
L-Tyr	Aproximadamente 75 mg
L- Lys HCl	Aproximadamente 200 mg

Los aminoácidos se disolvieron en agua. Se añadieron unas pocas gotas de NaOH 5 N y se añadió agua a un volumen final de 25 ml.

10 **Hidrólisis**

10 mg de acetato de glatirámero y 10 mg de TFA-GA se pesaron independientemente cada uno en viales de hidrólisis de 5 ml. Se preparó un vial de control negativo añadiendo 0,5 ml de la solución de reserva estándar de aminoácidos a un vial de hidrólisis de 5 ml. Se añadieron 0,5 ml de agua y 0,5 ml de HCl concentrado conteniendo 1 % de fenol a cada uno de los viales. Los viales se calentaron a 110 °C durante 24 horas, en atmósfera de N₂. Las muestras se enfriaron después a temperatura ambiente. Cada uno de los hidrolizados se transfirió a matraces volumétricos de 5 ml y se cargó hasta el volumen con agua destilada.

- 15

Cromatografía

La bromotirosina estándar, y cada uno de los hidrolizados, se eluyeron independientemente a través de una columna de HPLC usando un eluyente de acetonitrilo: agua: ácido acético en una proporción de 4 : 95 : 1. La columna se equipó con un detector de UV y sistema de registro de datos. El aminoácido estándar se usa como un control negativo determinando qué pico en el hidrolizado de acetato de glatirámero corresponde a bromotirosina.

- 20

Análisis de los datos

El porcentaje de resto de tirosina bromada en cada muestra de TFA-GA y en cada muestra de GA se calculó como sigue: ■

- 25 P = pureza de bromotirosina estándar (en porcentaje)

As = área de pico estándar de bromotirosina

Ap = área de pico de bromotirosina en cada muestra

Cs = concentración de bromotirosina estándar (µg/ml)

Cp = concentración de acetato de glatirámero (o de TFA-GA)

- 30 % de tirosina bromada =

$$P * \frac{A_p}{A_s} * \frac{C_s}{C_p}$$

La tabla 1 muestra el efecto de bromo libre sobre el nivel de resto de tirosina bromada en TFA-acetato de glatirámero y en acetato de glatirámero.

Tabla 1. Efecto de bromo libre sobre el nivel de resto de tirosina bromada

Bromo (en %)	Tirosina bromada (en %)	
	TFA-Glatirámero	Acetato de glatirámero
Sin adición de bromo	0,1	0,2
0,5	0,7	1,2
1	1,2	2,2
5	4	Sin datos

Resultados

A partir del ejemplo anterior se puede ver que la contaminación de HBr con bromo conduce a niveles más altos de resto de tirosina bromada en TFA-GA y en GA, en relación a la reacción estándar en la que no se añadió nada de bromo. Cuando no se añadió nada de bromo, dado que el HBr no se trató con un aceptor de bromo, aún estuvo disponible algo de bromo libre y aún fue evidente contaminación de restos de tirosina bromada de GA y de TFA-GA.

Con el fin de producir GA con impureza de restos de tirosina bromada a un nivel menor de 0,2 %, el nivel de bromo libre en HBr debe disminuirse por la adición de un aceptor de bromo.

Ejemplo 2 - Producción de HBr al 33 % en solución de ácido acético

El reactor esmaltado se aclaró con ácido acético, después se vació. Se añaden dentro del reactor 1013 kg de ácido acético. El ácido acético se mantiene a una temperatura de 10-20 °C. Se introducen 522 kg de gas de HBr dentro del reactor mezclando mientras la solución. Después de que se introduce el gas, la solución se mezcla durante 30 minutos adicionales. La solución se puso a prueba determinando si el contenido de HBr es el 33 %.

Ejemplo 3 - Purificación de solución de HBr/ácido acético usando fenol como aceptor de bromo

Una solución de HBr al 33 % en ácido acético se vertió en un reactor esmaltado. Se pesó fenol y se añadió a la solución de HBr en una proporción en peso de 1 a 100. La solución se agitó después durante 12 a 24 horas. La solución de HBr purificada se añadió después a acetato de glatirámero protegido. La reacción del HBr con GA protegido forma TFA-GA. El TFA-GA se hace reaccionar con piperidina formando GA.

Ejemplo 4 - Niveles de tirosina bromada en diversos lotes

El nivel del resto de tirosina bromada en diversos lotes de acetato de glatirámero se midió usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

Procedimiento de producción	Número de lote de GA	Concentración de restos de tirosina bromada
PROCEDIMIENTO ANTIGUO	A	0,15
	B	0,19
	C	0,14
	D	0,15
	E	0,32
PROCEDIMIENTO NUEVO	X	Nada detectable.
	Y	Nada detectable.
	Z	Nada detectable.

Resultados

El HBr producido usando el procedimiento nuevo, según se describía en el ejemplo 2 y tratado con fenol como en el ejemplo 3, estaba libre de bromo y de impurezas metálicas. Por lo tanto, el acetato de glatirámero que se produjo estaba sustancialmente libre de resto de tirosina bromada.

El HBr que se compró de proveedores externos (procedimiento antiguo) tenía impurezas, y por lo tanto, el acetato de glatirámero producido usándolo tuvo también impurezas de restos de tirosina bromada, a pesar de que se usó fenol como aceptor de tirosina.

Ejemplo 5 - Determinación de color

El color de la solución de HBr/ácido acético se determinó usando técnicas de determinación de color visuales estándar.

El índice de colores de la Asociación de Salud Pública Americana (APHA) es un índice de tonalidades amarillas de número único donde cada unidad de APHA está basada en una dilución de la solución madre de 500 ppm de platino-cobalto (PtCo). (HunterLab, APHA Background, Applications Note, [Insight on Color](http://www.hunterlab.com/appnotes/anli_96br2.pdf) 16-30 de noviembre de 1996, vol. 8, N.º: 16. disponible en http://www.hunterlab.com/appnotes/anli_96br2.pdf). La medición de APHA se determina por comparación visual de la solución con estándares de PtCo que contienen cantidades controladas de cloroplatinato de potasio y de cloruro de cobalto. Cada unidad numérica es el equivalente de 1 mg de platino por litro de solución (ppm). Los estándares y las medidas correspondientes se designan de acuerdo con su medida de ppm, es decir, el estándar de APHA N.º: 20 contiene 20 ppm de platino. Sociedad Americana de Química, General Directions

and Procedures: Measurement of Physical Properties *disponible en* http://pubs.acs.org/reagent_demo/sec_b002.html), el agua destilada tiene un valor de APHA de 0 y la solución madre tiene un valor de APHA de 500 ppm. (HunterLab, APHA Background, Applications Note, *Insight on Color*, 16-30 de noviembre de 1996, vol. 8, N.º: 16. *disponible en* http://www.hunterlab.com/appnotes/anll_96br2.pdf). La medición de APHA puede hacerse por diversos instrumentos bien conocidos en la técnica.

5

Se prepararon el estándar de color de APHA "500" y el estándar de color de APHA "1.000". El estándar de color de APHA "500" se preparó disolviendo 1,246 g de cloroplatinato de potasio, K_2PtCl_6 (equivalentes a 50 mg de platino metálico) y 1,00 g de cloruro de cobalto cristalizado, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (equivalentes a aproximadamente 250 mg de cobalto metálico) en agua destilada con 100 ml de HCl concentrado y se diluyó a 1000 ml con agua destilada.

10 El estándar de color de APHA "1000" se preparó disolviendo 2,492 g de cloroplatinato de potasio K_2PtCl_6 y 2,00 g de cloruro de cobalto $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ en agua destilada con 200 ml de HCl concentrado y se diluyó a 1000 ml con agua destilada.

Los siguientes lotes se produjeron usando un aparato no metálico según se describe previamente. Estas muestras se pusieron a prueba en su color visualmente frente a los estándares de color mirando tubos de Nessler de 100 ml verticalmente contra un fondo blanco.

15

Número de lote	Color (APHA)
M	<500
N	<500
P	700
Q	350
R	<300

El color de estos lotes de HBr/ácido acético indicó que estaban libres de bromo y de impurezas de iones metálicos. Debido a que el color fue menor de 2000 APHA, estos lotes se consideraron libres de impurezas de iones metálicos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para obtener una mezcla de acetato de trifluoroacetilglatirámero, en el que durante el procedimiento un lote de una mezcla de polipéptidos, cada uno de los cuales consta de alanina, γ -bencilglutamato, tirosina y trifluoroacetil-lisina se desprotege con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, comprendiendo la mejora el uso de una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, solución que comprende menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos y menos de 0,5 % de bromo libre.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 0,1 % de bromo libre, menos de 0,05 % de bromo libre, menos de 0,01 % de bromo libre, menos de 0,001 % de bromo libre, o está exenta de bromo libre.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la solución de ácido bromhídrico en ácido acético comprende menos de 500 ppm de impurezas de iones metálicos, menos de 100 ppm de impurezas de iones metálicos, menos de 10 ppm de impurezas de iones metálicos, o está exenta de impurezas de iones metálicos.
- 15 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la solución es ácido bromhídrico al 10-36 % en ácido acético.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la solución es ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende adicionalmente una etapa de tratamiento previo de la solución con un aceptor de bromo con el fin de eliminar el bromo libre.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el aceptor de bromo es fenol.
- 20 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la solución se produce en un reactor no metálico.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la solución se prepara en un reactor revestido de vidrio o revestido de politetrafluoroetileno.
- 25 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el color del ácido bromhídrico en solución de ácido acético es menor de 2000 APHA, menor de 1000 APHA, menor de 700 APHA, o menor de 500 APHA.
11. Un producto de trifluoroacetilo producido por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Una composición que comprende el producto de trifluoroacetilo producido por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo.
- 30 13. Un procedimiento para analizar el porcentaje de tirosina bromada en una muestra de acetato de glatirámero que comprende las etapas de:
- a) hidrolizar el acetato de glatirámero para obtener un hidrolizado;
- b) eluir el hidrolizado a través de una columna cromatográfica;
- c) medir el nivel de bromotirosina en el hidrolizado;
- 35 d) preparar soluciones de muestra de los componentes aminoacídicos de acetato de glatirámero y de bromotirosina;
- e) eluir las soluciones de muestra a través de la columna de la etapa b); y
- f) calcular el porcentaje de tirosina bromada en el acetato de glatirámero.