

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 706**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.1999 E 10171553 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2239269**

54 Título: **Polipéptidos relacionados con el copolímero 1 para su uso como marcadores de pesos moleculares y para uso terapéutico**

30 Prioridad:

25.09.1998 US 101693 P

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

21.06.2013

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.
(100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE,
P.O. BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**GAD, ALEXANDER y
LIS, DORA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 408 706 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

Polipéptidos relacionados con el copolímero 1 para su uso como marcadores de pesos moleculares y para uso terapéutico

Introducción

5 La presente invención proporciona marcadores de pesos moleculares para la determinación precisa del peso molecular del acetato de glatirámero, de terpolímeros y otros copolímeros. Los marcadores de pesos moleculares son polipéptidos que tienen pesos moleculares identificados entre aproximadamente 2000 Daltons y aproximadamente 40.000 Daltons, y una composición de aminoácidos que se corresponde con el acetato de glatirámero o con un copolímero relacionado. Los pesos moleculares identificados se proporcionan mediante polipéptidos que tienen secuencias definidas. Los marcadores de pesos moleculares que se corresponden con el acetato de glatirámero comprenden los aminoácidos alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina en relaciones molares específicas. Los marcadores de pesos moleculares correspondientes a terpolímeros relacionados comprenden tres de los cuatro aminoácidos. En una forma de realización preferida, el polipéptido tiene alanina en el extremo N-terminal y tirosina en la cuarta posición desde el extremo N-terminal. La presente invención proporciona adicionalmente una pluralidad de marcadores de pesos moleculares para la determinación del intervalo de pesos moleculares de una composición copolimérica. La pluralidad de marcadores de pesos moleculares idealmente presenta relaciones lineales entre la elipticidad molar y el peso molecular, o entre el tiempo de retención y el log del peso molecular.

10 Óptimamente, los polipéptidos demuestran actividad biológica similar al copolímero del que se derivan. Polipéptidos que tienen pesos moleculares definidos y composiciones de aminoácidos similares a acetato de glatirámero tienen óptimamente utilidad terapéutica para el tratamiento de estados y enfermedades inmunitarias.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades autoinmunitarias se producen cuando el sistema inmunitario de un organismo no puede reconocer algunos de los propios tejidos del organismo como "suyos" y los ataca como foráneos. Normalmente, se desarrolla autotolerancia de manera temprana por acontecimientos del desarrollo dentro del sistema inmunitario que impiden que las propias células T y células B del organismo reaccionen con los propios tejidos del organismo. Estas respuestas inmunitarias tempranas están mediadas por la unión de antígenos a moléculas del CMH y presentación a receptores de células T.

Este proceso de autotolerancia falla cuando se desarrollan enfermedades autoinmunitarias y los propios tejidos y proteínas del organismo se reconocen como "autoantígenos" y se atacan por el sistema inmunitario del organismo. Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmunitaria que se produce cuando el sistema inmunitario ataca la vaina de mielina, cuya función es aislar y proteger los nervios. Es una enfermedad progresiva caracterizada por desmielinización, seguido por pérdida de función motora y neuronal. También se cree que la artritis reumatoide ("AR") es una enfermedad autoinmunitaria que implica inflamación crónica de las articulaciones sinoviales e infiltración por células T activadas, macrófagos y células plasmáticas, conduciendo a una destrucción progresiva del cartilago articular. Es la forma más grave de enfermedad de las articulaciones. La naturaleza del/de los autoantígeno(s) atacado(s) en la artritis reumatoide se entiende escasamente, aunque el colágeno de tipo II es un candidato.

Se hereda una tendencia a desarrollar esclerosis múltiple y artritis reumatoide. Estas enfermedades se producen más frecuentemente en individuos que portan uno o más alelos de CMH de clase II característicos. Por ejemplo, la susceptibilidad heredada a la artritis reumatoide está fuertemente asociada con los alelos de CMH de clase II DRB1*0401, DRB1*0404, o DRB1*0405 o el DRB1*0101. Los antígenos de locus de histocompatibilidad (HLA) se encuentran en la superficie de las células y ayudan a determinar la individualidad de tejidos de diferentes personas. Los genes para los antígenos de locus de histocompatibilidad están ubicados en la misma región del cromosoma 6 que el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La región del CMH expresa varias clases distintivas de moléculas en diversas células del cuerpo, siendo los genes, en orden de secuencia a lo largo del cromosoma, los genes de CMH de clase I, II y III. Los genes de clase I consisten en genes de HLA, que se subdividen adicionalmente en las subregiones A, B y C. Los genes de clase II se subdividen en las subregiones DR, DQ y DP. Las moléculas CMH-DR son las mejor conocidas; éstas se producen en las superficies de células presentadoras de antígenos tales como macrófagos, células dendríticas de tejido linfático y células epidérmicas. Los productos de CMH de clase III se expresan en diversos componentes del sistema del complemento, así como en algunas células no relacionadas con el sistema inmunitario.

Se han desarrollado varios agentes terapéuticos para tratar enfermedades autoinmunitarias, incluyendo fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, por ejemplo, metotrexato; diversos interferones; y determinados inhibidores de la síntesis de prostaglandinas. Sin embargo, estos agentes pueden ser tóxicos cuando se usan durante periodos de tiempo más que cortos o provocan efectos secundarios no deseados. Otros agentes terapéuticos se unen a y/o inhiben la actividad inflamatoria del factor de necrosis tumoral (TNF), por ejemplo, anticuerpos específicos anti-TNF o fragmentos de anticuerpo, o una forma soluble del receptor de TNF. Estos

agentes seleccionan como diana una proteína en la superficie de una célula T e impiden generalmente la interacción con una célula presentadora de antígeno (CPA). Sin embargo, composiciones terapéuticas que contienen proteínas plegadas naturales son a menudo difíciles de producir, formular, almacenar y administrar. Además, la heterogeneidad innata del sistema inmunitario puede limitar la eficacia de los fármacos y complicar el tratamiento a largo plazo de enfermedades autoinmunitarias.

El acetato de glatirámero (copolímero 1; Cop 1; a continuación en el presente documento copolímero GLAT) es una mezcla de polipéptidos compuestos por alanina, ácido glutámico, lisina y tirosina en una relación molar de aproximadamente 4,6:1,5:3,0:1,0, respectivamente, que se sintetiza polimerizando químicamente los cuatro aminoácidos, formando productos con pesos moleculares medio que oscilan entre aproximadamente 4000 y aproximadamente 13.000 daltons. Las fracciones molares correspondientes son aproximadamente 0,427 para alanina, 0,141 para ácido glutámico, 0,337 para lisina y 0,093 para tirosina, y pueden variar en aproximadamente +/-10%. Copolímeros relacionados son mezclas de polipéptidos compuestos por tres (por tanto, "terpolímeros") de los cuatro aminoácidos mencionados anteriormente. El copolímero 1 y los terpolímeros abordan la heterogeneidad innata del sistema inmunitario de mamíferos y la población humana y son eficaces para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y otros estados inmunitarios. Se describen intervalos de pesos moleculares medio preferidos y procedimientos de preparación de terpolímeros en la patente estadounidense n.º 5.800.808. También se contemplan por la invención otros copolímeros compuestos por otras combinaciones de tres, cuatro o cinco o más aminoácidos.

Para certificar una preparación de terpolímero o copolímero 1 para su uso en productos farmacéuticos, es necesario determinar con precisión la distribución de pesos moleculares de los polipéptidos en la preparación. Un método para determinar el peso molecular es la cromatografía en una columna de Superosa 12. Se han determinado coeficientes de calibración de columnas para la determinación del peso molecular del acetato de glatirámero usando lotes de acetato de glatirámero con pesos moleculares medidos indirectamente. Las medidas indirectas han incluido viscosimetría y ultracentrifugación de velocidad de sedimentación. Más recientemente, se han preparado lotes de marcadores de acetato de glatirámero cuyos pesos moleculares se determinaron mediante dispersión de luz láser multiángulo (MALLS).

Por tanto, existe una necesidad de marcadores de pesos moleculares útiles como patrones para determinar la distribución de pesos moleculares de composiciones de copolímeros contempladas por la invención. Los marcadores de pesos moleculares deseables tienen pesos moleculares definidos y propiedades físicas que son análogas a las moléculas para las que va a determinarse el peso molecular, idealmente, hay una relación lineal entre los pesos moleculares definidos (o el log de los pesos moleculares definidos) de los marcadores y una propiedad física medible tal como, por ejemplo, la elipticidad molar de los marcadores, o el tiempo de retención de los marcadores en una columna de separación molecular. Isr. J Med. Sci, 33, páginas 280-286 (1997) da a conocer el copolímero 1 para el tratamiento de esclerosis múltiple (EM) y encefalomiелitis alérgica experimental, un modelo animal de EM.

Resumen de la invención

Los marcadores de pesos moleculares de secuencia definida que tienen características químicas y físicas similares a copolímero GLAT proporcionan un grupo de calibración precisa y robusta para determinaciones de peso molecular de lotes de producción. La presente invención proporciona derivados de copolímeros de GLAT útiles como marcadores de pesos moleculares para determinar los intervalos de pesos moleculares de preparaciones de copolímero GLAT y que tienen óptimamente utilidad terapéutica para el tratamiento de estados inmunitarios. La invención proporciona además polipéptidos que tienen pesos moleculares definidos que son derivados de otros copolímeros y que son útiles para determinar los intervalos de pesos moleculares de preparaciones de esos copolímeros. Cuando esos copolímeros son útiles terapéuticamente, los polipéptidos derivados tienen óptimamente utilidad terapéutica. Para la determinación del intervalo de pesos moleculares de una preparación de copolímero GLAT, el derivado preferido es un polipéptido que tienen una composición de aminoácidos correspondiente aproximadamente al copolímero GLAT y un peso molecular identificado que está entre aproximadamente 2.000 Daltons y aproximadamente 40.000 Daltons. El polipéptido tiene preferiblemente relaciones molares específicas de los aminoácidos alanina, ácido glutámico y lisina. Además, en una realización preferida el polipéptido tiene alanina en el extremo N-terminal y tirosina en la cuarta posición desde el extremo N-terminal. Para la determinación del peso molecular de un terpolímero, el derivado preferido tendrá un peso molecular definido y una composición de aminoácidos que se corresponde aproximadamente con aquella del terpolímero. También se contemplan otros copolímeros por la invención. Cuando se determina el peso molecular de un copolímero contemplado por la invención, el derivado de polipéptido tendrá un peso molecular definido y una composición de aminoácidos que se corresponde aproximadamente con aquella del copolímero.

La presente invención proporciona además una pluralidad de marcadores de pesos moleculares para determinar el peso molecular de acetato de glatirámero o un terpolímero u otro copolímero o una columna de separación de pesos moleculares. Los marcadores comprenden de dos a diez o más polipéptidos, teniendo cada polipéptido un peso molecular identificado. Cuando se determina el intervalo de pesos moleculares del acetato de glatirámero, una pluralidad preferida de marcadores de pesos moleculares tendrá pesos moleculares definidos de desde aproximadamente 2.000 Daltons hasta aproximadamente 40.000 Daltons, y composiciones de aminoácidos

correspondientes a acetato de glatirámero o un terpolímero seleccionado. En realizaciones preferidas, hay una relación lineal entre el log del peso molecular de los marcadores de pesos moleculares polipeptídicos y o bien el tiempo de retención de los marcadores de pesos moleculares en una columna de separación o bien entre el peso molecular de los marcadores de pesos moleculares y la elipticidad molar de los marcadores de pesos moleculares.

- 5 La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar un producto farmacéutico que comprende acetato de glatirámero que tiene un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 13.000 Daltons, procedimiento que comprende las etapas de obtener una preparación de acetato de glatirámero; determinar el peso molecular medio de la preparación de acetato de glatirámero usando un aparato cromatográfico que se calibra usando una pluralidad de marcadores de pesos moleculares para establecer una relación lineal entre el tiempo de retención de los marcadores de pesos moleculares en el aparato cromatográfico y el log del peso molecular de los marcadores de pesos moleculares, en el que cada uno de los marcadores de pesos moleculares es un polipéptido que consiste en alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina y que tiene una secuencia de aminoácidos predeterminada y un peso molecular definido; y usar la preparación de acetato de glatirámero para preparar el producto farmacéutico si la preparación de acetato de glatirámero tiene un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 13.000 Daltons.
- 10
- 15 La presente invención también proporciona un procedimiento para certificar acetato de glatirámero para su uso en un producto farmacéutico que comprende acetato de glatirámero que tiene un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 13.000 Daltons, procedimiento que comprende las etapas de determinar el peso molecular medio del acetato de glatirámero usando un aparato cromatográfico que se calibra usando una pluralidad de marcadores de pesos moleculares para establecer una relación lineal entre el tiempo de retención de los marcadores de pesos moleculares en el aparato cromatográfico y el log del peso molecular de los marcadores de pesos moleculares, en el que cada uno de los marcadores de pesos moleculares es un polipéptido que consiste en alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina y que tiene una secuencia de aminoácidos predeterminada y un peso molecular definido; y certificar el acetato de glatirámero para su uso en el producto farmacéutico si el acetato de glatirámero tiene un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 13.000 Daltons.
- 20
- 25 En una o más realizaciones, en los marcadores de pesos moleculares la fracción molar de alanina es de 0,38 a 0,5, de ácido glutámico es de 0,13 a 0,15, de tirosina es de 0,08 a 0,10 y de lisina es de 0,3 a 0,4.

En una o más realizaciones, en los marcadores de pesos moleculares la fracción molar de alanina es de 0,422 a 0,444, de ácido glutámico es de 0,133 a 0,143, de tirosina es de 0,086 a 0,093 y de lisina es de 0,333 a 0,349.

En una o más realizaciones, el aparato cromatográfico es una columna de cromatografía en gel permeable.

- 30 En una o más realizaciones, en las que el aparato cromatográfico es una columna TSK, una columna de Sephadex, una columna de Sepharosa o una columna de Superosa.

En una o más realizaciones, uno de los marcadores de pesos moleculares es:

AKKYAKKEKAACKKAYf:KEAKAKAAEAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 1);

AKKYAKKAKAEKAKKAYKAAEAKKAAKYEKAAAEEKAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 2);

- 35 AKKYAKKEKAYAKKAKEAACKKAEAKAYKAAEAKKKAEAKYKAEAAKAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 3);

AKKYAKKEKAYAKKKAEEAKAAKKAKAEAKKYAKAAKAEKKEYAAAEEAKYKAEAAKAAAKEA
AYEA (SEQ ID NO: 4);

AKKYAKKEKAYAKKAEEKAAKKAEEAKAYKAAEAKKKAKAEAKKYAKAAKAEKKEYAAAEEAKYK
AEAAKAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 5);

AKKYAKKEKAYAKKAEEKAAKKAEEAKAYKAAEAKKKAKAEAKKYAKAAKAEKKEYAAAEEAKYK
AEAAKAYKAEAAKAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 6);

AKKYAKKAEKAYAKKAKAAKEKKAYAKKEAKAYKAAEAKKKAKAEAKKYAKEAAKAKKEAYK
AEAKKYAKAAKAEKKEYAAAEEAKKAEAAKAYKAEAAKAAAKEAAYEA (SEQ ID NO:
7),

en los que A representa alanina, K representa lisina, Y representa tirosina y E representa ácido glutámico.

En una o más realizaciones, la pluralidad de marcadores de pesos moleculares es:

AKKYAKKEKAACKKAYKKEAKAKAAEAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 1);

AKKYAKKAKAEKAKKAYKAAEAKKAAKYEKAAAEKAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 2);

AKKYAKKEKAYAKKAKEAKKAEAKAYKAAEAKKKAEAKYKAEAAKAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 3);

AKKYAKKEKAYAKKAKAEAKKAAKKAKEAKKYAKAAKAEKKEYAAAEEKYKAEAAKAAAKEA
AYEA (SEQ ID NO: 4);

AKKYAKKEKAYAKKAKEAKKAEAKAYKAAEAKKKAKAEAKKYAKAAKAEKKEYAAAEEKYK
AEAAKAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 5);

AKKYAKKEKAYAKKAKEAKKAEAKAYKAAEAKKKAKAEAKKYAKAAKAEKKEYAAAEEKYK
AEAAKAYKAEAAKAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 6) y

AKKYAKKAEKAYAKKAKAAKEKKAYAKKEAKAYKAAEAKKKAKAEAKKYAKEAAKAKKEAYK
AEAKKYAKAAKAEKKEYAAAEEKKAEAAKAYKAEAAKAAKEAAYEA (SEQ ID NO:
7),

- 5 en los que A representa alanina, K representa lisina, Y representa tirosina y E representa ácido glutámico.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a proporciona la distribución de la alanina en los marcadores moleculares (marcadores TV) descritos en la Tabla 1. La posición del aminoácido está definida por el eje X. La presencia de una alanina está indicada por una barra vertical en la posición del aminoácido indicado.

- 10 La Figura 1b proporciona la distribución de la lisina en los marcadores TV descritos en la Tabla 1. La posición del aminoácido está definida por el eje X. La presencia de un resto de lisina está indicada por una barra vertical en la posición del aminoácido indicado.

- 15 La Figura 1c proporciona la distribución del ácido glutámico en los marcadores TV descritos en la Tabla 1. La posición del aminoácido está definida por el eje X. La presencia de un resto de ácido glutámico está indicada por una barra vertical en la posición del aminoácido indicado.

La Figura 1d proporciona la distribución de la tirosina en los marcadores TV descritos en la Tabla 1. La posición del aminoácido está definida por el eje X. La presencia de un resto de tirosina está indicada por una barra vertical en la posición del aminoácido indicado.

- 20 La Figura 2 proporciona una gráfica de la elipticidad molar frente al peso molecular de los presentes marcadores TV comparados con marcadores de acetato de glatirámico conocidos. La elipticidad molar se proporciona en 10^{-5} grad $\text{cm}^{-2} \text{dmol}^{-1}$ y el peso molecular está en Daltons. Los círculos indican marcadores TV y los cuadrados representan marcadores de acetato de glatirámico. Como se muestra, los marcadores TV proporcionan una relación lineal entre la elipticidad molar y el peso molecular.

- 25 La Figura 3a proporciona una gráfica del tiempo de retención relativo (TRR) de los presentes marcadores TV frente al log del peso molecular de esos marcadores, usando un algoritmo basado en el TRR.

La Figura 3b proporciona una gráfica del log del peso molecular de los marcadores TV frente al tiempo de retención (TR) de esos marcadores, usando un algoritmo basado en Millennium.

- 30 La Figura 4a proporciona una gráfica que resume diversas calibraciones del tiempo de retención relativo (TRR) de los marcadores TV frente al peso molecular de esos marcadores, usando un algoritmo basado en el TRR. Los datos se obtuvieron de 16 columnas. Se representan los valores promedio para cada una de las 16 calibraciones.

La Figura 4b proporciona una gráfica que resume diversas calibraciones del peso molecular de los marcadores TV presentes frente al tiempo de retención relativo (TRR) de esos marcadores, usando un algoritmo basado en Millennium. Los datos se obtuvieron de 16 columnas. Se representan los valores promedio para cada una de las 16 calibraciones.

La Figura 5 representa la inhibición de la unión del Cop 1 a anticuerpos policlonales anti-Cop 1 mediante cuatro marcadores TV y Cop 1 (03494). Las relaciones de absorbancia indican la absorbancia medida con una concentración de inhibidor creciente en relación a la absorbancia en ausencia de inhibición de la unión. La figura 5 es para comparación.

5 Descripción detallada de la invención

Los marcadores de pesos moleculares de la invención (por ejemplo, marcadores TV), incluyen polipéptidos que tienen una composición de aminoácidos que se corresponde aproximadamente con el acetato de glatirámico o con terpolímeros relacionados, y un peso molecular identificado que está entre aproximadamente 2.000 Daltons y aproximadamente 40.000 Daltons y son útiles para la determinación con precisión del peso molecular del copolímero GLAT y de terpolímeros relacionados. Se deduce de los requerimientos para un peso molecular identificado que un marcador TV debe tener un peso molecular discreto y no un intervalo de pesos moleculares. Por consiguiente, los marcadores TV se sintetizan según una secuencia de aminoácidos predeterminada que se corresponde en composición con el copolímero para el que se debe determinar el intervalo de pesos moleculares. Óptimamente, los marcadores TV tienen una actividad terapéutica que es similar al copolímero correspondiente. Estos marcadores se pueden usar en cualquier sistema de discriminación de tamaños moleculares usando cualquier procedimiento o aparato de determinación de pesos moleculares disponible. Por ejemplo, los presentes marcadores se pueden usar para la calibración de cualquier procedimiento o aparato cromatográfico que se use para las determinaciones de pesos moleculares de polipéptidos o proteínas. Ese aparato cromatográfico puede ser una columna de separación de pesos moleculares que separa polipéptidos en base a su tamaño molecular. Ejemplos de columnas de separación de pesos moleculares incluyen columnas TSK, columnas de Sephadex, columnas de Sepharosa, y columnas de Superosa. Para proporcionar marcadores de pesos moleculares de tamaño y composición discretos, los marcadores de pesos moleculares de la invención se pueden sintetizar según secuencias predeterminadas mediante procedimientos que son muy conocidos por aquellos expertos en la materia.

Las frases "aminoácido" y "secuencia de aminoácidos" como se definen en el presente documento y en las reivindicaciones pueden incluir uno o más componentes que son derivados de aminoácidos y/o análogos de aminoácidos que comprenden parte o la totalidad de los restos para uno cualquiera o más de los 20 aminoácidos de origen natural indicados por esa secuencia. Por ejemplo, en una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más restos de tirosina, una porción de uno o más de esos restos se puede sustituir por homotirosina. Además, una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más enlaces no peptídicos o peptidomiméticos entre dos restos adyacentes, está incluida dentro de esta definición.

Los códigos de aminoácidos de una letra y de tres letras (y el aminoácido que representa cada uno) son los siguientes: A significa ala (alanina); C significa cys (cisteína); D significa asp (ácido aspártico); E significa glu (ácido glutámico); F significa phe (fenilalanina); G significa gly (glicina); H significa his (histidina); I significa ile (isoleucina); K significa lys (lisina); L significa leu (leucina); M significa met (metionina); N significa asn (asparagina); P significa pro (prolina); Q significa gln (glutamina); R significa arg (arginina); S significa ser (serina); T significa thr (treonina); V significa val (valina); W significa trp (triptófano); e Y significa tyr (tirosina).

El término aminoácido "hidrófobo" está definido en el presente documento y en las reivindicaciones como incluyendo a los aminoácidos alifáticos alanina (A, o ala), glicina (G, o gly), isoleucina (I, o ile), leucina (L, o leu), prolina (P, o pro), y valina (V, o val), siendo los términos entre paréntesis las abreviaturas estándar del código de una letra y de tres letras para cada aminoácido, y a los aminoácidos aromáticos triptófano (W, o trp), fenilalanina (F, o phe) y tirosina (Y, o tyr). Los aminoácidos confieren hidrofobicidad en función de la longitud de las cadenas laterales alifáticas y del tamaño de las aromáticas, cuando se encuentran como restos dentro de una proteína.

El término aminoácido "cargado" está definido en el presente documento y en las reivindicaciones como incluyendo a los aminoácidos ácido aspártico (D, o asp), ácido glutámico (E, o glu), histidina (H, o his), arginina (R, o arg) y lisina (K, o lys), que confieren una carga positiva (his, lys y arg) o negativa (asp y gly) a valores fisiológicos de pH en disoluciones acuosas a proteínas que contienen estos restos.

Composiciones de polipéptidos contempladas por la invención. Según la presente invención, para los presentes marcadores se prefieren polipéptidos que tienen pesos moleculares definidos y que comprenden tres o los cuatro aminoácidos tirosina, ácido glutámico, alanina y lisina.

Además, los marcadores de pesos moleculares de la invención pueden estar compuestos de aminoácidos L o D. Como es sabido por alguien experto en la materia, los aminoácidos L se encuentran en la mayoría de proteínas naturales. No obstante, comercialmente están disponibles aminoácidos D y se pueden sustituir por alguno o todos los aminoácidos usados para preparar los marcadores de pesos moleculares de la invención. La presente invención contempla marcadores de pesos moleculares formados de mezclas de aminoácidos D y L, así como marcadores de pesos moleculares constituidos esencialmente por cualquiera de los aminoácidos L o D.

El peso molecular medio y la fracción molar media de los aminoácidos de los presentes polipéptidos pueden variar. No obstante, se contempla un intervalo de pesos moleculares de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 40.000, y se prefieren polipéptidos básicos, en lugar de polipéptidos ácidos.

En una realización, la presente invención proporciona marcadores polipeptídicos que contienen tirosina, alanina, ácido glutámico y lisina en relaciones molares definidas. En una realización más preferida, la relación molar de aminoácidos de los presentes polipéptidos es aquella encontrada en el copolímero GLAT. Esa correspondencia en las relaciones molares proporciona los mejores marcadores de pesos moleculares debido a que esos marcadores tendrán una carga y una forma molecular que es similar a aquella del copolímero GLAT. Cuando se usan marcadores estructuralmente diferentes, los marcadores pueden migrar o eluir de forma algo diferente de las preparaciones del copolímero GLAT, incluso de aquellas preparaciones que tienen el mismo peso molecular que los marcadores.

Además, en una forma de realización preferida, la alanina está en el extremo N-terminal y la tirosina está en la posición cuatro desde el extremo N-terminal. Los análisis de degradación de Edman realizados sobre diversos lotes de acetato de glatirámico revelaron una mayor abundancia de alanina en el extremo N-terminal y de tirosina en la posición cuatro desde el extremo N-terminal. Por tanto, en ciertas formas de realización preferidas, los marcadores de pesos moleculares del copolímero GLAT tienen alanina en el extremo N-terminal y tirosina en la posición cuatro desde el extremo N-terminal. Los estudios de la reacción de polimerización usada para sintetizar el copolímero GLAT han indicado que la alanina y el ácido glutámico polimerizan más rápido que la lisina. Como resultado, la porción C-terminal del copolímero GLAT tiende a ser más rica en alanina y en ácido glutámico, mientras que la porción N-terminal tiende a ser más rica en lisina. En formas de realización preferidas, la distribución de restos aminoácidos en los marcadores de pesos moleculares del copolímero GLAT refleja esta predisposición.

Cuando se determina el intervalo de pesos moleculares del copolímero GLAT, un marcador de pesos moleculares preferido consta esencialmente de los aminoácidos alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina en fracciones molares de 0,38 aproximadamente a 0,50 de alanina aproximadamente, de 0,13 aproximadamente a 0,15 de ácido glutámico aproximadamente, de 0,08 aproximadamente a 0,10 de tirosina aproximadamente, y de 0,3 aproximadamente a 0,4 de lisina aproximadamente.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona marcadores de pesos moleculares que contienen tres de los cuatro aminoácidos alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina en relaciones definidas. En realizaciones preferidas, las fracciones molares de aminoácidos presentes en los marcadores de pesos moleculares corresponden a aquellas encontradas en un terpolímero correspondiente.

Cuando el marcador de pesos moleculares contiene alanina, ácido glutámico y tirosina, la alanina puede estar presente en una fracción molar de 0,005 aproximadamente a 0,800 aproximadamente, el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de 0,005 aproximadamente a 0,300 aproximadamente, y la tirosina puede estar presente en una fracción molar de 0,005 aproximadamente a 0,250 aproximadamente. El peso molecular está entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 40.000 Daltons, y preferiblemente entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 12.000 Daltons.

Cuando el marcador de pesos moleculares contiene alanina, ácido glutámico y lisina, la alanina puede estar presente en una fracción molar de 0,005 aproximadamente a 0,600 aproximadamente, el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de 0,005 aproximadamente a 0,300 aproximadamente, y la lisina puede estar presente en una fracción molar de 0,2 aproximadamente a 0,7 aproximadamente. El peso molecular está entre 2000 aproximadamente y 40.000 Daltons aproximadamente, y preferentemente entre 3000 aproximadamente y 12.000 Daltons aproximadamente.

Cuando el marcador de pesos moleculares contiene alanina, tirosina y lisina, la alanina puede estar presente en una fracción molar de 0,3 aproximadamente a 0,6 aproximadamente, la tirosina puede estar presente en una fracción molar de 0,005 aproximadamente a 0,250 aproximadamente, y la lisina puede estar presente en una fracción molar de 0,1 aproximadamente a 0,5 aproximadamente. El peso molecular está entre 2000 aproximadamente y 40.000 Daltons aproximadamente, y preferentemente entre 3000 aproximadamente y 12.000 Daltons aproximadamente.

Cuando el marcador de pesos moleculares contiene ácido glutámico, tirosina y lisina, el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de 0,005 aproximadamente a 0,300 aproximadamente, la tirosina puede estar presente en una fracción molar de 0,005 aproximadamente a 0,250 aproximadamente, y la lisina puede estar presente en una fracción molar de 0,3 aproximadamente a 0,7 aproximadamente. El peso molecular está entre aproximadamente 2.000 y preferiblemente 40.000 Daltons, y preferiblemente entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 12.000 Daltons.

Los polipéptidos de la invención se pueden usar para determinaciones de intervalos de pesos moleculares de otros copolímeros contemplados por la invención. Los copolímeros contemplados pueden consistir en combinaciones de tres, cuatro, o cinco o más aminoácidos. En general, para determinar el intervalo de pesos moleculares de un copolímero contemplado por la invención, el marcador de pesos moleculares polipeptídico tendrá un peso molecular y una composición de aminoácidos definidos que se corresponde aproximadamente con aquella del copolímero. Será evidente para alguien experto en la materia que cualquier tendencia en la distribución de los aminoácidos en un copolímero se puede determinar como se ha descrito anteriormente para el copolímero GLAT. Por ejemplo, se pueden obtener las cantidades relativas de aminoácidos incorporados en cada posición de una población de terpolímeros analizando los productos de cada etapa de una degradación de Edman. Alternativamente, se pueden

controlar las proporciones de aminoácidos incorporados en una población de terpolímeros durante la síntesis. Donde sea aplicable, se pueden sintetizar marcadores de pesos moleculares que reflejan la tendencia. Además, ciertos marcadores de pesos moleculares de terpolímeros preferidos tendrán alanina o tirosina en posición cuatro.

5 Ejemplos de secuencias de marcadores de pesos moleculares polipeptídicos preferidos se dan en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1-7) usando el código convencional de una letra de los aminoácidos y leyendo desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. Las siete secuencias indicadas son preparaciones individuales de polipéptidos que tienen una composición de aminoácidos que se corresponde con el acetato de glatirámero. Normalmente, los aminoácidos que comprenden una molécula marcadora de pesos moleculares son predominantemente de una de las dos configuraciones (configuración D o L). En formas de realización preferidas, una molécula marcadora de pesos moleculares está compuesta en su totalidad de aminoácidos de la misma configuración. No obstante, en ciertas formas de realización se pueden preferir moléculas marcadoras de pesos moleculares que comprenden aminoácidos de configuración mixta, cuando el peso molecular se determina para una preparación de acetato de glatirámero que comprende aminoácidos de configuración mixta.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de marcadores TV seleccionados

SEQ ID NO	Secuencia
1	AKKYAKKEKAAKKAYKKEAKAKAAEAAAKEAAYEA
2	AKKYAKKAKAEKAKKAYKAAEAKKAAKYEKAAAEEKAAKEAAYEA
3	AKKYAKKEKAYAKKAEKAAKKAEEKAYKAAEAKKKAEEKY- KAEAAKAAAKEAAYEA
4	AKKYAKKEKAYAKKAEKAAKKAEEKAYKAAEAKKKAEEKY- KEYAAAEAKYKAEAAKAAAKEAAYEA
5	AKKYAKKEKAYAKKAEKAAKKAEEKAYKAAEAKKKAEEKY- KAYAKAAAEKKEAYAAAEAKYKAEAAKAAAKEAAYEA
6	AKKYAKKEKAYAKKAEKAAKKAEEKAYKAAEAKKKAEEKY- KAYAKAAAEKKEAYAAAEAKYKAEAAKKAEEKYKAEAAKAAAKEAAYEA
7	AKKYAKKAEKAYAKKAKAAKEKKAYAKKEAKAYKAAEAKK- KAKAEAKKYAKEAAKAKKEAYKAEAKKYAKAAKAEKKEYA- AAEAKKAEAAKAYKAEAAKAAAKEAAYEA

15 En otra forma de realización, la presente invención proporciona una pluralidad de marcadores de pesos moleculares para la determinación del peso molecular de acetato de glatirámero o de un terpolímero en una columna de separación de pesos moleculares. La pluralidad de marcadores de pesos moleculares son polipéptidos. La pluralidad de marcadores puede ser de dos a aproximadamente diez o más. En una forma de realización preferida, la pluralidad de marcadores es de siete. Cada polipéptido tiene un peso molecular identificado que está entre aproximadamente 2.000 Daltons y aproximadamente 40.000 Daltons, y una composición de aminoácidos que se corresponde aproximadamente con aquella del acetato de glatirámero o de un terpolímero.

20 Cuando esa pluralidad de marcadores de pesos moleculares se usa como patrón para la determinación del peso molecular del acetato de glatirámero o de un terpolímero, existe una relación que es aproximadamente lineal entre el tiempo de retención de los marcadores de pesos moleculares en una columna cromatográfica y el log del peso molecular. Se usa una pluralidad de marcadores que es suficiente para establecer la relación aproximadamente lineal, aunque se pueden emplear más. La Fig. 3 muestra la relación aproximadamente lineal entre el tiempo de retención relativo y el log de pesos moleculares para los marcadores TV de la invención.

25 En otra forma de realización, existe una relación aproximadamente lineal entre la elipticidad molar de los marcadores de pesos moleculares y el peso molecular de los marcadores. Cuando se determina el peso molecular de una preparación de acetato de glatirámero mediante elipticidad molar, se usa una pluralidad de marcadores que es suficiente para establecer la relación aproximadamente lineal, aunque se pueden emplear más. A continuación se obtiene un peso molecular para la preparación de acetato de glatirámero o de terpolímero basándose en la relación lineal. La Fig. 2 muestra la relación aproximadamente lineal entre la elipticidad molar y el peso molecular para marcadores TV de la invención.

30 Los ejemplos que siguen describen la invención con detalle mostrando cómo se pueden realizar ciertas formas de realización específicas representativas, los materiales, aparatos y etapas del procedimiento que se entienden como ejemplos que están previstos sólo con fines ilustrativos.

35 A lo largo de toda esta solicitud, se ha hecho referencia a diversas publicaciones, patentes y solicitudes de patente. Las enseñanzas y descripciones de estas publicaciones, patentes y solicitudes de patente en su totalidad describen más completamente el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en profundidad.

EJEMPLO 1**Propiedades físicas de los marcadores TV****Síntesis en fase sólida**

- 5 Se prepararon siete marcadores de pesos moleculares con pesos moleculares comprendidos entre 3700-12.000 Daltons aproximadamente en el laboratorio del Prof. M. Fridkin (Weizmann Institute of Science) (Tabla 2). Estos marcadores se denominan marcadores TV. A los péptidos individuales se les asignó un nombre TV-##, donde ## es el número de restos de aminoácidos (por ejemplo, TV-35 es el marcador 35-mero). La composición de aminoácidos de estos marcadores cumple las especificaciones del acetato de glatirámico (Tabla 2).

Tabla 2

TV-35 - Péptido con un peso molecular = 3757 Daltons				
	Ala	Glu	Tyr	Lys
Número de restos	15	5	3	12
Fracción molar	0,429	0,143	0,086	0,343
TV-45 - Péptido con un peso molecular = 4790 Daltons				
	Ala	Glu	Tyr	Lys
Número de restos	20	6	4	15
Fracción molar	0,444	0,133	0,089	0,333
TV-56 - Péptido con un peso molecular = 6008 Daltons				
	Ala	Glu	Tyr	Lys
Número de restos	24	8	5	19
Fracción molar	0,429	0,143	0,089	0,339
TV-66 - Péptido con un peso molecular = 7040 Daltons				
	Ala	Glu	Tyr	Lys
Número de restos	29	9	6	22
Fracción molar	0,439	0,136	0,091	0,333
TV-77 - Péptido con un peso molecular = 8259 Daltons				
	Ala	Glu	Tyr	Lys
Número de restos	33	11	7	26
Fracción molar	0,429	0,143	0,091	0,338
TV-86 - Péptido con un peso molecular = 9220 Daltons				
	Ala	Glu	Tyr	Lys
Número de restos	37	12	8	29
Fracción molar	0,430	0,140	0,093	0,337
TV-109 - Péptido con un peso molecular = 11.727 Daltons				
	Ala	Glu	Tyr	Lys
Número de restos	46	15	10	38
Fracción molar	0,422	0,138	0,092	0,349

- 10 Las figuras 1a, 1b, 1c y 1d proporcionan la distribución de alanina, lisina, ácido glutámico y tirosina, respectivamente, en los marcadores TV descritos en la Tabla 2. La posición del aminoácido está definida por el eje X, con el primer aminoácido que corresponde a la posición C-terminal. La presencia de un aminoácido está indicada por una barra vertical en la posición del aminoácido indicada.

Confirmación de la masa y la secuencia

- 15 **Espectroscopia de masas.** Las muestras de polipéptidos se analizaron inmediatamente después de su síntesis usando un espectrofotómetro de masas de plataforma VG equipado con una fuente de ionización por electropulverización. Varios meses más tarde el análisis se repitió en TEVA usando un espectrofotómetro de masas PE-Sciex AP1300 equipado con una fuente de ionización por electropulverización (Tabla 3, primera preparación).
- 20 Estos resultados indican que cada marcador TV polipeptídico tiene un único componente principal con la masa molecular prevista.

Tabla 3. Espectroscopia de masas de polipéptidos de secuencia definida

Polipéptido	Masa molecular diseñada (Daltons)	Masa molecular determinada – primera preparación (Daltons)	Masa molecular determinada – segunda preparación (Daltons)
TV-35	3757	3757	3757
TV-45	4790	4790	4790
TV-56	6008	6008	6008
TV-66	7040	7041	7040
TV-77	8259	8259	8259
TV-86	9220	9220	9220
TV-109*	11.727	11.728	11.727

* El 109-mero se purificó posteriormente por fraccionamiento en una columna de fase inversa. Se recogieron tres fracciones y la fracción número 2 se destinó con fines de calibración y se denominó TV-109.

5 Se preparó un segundo lote de marcadores. La espectroscopia de masas confirmó que los polipéptidos de la segunda preparación eran idénticos a los polipéptidos de la primera preparación (Tabla 3, segunda preparación). La similitud entre las dos preparaciones también se confirmó por cromatografía en Superosa 12. Cada uno de los marcadores eluyó con un pico agudo a un tiempo de retención distinto, independientemente del lote analizado. Por tanto, los marcadores TV de la presente invención se pueden sintetizar con una masa reproducible.

10 **Degradación de Edman.** La secuencia prevista de los polipéptidos se confirmó mediante análisis de degradación de Edman de la primera preparación.

Caracterización de los polipéptidos

15 **Dicroísmo circular.** La similitud estructural entre los marcadores de pesos moleculares y el acetato de glatirámero es un requisito previo para una calibración adecuada de una columna de separación por tamaños moleculares. Las diferencias en la estructura del polipéptido pueden dar como resultado diferentes tamaños hidrodinámicos y en consecuencia un tiempo de retención alterado en el sistema cromatográfico. La elipticidad, determinada mediante dicroísmo circular, sirve como medida de la estructura secundaria de un polipéptido. Cuando la elipticidad de los marcadores de pesos moleculares y el acetato de glatirámero es similar, las estructuras de los dos serán similares.

20 La elipticidad molar de los polipéptidos se determinó en un espectrofotómetro Jobin-Yvon CD. La Figura 2 y la Tabla 4 muestran que el grado de elipticidad molar está correlacionado con el peso molecular del polipéptido. El péptido más corto presentaba el valor de elipticidad más bajo. La elipticidad molar de los nuevos marcadores era del mismo orden de magnitud que aquéllas de los marcadores de pesos moleculares de acetato de glatirámero usados actualmente. Nótese que aunque se representa el peso molecular exacto para los marcadores TV, en la gráfica se usó el peso molecular medio en número para el acetato de glatirámero.

25 Así, los nuevos marcadores y el acetato de glatirámero poseen estructuras similares y son, por tanto, adecuados para su uso como marcadores de pesos moleculares para nuevas preparaciones de acetato de glatirámero.

Tabla 4. Elipticidad molecular

Marcador PM	PM (Daltons)	Elip-M. (210 nm)
Marcadores TV		
TV-35	3757	-1,5367
TV-45	4790	-2,1651
TV-56	6008	-3,9658
TV-66	7040	-3,5172
TV-77	8259	-4,8365
TV-86	9220	-5,4546
TV-109	11.727	-6,818
Acetato de glatirámero		
BD 743	3700	-2,0186
BD 714	5600	-4,4182
BD 681	6600	-5,2019
BD 677	7000	-6,0153
56895	8000	-6,9062
90995	8500	-9,1736
BD 656	8900	-8,8576

Estos datos analíticos indican que los polipéptidos marcadores TV sintetizados presentan un grado sustancial de similitud a los marcadores de pesos moleculares de acetato de glatirámero usados actualmente. El contenido en

aminoácidos está dentro de las especificaciones del acetato de glatirámero. Los nuevos polipéptidos y los marcadores de pesos moleculares de acetato de glatirámero tienen una estructura secundaria similar, expresada como elipticidad molar. En consecuencia, se espera que los marcadores TV migren o eluyan en un sistema cromatográfico en gel permeable (GPC), tal como Superosa 12, igual que una preparación de acetato de glatirámero.

EJEMPLO 2

Calibración de una columna Superosa 12 con marcadores TV

Se espera que los marcadores TV y una preparación de acetato de glatirámero muestren una correlación similar entre el tiempo de retención relativo (TRR) y el log del peso molecular. Los marcadores TV se sometieron a cromatografía en varias columnas de Superosa 12. Se registró el pico del tiempo de retención para cada uno de los polipéptidos. La correlación lineal entre el Log del Peso Molecular (PM) y el Tiempo de Retención Relativo (TRR) se calculó de la manera siguiente: $TRR = B_1 + B_2 \times \text{LogPM}$ (véase Fig. 3a y Tabla 5).

El sistema de adquisición de datos basado en Millennium introducido recientemente (Waters Corp., Milford, Ma) proporciona una calibración integrada de columnas GPC. El algoritmo para la calibración se basa en el tiempo de retención y viene dado por la ecuación:

$$\text{LogPM} = A + B \times \text{TR} \text{ o } \text{PM} = 10^{(A+B \times \text{TR})}$$

en la que PM es el peso molecular, TR es el tiempo de retención, A y B, respectivamente, son la ordenada en el origen y la pendiente de la función de regresión calculada (Fig. 3b, Tabla 5).

Los resultados obtenidos mediante este algoritmo son prácticamente idénticos a aquellos obtenidos con el algoritmo aplicado actualmente, basado en el TRR. En el intento de automatizar los procedimientos, se empleó el sistema de adquisición de datos basado en Millennium para llevar a cabo la calibración usando los marcadores TV. Los procedimientos analíticos se actualizaron en consecuencia.

Se obtuvo una buena correlación ($r^2 > 0,98$) entre el log PM y el TRR, aunque los puntos no se distribuyen uniformemente en torno a la línea de regresión. Esta distribución es debida a las diferencias en la elipticidad de los diversos marcadores, como también se observó para el acetato de glatirámero. El marcador de pesos moleculares bajos que se desvía algo de la linealidad no se puede excluir debido a que la regresión debe cubrir valores por debajo de los 2500 Daltons para el primer parámetro de distribución de la desviación estándar (+1DS). Este es un rasgo general de todos los péptidos cortos - son menos helicoidales y más lineales.

Para la calibración basada en los marcadores de pesos moleculares del acetato de glatirámero, la ordenada en el origen (B1) y la pendiente (B2) fueron, respectivamente, 1,7415 y -0,2784. Esto se compara favorablemente con los valores de calibración obtenidos con los marcadores TV (B1 = 1,6996; B2 = -0,2705). Los pesos moleculares obtenidos usando los dos grupos de calibración dentro del intervalo de especificación difirieron, normalmente, en no más del 20% en el intervalo de pesos moleculares bajos y no más del 12% en el intervalo de especificación del TRR del pico (peso molecular medio). Esta diferencia relativamente pequeña sostiene la afirmación de que estos marcadores pueden sustituir a los marcadores de pesos moleculares de acetato de glatirámero usados actualmente sin un cambio significativo en los valores de pesos moleculares obtenidos.

Tabla 5a. Calibración mediante marcadores de PM de acetato de glatirámero

Marcador	PM	LOG PM	TR del pico	TRR*
TV-35	3757	3,575	28,97	0,728
TV-45	4790	3,68	27,96	0,703
TV-56	6008	3,779	27,12	0,682
TV-66	7040	3,848	26,32	0,662
TV-77	8259	3,917	25,56	0,643
TV-86	9220	3,965	24,93	0,627
TV-109	11.727	4,069	23,57	0,593
ORDENADA EN EL ORIGEN	**A 6,2516		***B1 1,6996	
PENDIENTE	B -0,0918		B2 -0,2705	
r^2	0,9927		0,9923	

* TRR = TR/TR Acetona

** calculado según la ecuación Millennium: $\text{LogPM} = A + B \times \text{TR}$

*** calculado según la ecuación: $\text{TRR} = B_1 + B_2 \times \text{log PM}$

La calibración basada en los marcadores TV se comparó con la calibración basada en los marcadores de pesos moleculares del acetato de glatirámico (Tabla 5b). Las dos calibraciones se compararon calculando los valores de pesos moleculares para cada grupo de calibración en el intervalo TRR de 0,5 a 0,8. El grupo de calibración del marcador TV incluía una fracción de TV-109 que se purificó mediante cromatografía de fase inversa antes de su uso para la calibración de la columna.

5

Tabla 5b. Calibración de la columna mediante marcadores TV

TRR	TR* (min)	Ac.Glatir. (PM1)	TV(0,1) (PMm)	Diferencia (PMm-PM1)	
		Daltons	Daltons	Daltons	%
0,5	19,89	28.800	26.700	-2100	-7,3%
0,51	20,28	26.500	24.500	-2000	-7,5%
0,52	20,68	24.400	22.600	-1800	-7,4%
0,53	21,08	22.500	20.700	-1800	-8,0%
0,54	21,48	20.700	19.100	-1600	-7,7%
0,55	21,87	19.000	17.500	-1500	-7,9%
0,56	22,27	17.500	16.100	-1400	-8,0%
0,57	22,67	16.100	14.800	-1300	-8,1%
0,58	23,07	14.900	13.600	-1300	-8,7%
0,59	23,46	13.700	12.500	-1200	-8,8%
0,6	23,86	12.600	11.500	-1100	-8,7%
0,61	24,26	11.600	10.600	-1000	-8,7%
0,62	24,66	10.700	9700	-1000	-9,3%
0,63	25,06	9800	9000	-800	-8,2%
0,64	25,45	9000	8200	-800	-8,9%
0,65	25,85	8300	7600	-700	-8,4%
0,66	26,25	7700	7000	-700	-9,1
0,67	26,65	7100	6400	-700	-9,9
0,68	27,04	6600	6900	-600	-9,2%
0,69	27,44	6000	5400	-600	-10,0%
0,70	27,84	5500	5000	-500	-9,1%
0,71	28,24	5100	4600	-500	-9,8%
0,72	28,63	4700	4200	-500	-10,6%
0,73	29,03	4300	3900	-400	-9,3%
0,74	29,43	4000	3600	-400	-10,0%
0,75	29,83	3600	3300	-300	-8,3%
0,76	30,23	3400	3000	-400	-11,8%
0,77	30,62	3100	2800	-300	-9,7%
0,78	31,02	2800	2500	-300	-10,7%
0,79	31,42	2600	2300	-300	-11,5%
0,80	31,82	2400	2100	-300	-12,5%

Pureza de los marcadores TV. Tres de los marcadores (TV-66, TV-77 y TV-86) se purificaron posteriormente mediante cromatografía de fase inversa. Se obtuvieron tres fracciones para cada marcador. La fracción media que contiene la porción principal del pico se sometió a cromatografía en el sistema Superosa 12 en comparación con los marcadores sin fraccionar (Tabla 6). Los marcadores TV se sometieron a cromatografía de separación por tamaño sin purificación (Normal) y después de purificación mediante cromatografía de fase inversa (Purificado). Se determinaron los tiempos de retención del pico y se calcularon las diferencias. El tiempo de retención del pico permaneció inalterado por el grado de pureza. Por tanto, el producto final de la síntesis es útil para una calibración precisa y no es necesaria una purificación adicional.

10

Tabla 6. Efecto de la purificación sobre el tiempo de retención

Marcador TV	Tiempo de retención (TR) (min)		Diferencia (%)
	Normal	Purificado	
TV-66	26,200	26,233	-0,13%
TV-77	25,450	25,450	0,00%
TV-86	24,867	24,850	0,07%

Consistencia en los valores reportados (Validación cruzada). Seis lotes de acetato de glatirámico, fabricados en 1993 y 1994, se volvieron a analizar mediante GPC calibrada con los marcadores TV. Sus pesos moleculares medios y la distribución de pesos moleculares se comparó con los valores reportados en el momento de su liberación. La Tabla 7 muestra una comparación de los datos de los pesos moleculares del certificado de análisis original y los datos de los pesos moleculares obtenidos usando una columna de Superosa 12 calibrada con marcadores TV. Las diferencias en los valores reportados normalmente son inferiores al 10%.

20

Tabla 7. Comparación de las determinaciones de pesos moleculares

Preparación de Cop 1		PM Millennium	PM CoA	Diferencia %
00193	Media	10.250	9900	-3,5%
	-1 DS	20.950	19.100	-9,7%
	+1 DS	51.000	4800	-6,3%
00594	Media	6700	6550	-2,3%
	-1 DS	15.700	15.100	-4,0%
	+1 DS	3600	3400	-5,9%
00993	Media	9200	8600	-7,0%
	-1 DS	18.500	17.350	-6,9%
	+1 DS	4700	4400	-6,8%
04194	Media	6100	6150	0,8%
	-1 DS	12.600	12.500	-0,8%
	+1 DS	3200	3200	0,0%
01793	Media	8800	8300	-6,0%
	-1 DS	18.100	17.300	-4,6%
	+1 DS	5200	4750	-9,5%
05494	Media	8100	8300	2,4%
	-1 DS	17.800	17.450	-2,0%
	+1 DS	4100	4100	0,0%

Estabilidad de los marcadores en disolución. Los marcadores TV se sometieron cuatro veces a cromatografía en un periodo de 24 horas. Todos los marcadores se mantuvieron en disolución a temperatura ambiente y se analizaron a intervalos de 8 horas. La Tabla 8 muestra el tiempo de retención del pico medido para los marcadores TV en cada uno de los cuatro puntos temporales. A una concentración de 0,1 mg/ml, los marcadores TV fueron estables en disolución durante al menos 24 horas a temperatura ambiente.

Tabla 8. Estabilidad de los marcadores TV en disolución a temperatura ambiente

	Tiempo de retención del pico (min)				Media	DSR
TV-35	29,883	29,883	29,900	29,950	29,904	0,106%
TV-45	28,933	28,917	28,917	28,933	28,925	0,032%
TV-56	28,250	28,217	28,283	28,250	28,250	0,095%
TV-66	27,400	27,350	27,433	27,433	27,404	0,143%
TV-77	26,750	26,700	26,750	26,783	26,746	0,128%
TV-86	26,117	26,100	26,150	26,150	26,129	0,095%
TV-109Fr11	24,783	24,850	24,883	24,850	24,842	0,169%

Además, las disoluciones de los marcadores se almacenaron durante hasta tres meses y medio bajo diversas condiciones de almacenamiento (2-8°C, -10 a -20°C, con/sin azida). Los marcadores TV son estables durante al menos 3 meses cuando se almacenan en forma de disoluciones congeladas (Tabla 9). Como precaución se decidió permitir el almacenamiento de disoluciones congeladas durante dos meses.

Los marcadores TV liofilizados son estables durante al menos dos años según los datos de estabilidad acumulados.

Tabla 9. Estabilidad de los marcadores TV de -10° a -20°C

Fecha de calibración		22/5/97	9/7/97	4/9/97
Intervalo (días)		--	48	105
Marcador	PM	TR	TR	TR
TV-35	3757	28,867	28,867	28,967
TV-45	4790	27,833	27,917	27,950
TV-56	6008	27,076	27,133	27,100
TV-66	7040	26,233	26,317	26,300
TV-77	8259	25,467	25,617	25,550
TV-86	9220	24,883	25,017	24,950
TV-109	11.727	23,500	23,650	23,583

Resumen de los datos de calibración. En total, los marcadores TV se analizaron 53 veces en dos laboratorios. En la Fig. 4 y en la Tabla 10 se presenta un resumen de los datos. Las diferencias observadas entre las carreras individuales (Fig. 4) reflejan variaciones entre las columnas más que diferencias entre los laboratorios participantes. Esto está indicado en la Fig. 4 mediante el uso de símbolos diferentes para algunas de las carreras. Las constantes de calibración en la Tabla 10 se calcularon usando la ecuación de Millennium para los datos obtenidos para 53 grupos de calibración inyectados en 16 columnas.

Tabla 10. Constantes de calibración obtenidas en los laboratorios Plantex y Abic

Marcador	PM	TR			TR			
		Media	DS	DSR%	Min	Máx	Media -DS	Media +DS
TV-35	3757	29,69	0,463	1,6%	28,85	30,35	28,30	31,08
TV-45	4790	28,72	0,481	1,7%	27,88	29,40	27,28	30,16
TV-56	6008	27,99	0,520	1,9%	27,08	28,77	26,43	29,55
TV-66	7040	27,19	0,526	1,9%	26,26	27,96	25,61	28,77
TV-77	8259	26,49	0,550	2,1%	25,51	27,33	24,84	28,14
TV-86	9220	25,89	0,556	2,1%	24,89	26,72	24,22	27,56
TV-109	11.727	24,56	0,557	2,3%	23,53	25,41	22,89	26,23
Ordenada en el origen (A)		6,4706	0,1220	1,9%	6,2561	6,6500	6,1046	6,8366
Pendiente (B)		-0,0969	0,0032	-3,3%	-0,1014	-0,0919	-0,1064	-0,0873
r ²		0,9901	0,0022	0,2%	0,9868	0,9828	0,9835	0,9967

Distribución de pesos moleculares de una preparación de acetato de glatirámero. Se determinó el peso molecular para un lote de acetato de glatirámero (BN 90995). La Tabla 11 resume los datos obtenidos de 16 determinaciones en columnas calibradas con marcador TV.

5 **Tabla 11a. TR del acetato de glatirámero (BN 90995)**

	Media	DS	DSR%
Pico	26,208	0,434	1,66
-2 DS (2,5%)	19,865	0,528	2,66
-1 DS (16%)	22,578	0,477	2,11
+1 DS (84%)	28,934	0,324	1,12

Tabla 11b. TRR del acetato de glatirámero (BN 90995)

	Media	DS	DSR%
Pico	0,664	0,014	2,09
-2 DS (2,5%)	0,503	0,016	3,09
-1 DS (16%)	0,572	0,015	2,54
+1 DS (84%)	0,733	0,011	1,53

Tabla 11c. PM (Daltons) del acetato de glatirámero (BN 90995)

Fecha	Media	DS	DSR%
Pico	7459	146	1,95
-1 DS (16%)	16.622	466	2,80
+1 DS (84%)	4089	77	1,89

10 La aplicación de un peso molecular y un grupo de marcadores de secuencia definida para la calibración de la columna de Superosa 12 tiene varias ventajas sobre los marcadores de pesos moleculares de acetato de glatirámero usados actualmente.

Primero, el uso de síntesis en fase sólida asegura la consistencia entre las diversas preparaciones de cada lote. Los resultados de la espectroscopia de masas (Tabla 3) confirmaron la reproducibilidad de la síntesis. Esta consistencia proporciona una precisión mejorada en las determinaciones de los pesos moleculares.

15 Segundo, la calibración actual está basada en la determinación del TRR al 50% del área del pico para cada uno de los marcadores de pesos moleculares de acetato de glatirámero. Los nuevos marcadores eluyen en forma de picos agudos.

Su uso en calibración es más preciso que el tiempo de retención calculado al 50% del área de un pico ancho.

20 Tercero, el uso de marcadores con pesos moleculares definidos mediante secuencias predeterminadas excluye cualquier incertidumbre que pueda acompañar al uso de los marcadores cuyo peso molecular está determinado por una medida inexacta de las propiedades físicas.

Cuarto, el procedimiento de calibración facilita la normalización de columnas para las determinaciones de los pesos moleculares, independientemente de cambios menores entre lotes, edad o instrumentación de las columnas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.

5 <120> POLIPÉPTIDOS RELACIONADOS CON EL COPOLÍMERO 1 PARA SU USO COMO MARCADORES DE PESOS MOLECULARES Y PARA SU USO TERAPÉUTICO

<130> P1594 EP/2 S3

<140>

10 <141> 24-09-1999

<150> Documento US 60/101,693

<151> 25-09-1998

15 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

20 <211> 35

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

25 <221> Fuente

<222> (1)..(35)

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 1

Ala Lys Lys Tyr Ala Lys Lys Glu Lys Ala Ala Lys Lys Ala Tyr Lys
1 5 10 15

Lys Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala
20 25 30

30 Tyr Glu Ala
35

<210> 2

35 <211> 45

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

40 <221> Fuente

<222> (1)..(45)

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 2

Ala Lys Lys Tyr Ala Lys Lys Ala Lys Ala Glu Lys Ala Lys Lys Ala
1 5 10 15

Tyr Lys Ala Ala Glu Ala Lys Lys Ala Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Ala
20 25 30

Ala Glu Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Tyr Glu Ala
35 40 45

45 <210> 3

<211> 56

<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

5 <220>
<221> Fuente
<222> (1)..(56)
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 3

10 Ala Lys Lys Tyr Ala Lys Lys Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Lys Ala Glu
1 5 10 15
Lys Ala Ala Lys Lys Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Lys Ala Ala Glu Ala
20 25 30
Lys Lys Lys Ala Glu Ala Lys Tyr Lys Ala Glu Ala Ala Lys Ala Ala
35 40 45
Ala Lys Glu Ala Ala Tyr Glu Ala
50 55

15 <210> 4
<211> 66
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

20 <220>
<221> Fuente
<222> (1)..(66)
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 4

25 Ala Lys Lys Tyr Ala Lys Lys Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Ala Lys Lys
1 5 10 15
Ala Glu Ala Lys Ala Ala Lys Lys Ala Lys Ala Glu Ala Lys Lys Tyr
20 25 30
Ala Lys Ala Ala Lys Ala Glu Lys Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Tyr Lys Ala Glu Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Tyr
50 55 60
Glu Ala
65

30 <210> 5
<211> 77
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

35 <220>
<221> Fuente
<222> (1)..(77)
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 5

Ala Lys Lys Tyr Ala Lys Lys Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Lys Ala Glu
 1 5 10 15
 Lys Ala Ala Lys Lys Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Lys Ala Ala Glu Ala
 20 25 30
 Lys Lys Lys Ala Lys Ala Glu Ala Lys Lys Tyr Ala Lys Ala Ala Lys
 35 40 45
 Ala Glu Lys Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Glu Ala Lys Tyr Lys Ala Glu
 50 55 60
 Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Tyr Glu Ala
 65 70 75

5 <210> 6
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

10 <220>
 <221> Fuente
 <222> (1)..(86)
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 6
 Ala Lys Lys Tyr Ala Lys Lys Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Lys Ala Glu
 1 5 10 15
 Lys Ala Ala Lys Lys Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Lys Ala Ala Glu Ala
 20 25 30
 Lys Lys Lys Ala Lys Ala Glu Ala Lys Lys Tyr Ala Lys Ala Ala Lys
 35 40 45
 Ala Glu Lys Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Glu Ala Lys Tyr Lys Ala Glu
 50 55 60
 Ala Ala Lys Lys Ala Tyr Lys Ala Glu Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys
 65 70 75 80

15 Glu Ala Ala Tyr Glu Ala
 85

20 <210> 7
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

25 <220>
 <221> Fuente
 <222> (1)..(109)
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 7

ES 2 408 706 T3

Ala	Lys	Lys	Tyr	Ala	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Ala	Tyr	Ala	Lys	Lys	Ala
1				5					10					15	
Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Lys	Lys	Ala	Tyr	Ala	Lys	Lys	Glu	Ala	Lys	Ala
			20					25					30		
Tyr	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Lys	Ala	Lys	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys
		35					40					45			
Tyr	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Lys	Lys	Glu	Ala	Tyr	Lys	Ala	Glu
	50					55					60				
Ala	Lys	Lys	Tyr	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Ala	Glu	Lys	Lys	Glu	Tyr	Ala
65					70					75					80
Ala	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ala	Glu
				85					90					95	
Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Tyr	Glu	Ala			
			100						105						

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un producto farmacéutico que comprende acetato de glatirámero que tiene un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 13.000 Daltons, procedimiento que comprende las etapas de
 - 5 obtener una preparación de acetato de glatirámero;
 - 5 determinar el peso molecular medio de la preparación de acetato de glatirámero usando un aparato cromatográfico que se calibra usando una pluralidad de marcadores de pesos moleculares para establecer una relación lineal entre el tiempo de retención de los marcadores de pesos moleculares en el aparato cromatográfico y el log del peso molecular de los marcadores de pesos moleculares, en el que cada uno de los marcadores de pesos moleculares es un polipéptido que consiste en alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina y que tiene una
 - 10 secuencia de aminoácidos predeterminada y un peso molecular definido;
 - 10 y usar la preparación de acetato de glatirámero para preparar el producto farmacéutico si la preparación de acetato de glatirámero tiene un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 13.000 Daltons.
2. Un procedimiento para certificar acetato de glatirámero para su uso en un producto farmacéutico que comprende acetato de glatirámero que tiene un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 13.000 Daltons, procedimiento
 - 15 que comprende las etapas de
 - 20 determinar el peso molecular medio del acetato de glatirámero usando un aparato cromatográfico que se calibra usando una pluralidad de marcadores de pesos moleculares para establecer una relación lineal entre el tiempo de retención de los marcadores de pesos moleculares en el aparato cromatográfico y el log del peso molecular de los marcadores de pesos moleculares, en el que cada uno de los marcadores de pesos moleculares es un polipéptido que consiste en alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina y que tiene una secuencia de aminoácidos predeterminada y un peso molecular definido; y
 - 20 certificar el acetato de glatirámero para su uso en el producto farmacéutico si el acetato de glatirámero tiene un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 13.000 Daltons.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que en los marcadores de pesos moleculares la fracción molar de alanina es de 0,38 a 0,5, de ácido glutámico es de 0,13 a 0,15, de tirosina es de 0,08 a 0,10 y de lisina es de 0,3 a 0,4.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que en los marcadores de pesos moleculares la fracción molar de alanina es de 0,422 a 0,444, de ácido glutámico es de 0,133 a 0,143, de tirosina es de 0,086 a 0,093 y de lisina es de 0,333 a 0,349.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el aparato cromatográfico es una
 - 30 columna de cromatografía en gel permeable.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el aparato cromatográfico es una columna TSK, una columna de Sephadex, una columna de Sepharosa o una columna de Superosa.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que uno de los marcadores de pesos
 - 35 moleculares es:
 - AKKYAKKEKAAKKAYKKEAKAKAAEAAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 1);
 - AKKYAKKAKAEKAKKAYAAEAKKAAKYEKAAAEEKAAKEAAYEA (SEQ ID NO: 2);

**AKKYAKKEKAYAKKAÆKAACKAÆAKAYKAAEAKKKAEAKYKAEAAKAAA
KEAA YEA (SEQ ID NO: 3);**

**AKKYAKKEKAYAKAKKAÆAKAACKKAKAÆAKKYAKAAKAÆEKKEYAAAÆAK
YKAEAAKAAAKEAA YEA (SEQ ID NO: 4);**

**AKKYAKKEKAYAKKAÆKAACKAÆAKAYKAAEAKKKAKAÆAKKYAKAAKA
EKKEYAAAÆAKYKAEAAKAAAKEAA YEA (SEQ ID NO: 5);**

**AKKYAKKEKAYAKKAÆKAACKAÆAKAYKAAEAKKKAKAÆAKKYAKAAKA
EKKEYAAAÆAKYKAEAAKKAYKAEAAKAAAKEAA YEA (SEQ ID NO: 6); or**

**AKKYAKKAÆKAYAKKAKAAKEKKAYAKKEAKAYKAAEAKKKAKAÆAKKY
AKEAAKAKKEAYKAEAKKYAKAAKAÆEKKEYAAAÆAKKAÆAAKAYKAEAAK
A AAKEAA YEA (SEQ ID NO: 7),**

en los que A representa alanina, K representa lisina, Y representa tirosina y E representa ácido glutámico.

8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la pluralidad de marcadores de pesos moleculares es:

AKKYAKKEKAAKKAYKKEAKAKAAEAAAKEAA YEA (SEQ ID NO: 1);

AKKYAKKAKAÆKAKKAYKAAEAKKAAKYEKAAAÆKAAAKEAA YEA (SEQ ID NO: 2);

**AKKYAKKEKAYAKKAÆKAACKAÆAKAYKAAEAKKKAEAKYKAEAAKAAA
KEAA YEA (SEQ ID NO: 3);**

**AKKYAKKEKAYAKAKKAÆAKAACKKAKAÆAKKYAKAAKAÆEKKEYAAAÆAK
YKAEAAKAAAKEAA YEA (SEQ ID NO: 4);**

**AKKYAKKEKAYAKKAÆKAACKAÆAKAYKAAEAKKKAKAÆAKKYAKAAKA
EKKEYAAAÆAKYKAEAAKAAAKEAA YEA (SEQ ID NO: 5);**

**AKKYAKKEKAYAKKAÆKAACKAÆAKAYKAAEAKKKAKAÆAKKYAKAAKA
EKKEYAAAÆAKYKAEAAKKAYKAEAAKAAAKEAA YEA (SEQ ID NO: 6); y**

**AKKYAKKAÆKAYAKKAKAAKEKKAYAKKEAKAYKAAEAKKKAKAÆAKKY
AKEAAKAKKEAYKAEAKKYAKAAKAÆEKKEYAAAÆAKKAÆAAKAYKAEAAK
A AAKEAA YEA (SEQ ID NO: 7),**

en los que A representa alanina, K representa lisina, Y representa tirosina y E representa ácido glutámico.

Distribución de L-alanina en los marcadores TV

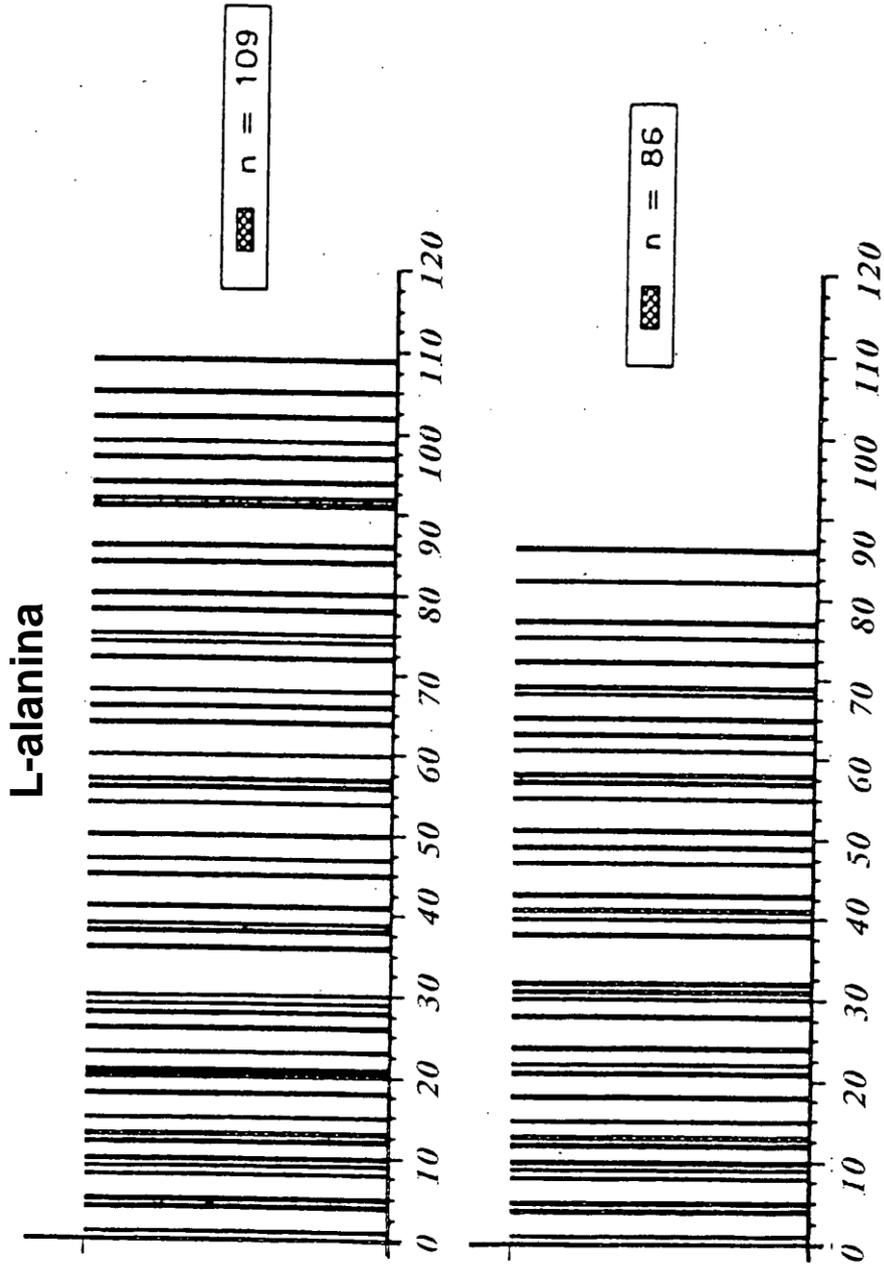


FIGURA 1a-1

FIGURA 1a-2

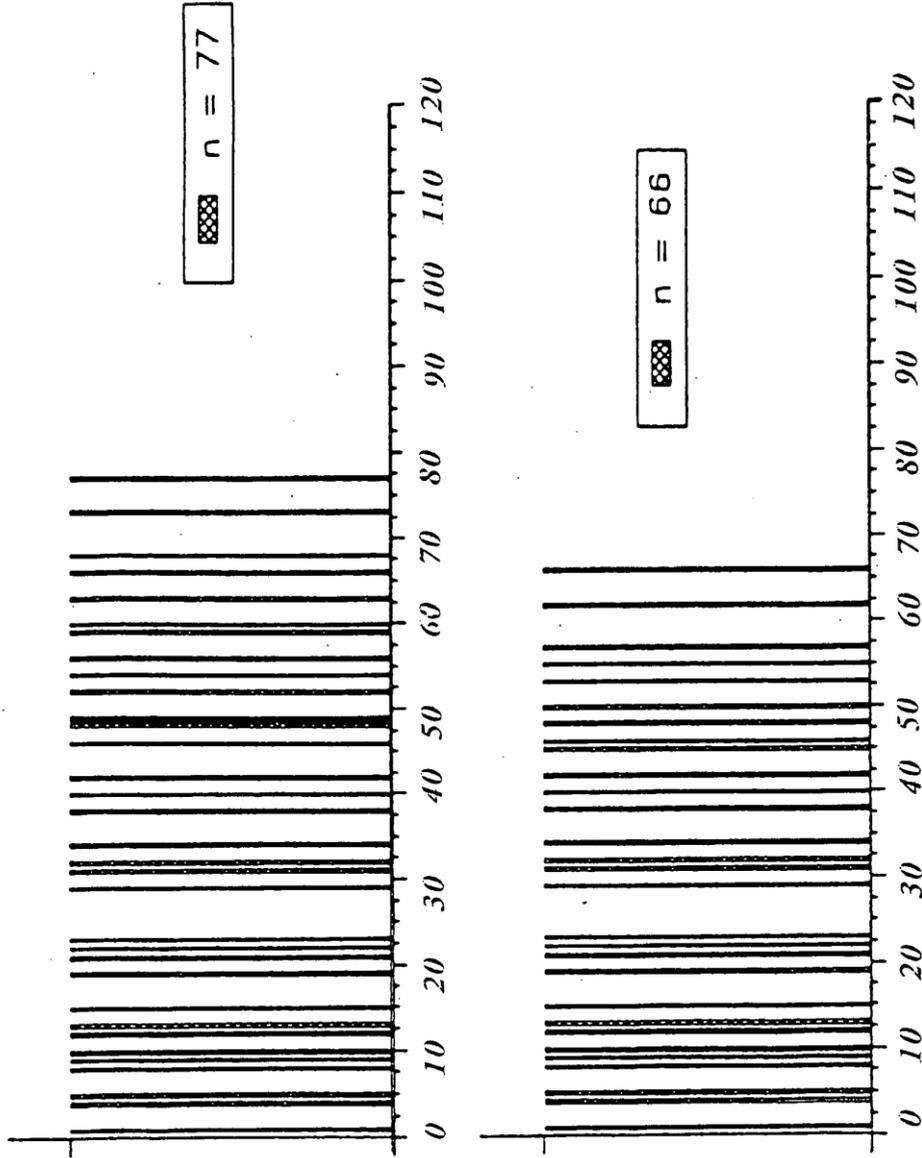
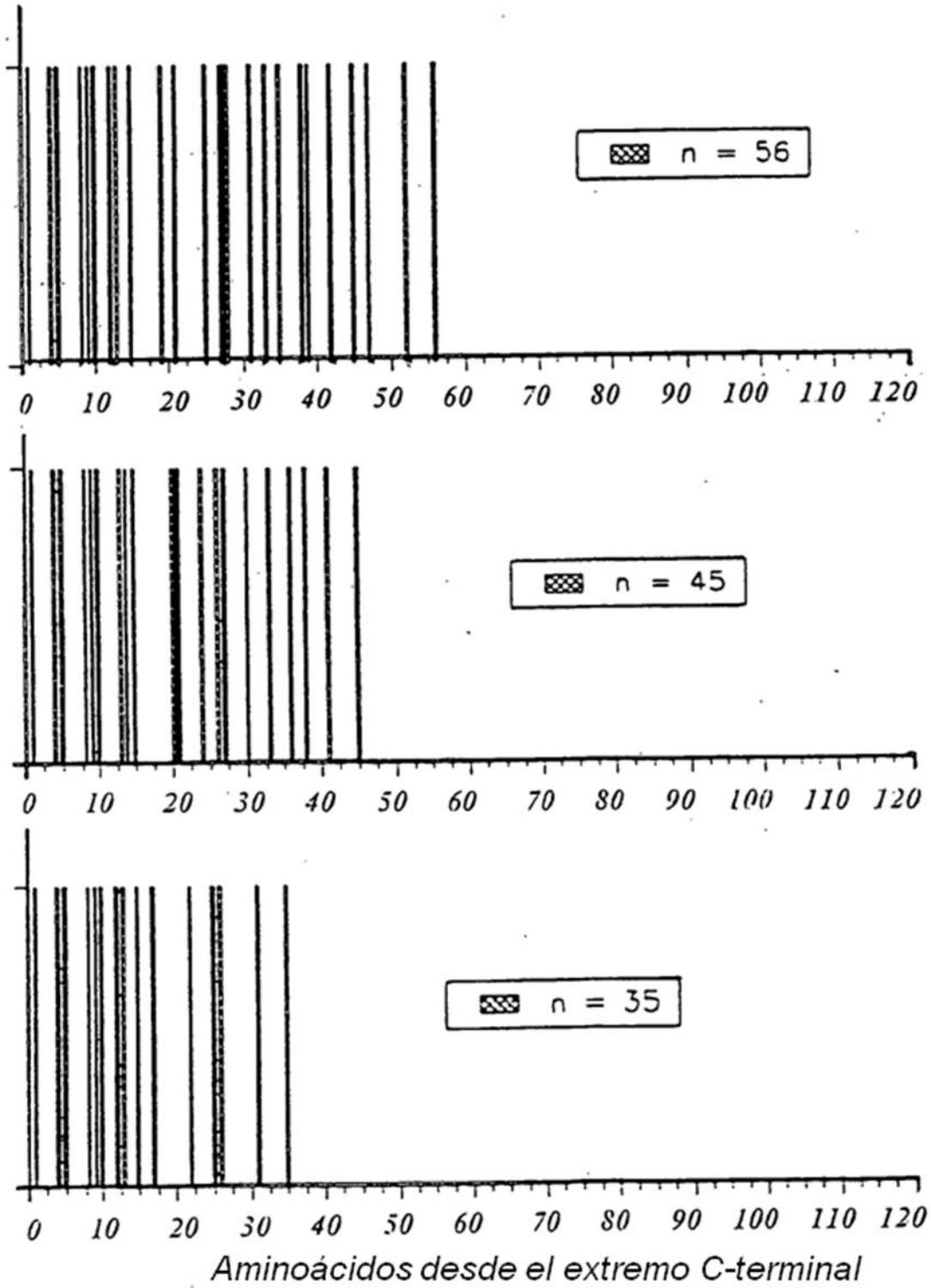


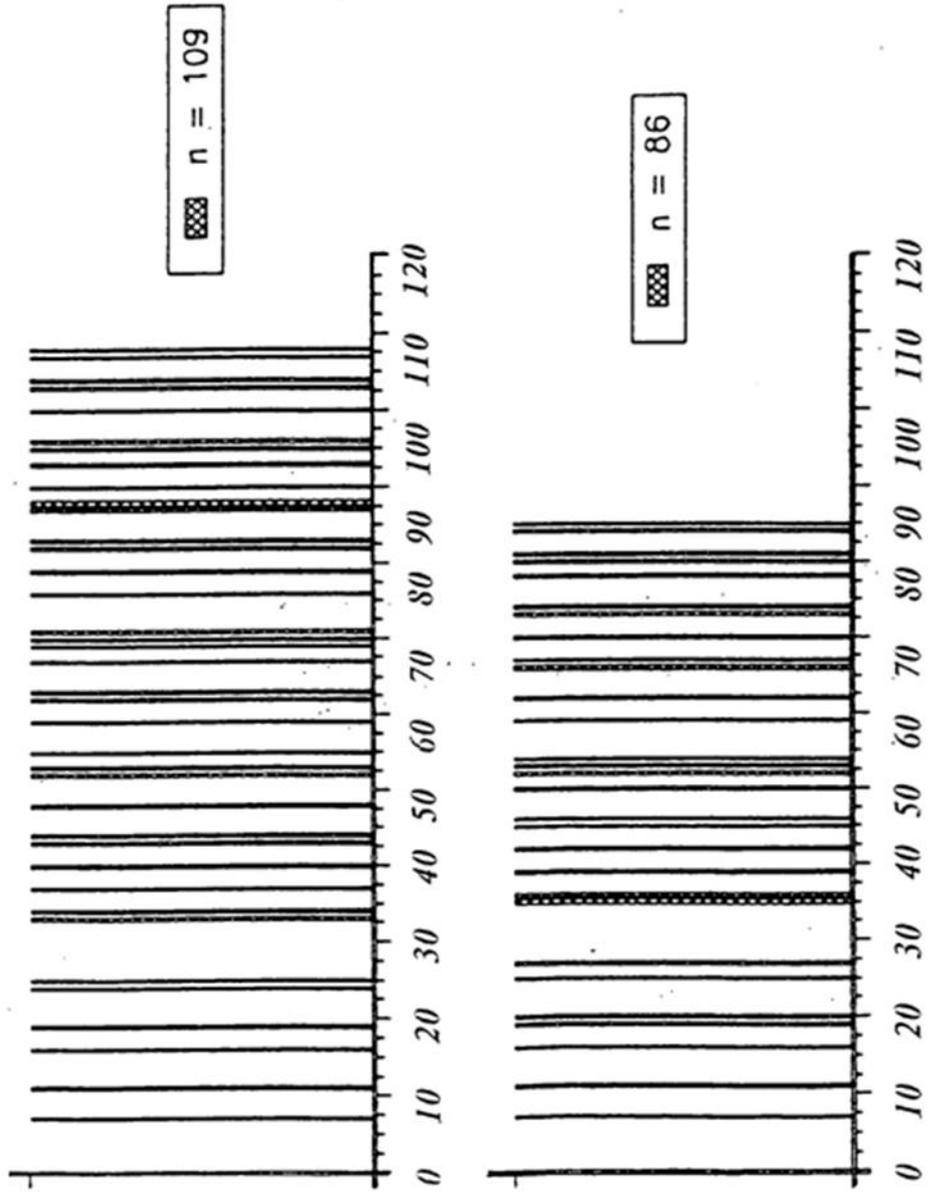
FIGURA 1a-3



Distribución de L-lisina en los marcadores TV

FIGURA 1b-1

L-lisina



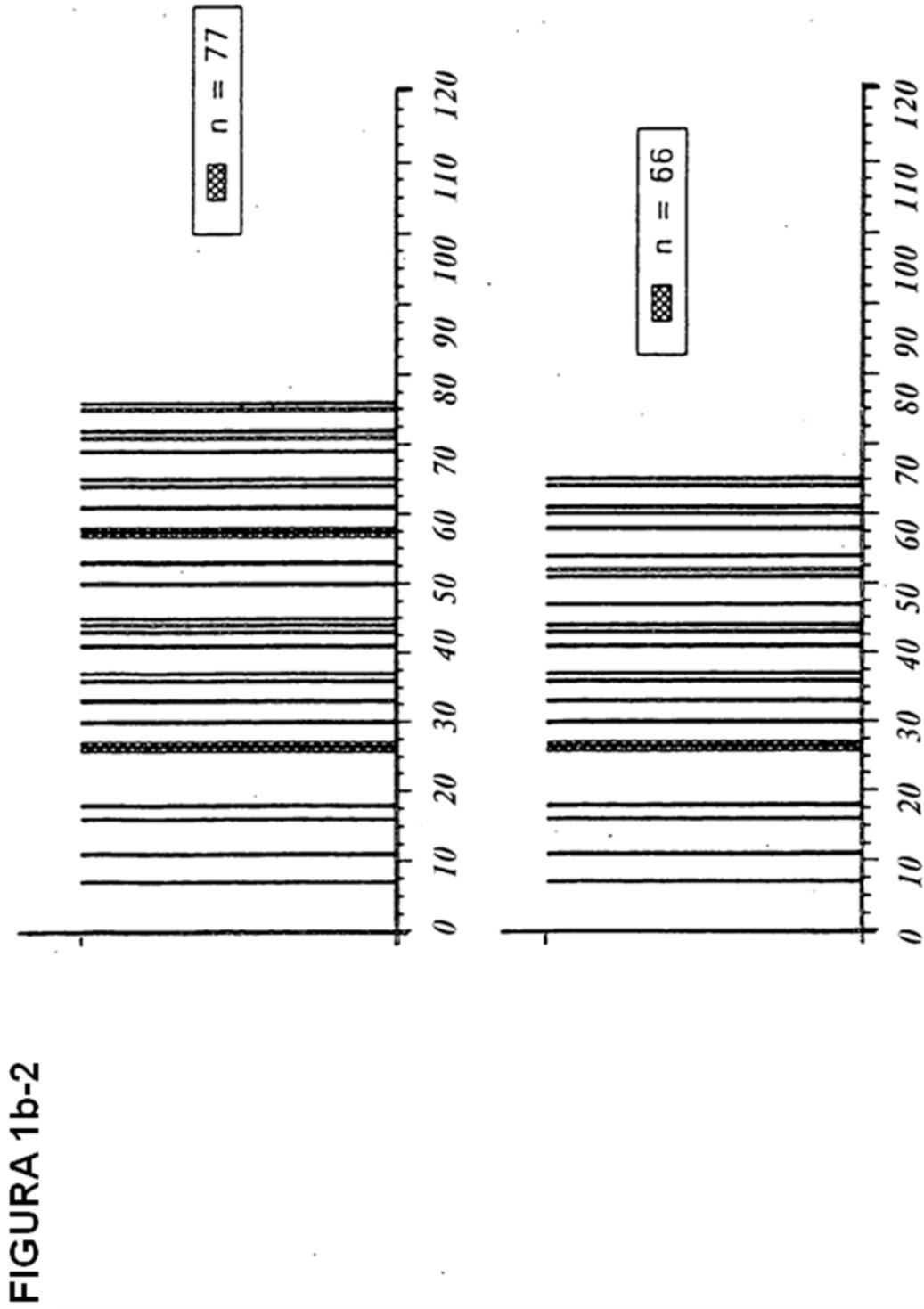


FIGURA 1b-3

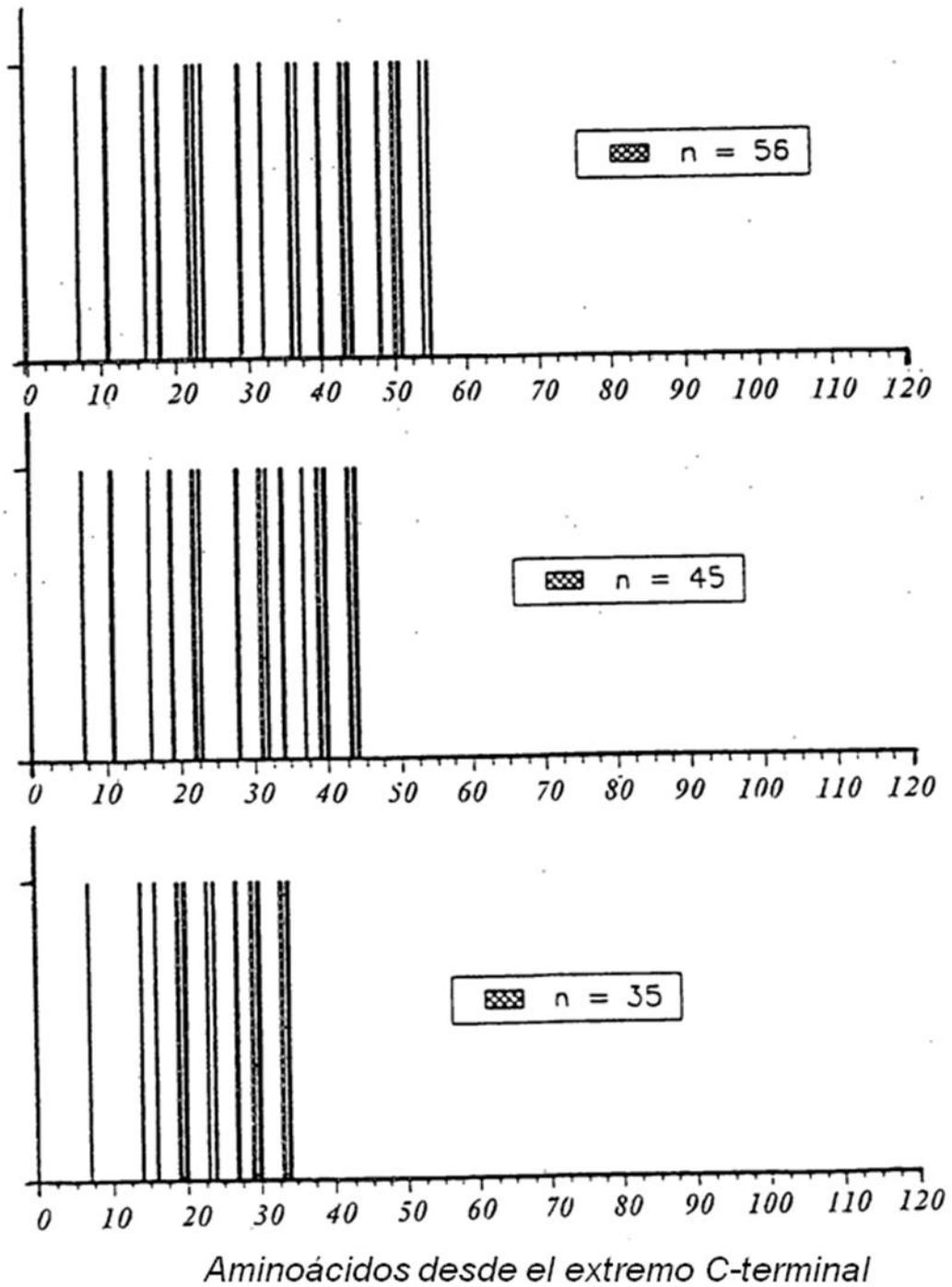


FIGURA 1c-1 Distribución de ácido L-glutámico en los marcadores TV

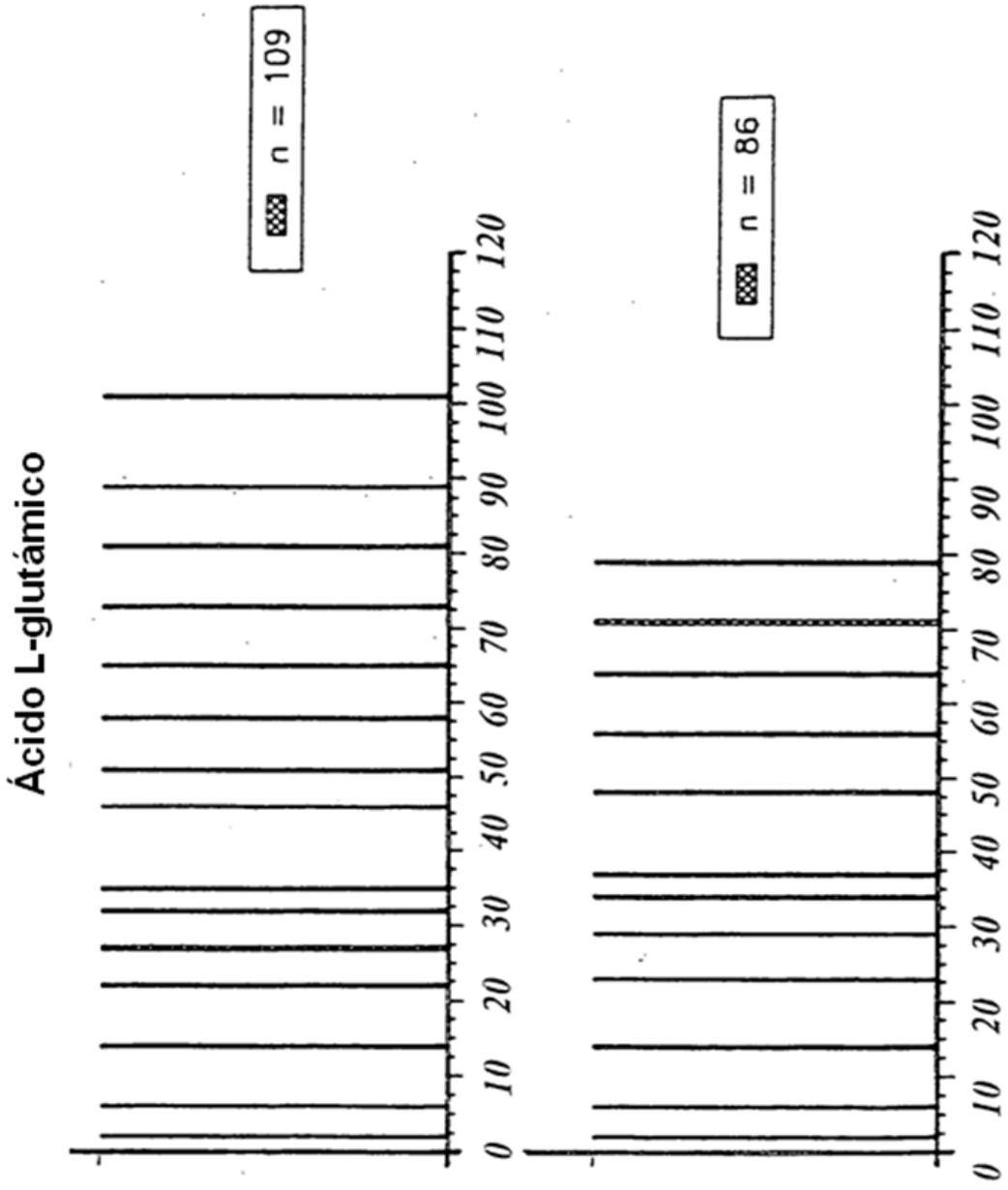


FIGURA 1c-2

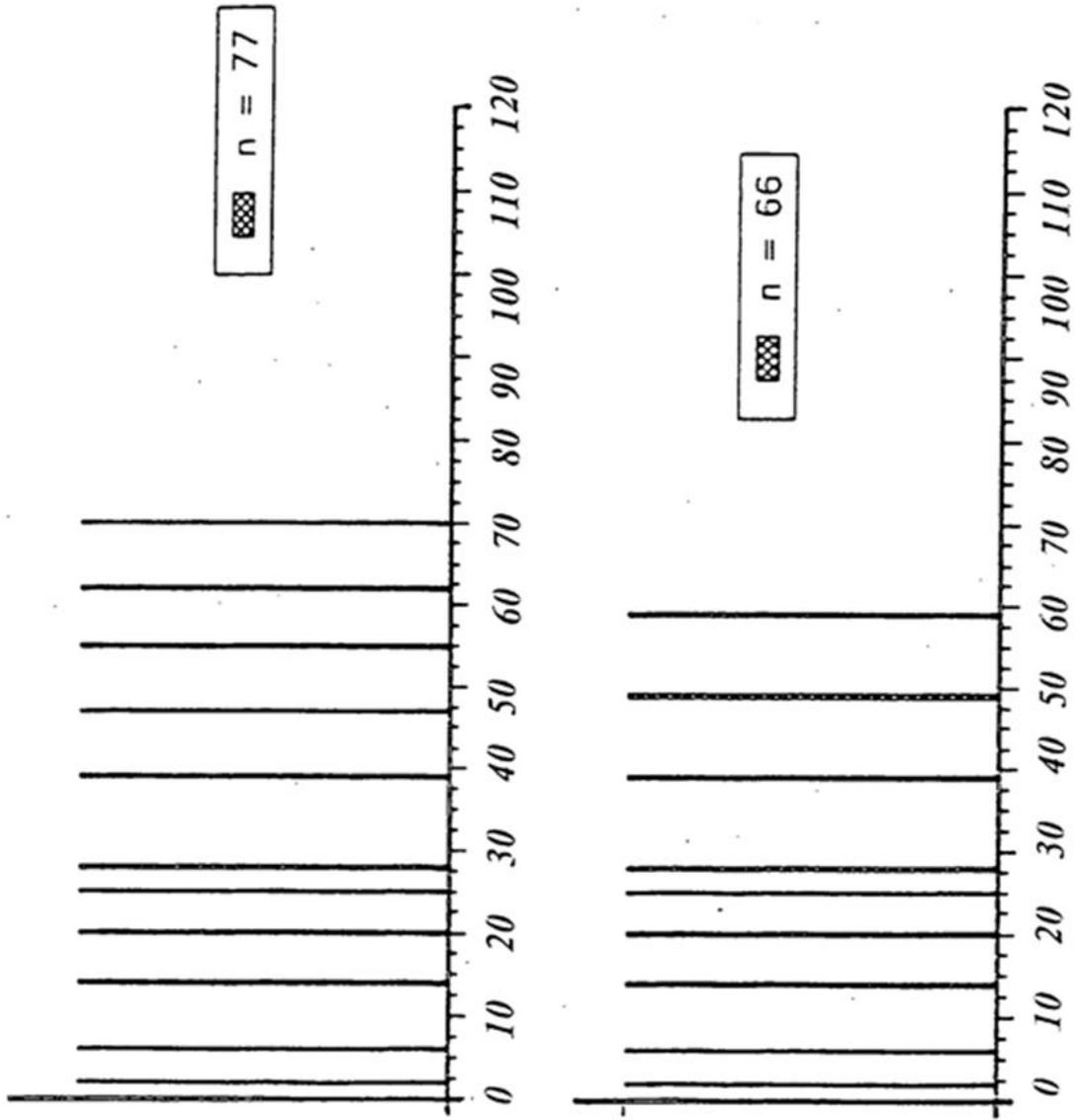


FIGURA 1c-3

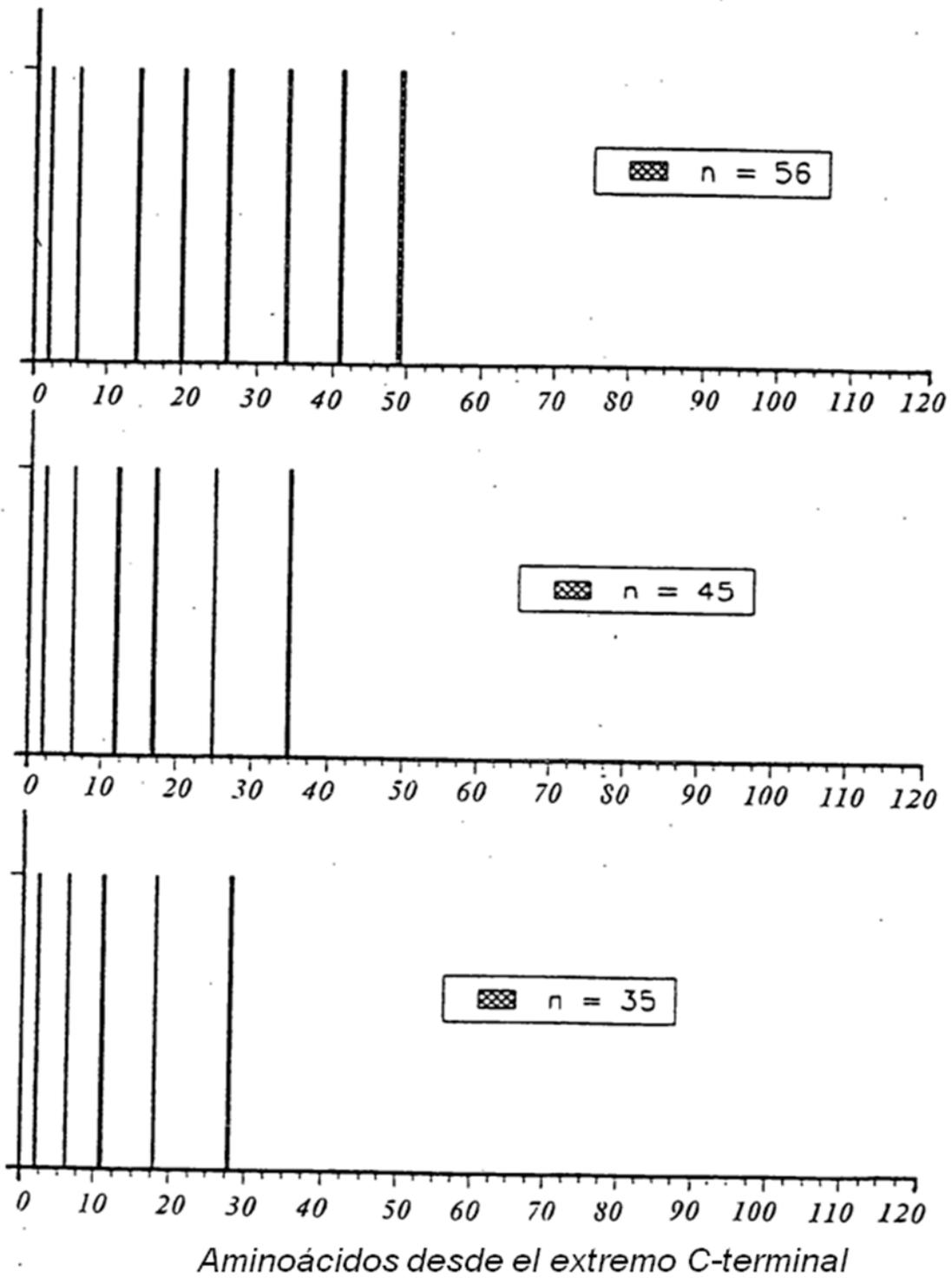


FIGURA 1d-1 Distribución de L-tirosina en los marcadores TV

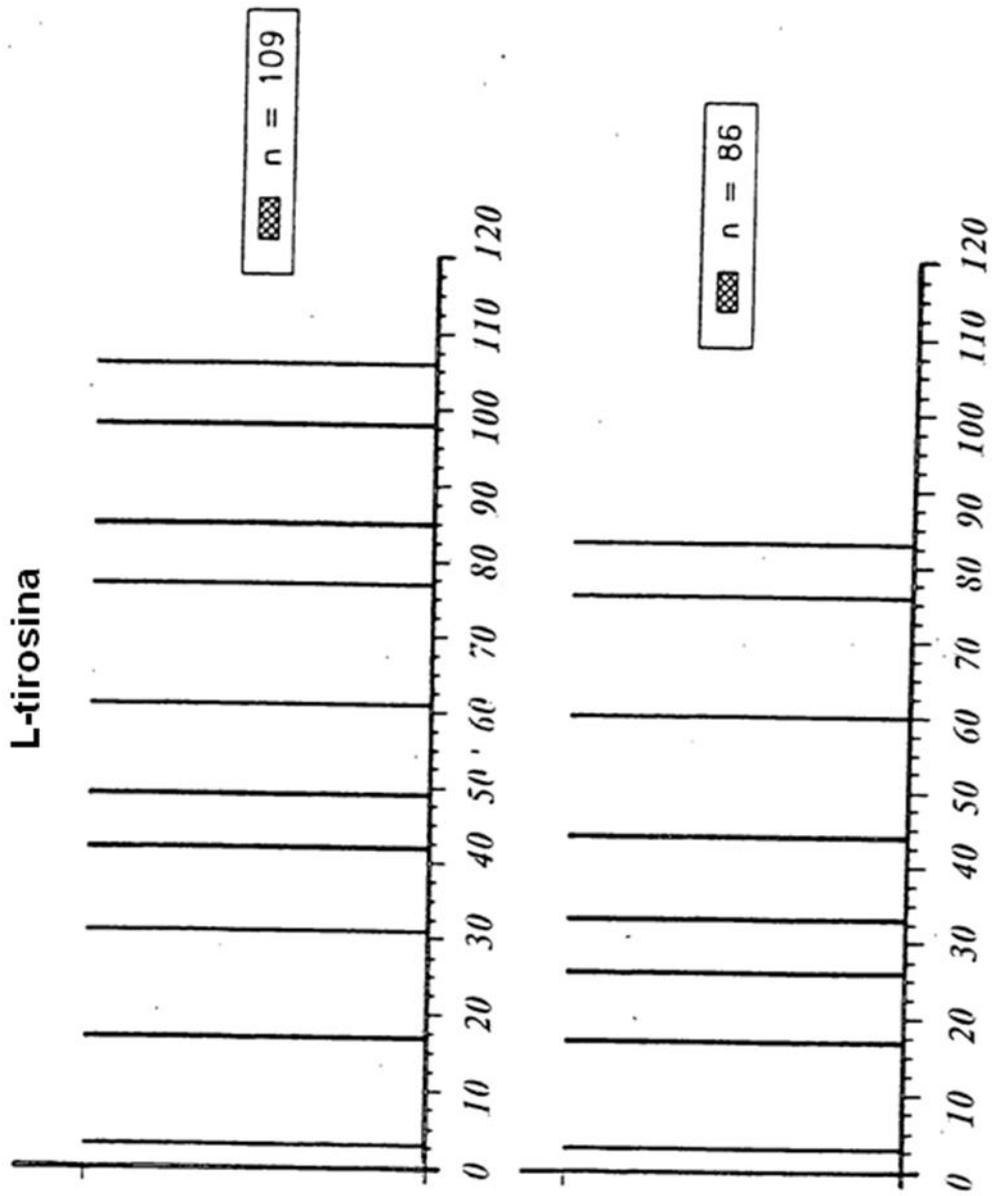


FIGURA 1d-2

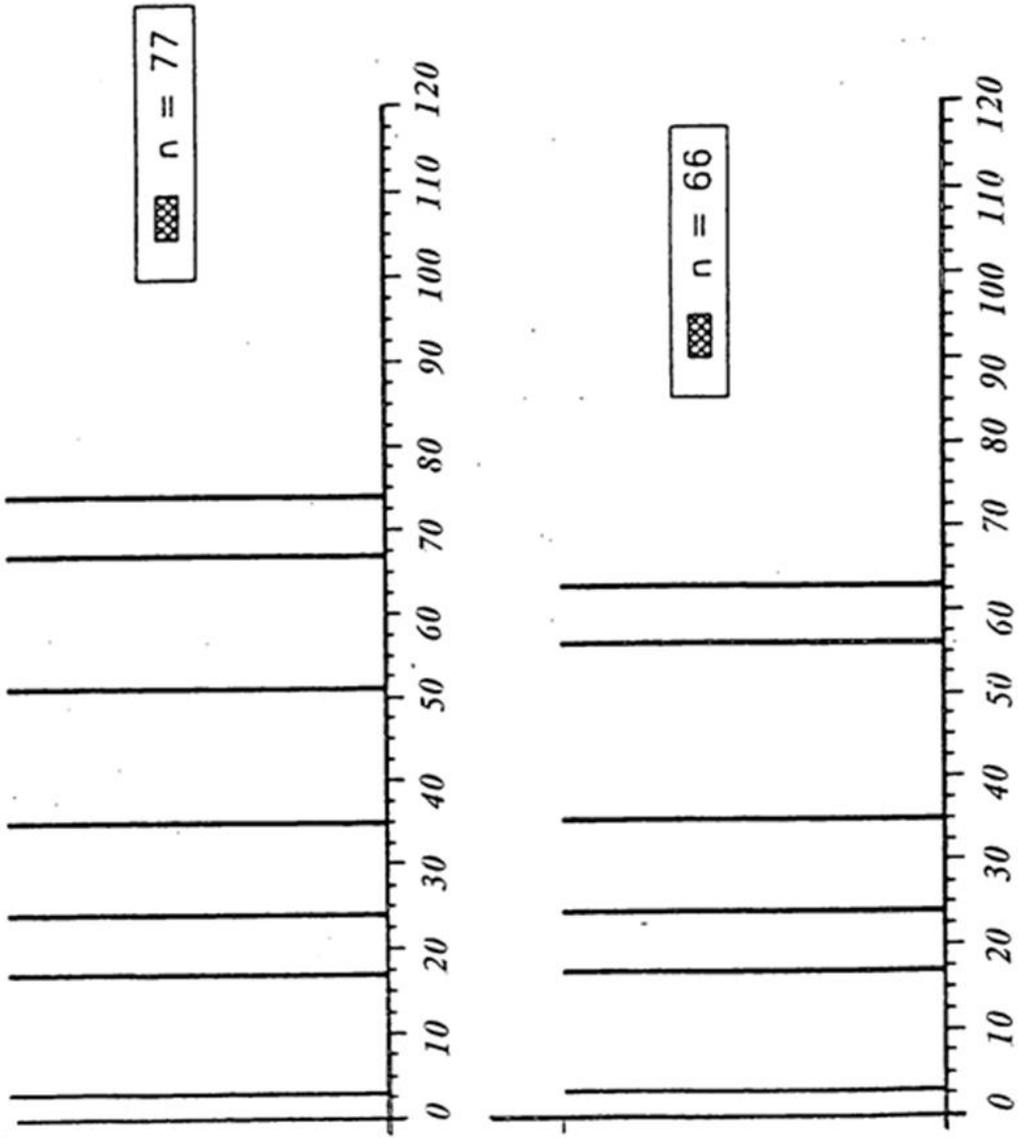
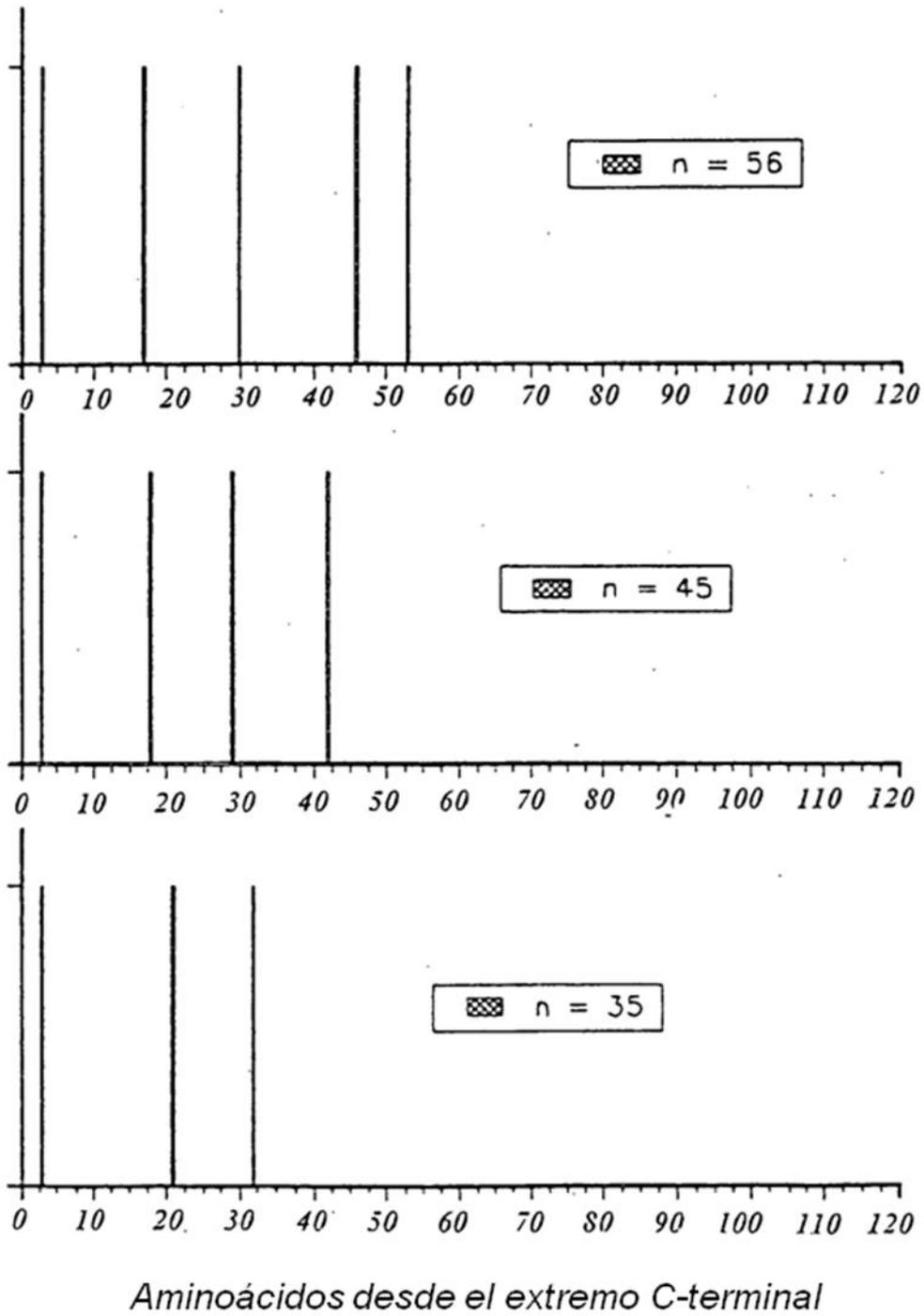


FIGURA 1d-3



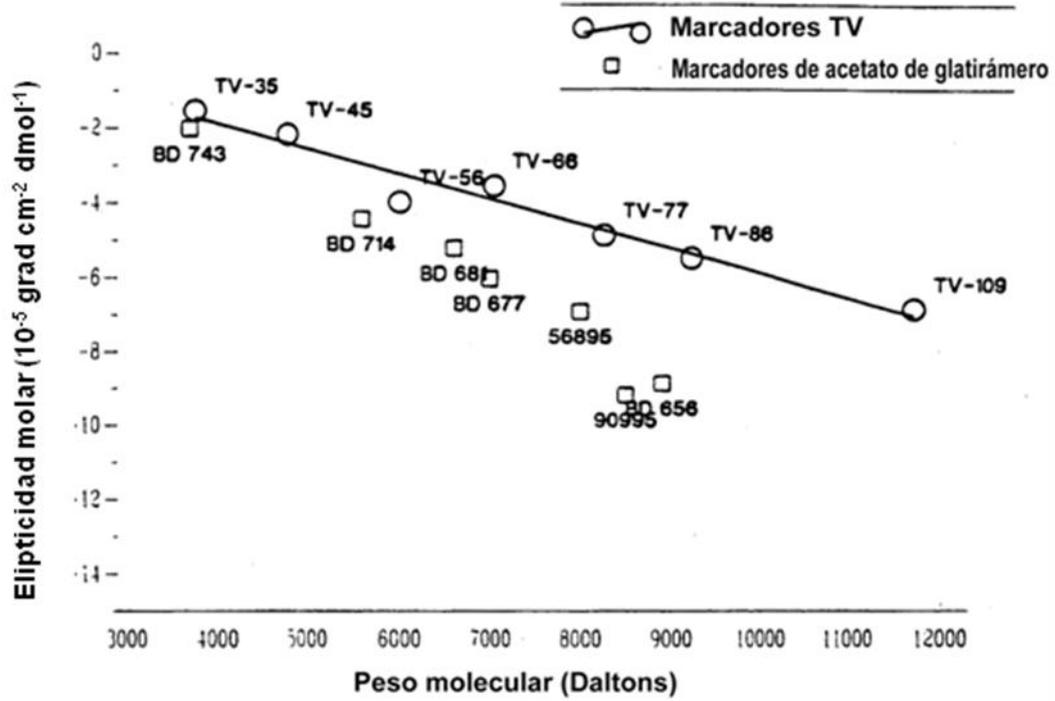


Figura 2. Elipticidad de los marcadores TV y de los marcadores de pesos moleculares de acetato de glatirámtero usados actualmente en función de sus pesos moleculares. Los valores CD experimentales se presentan a continuación.

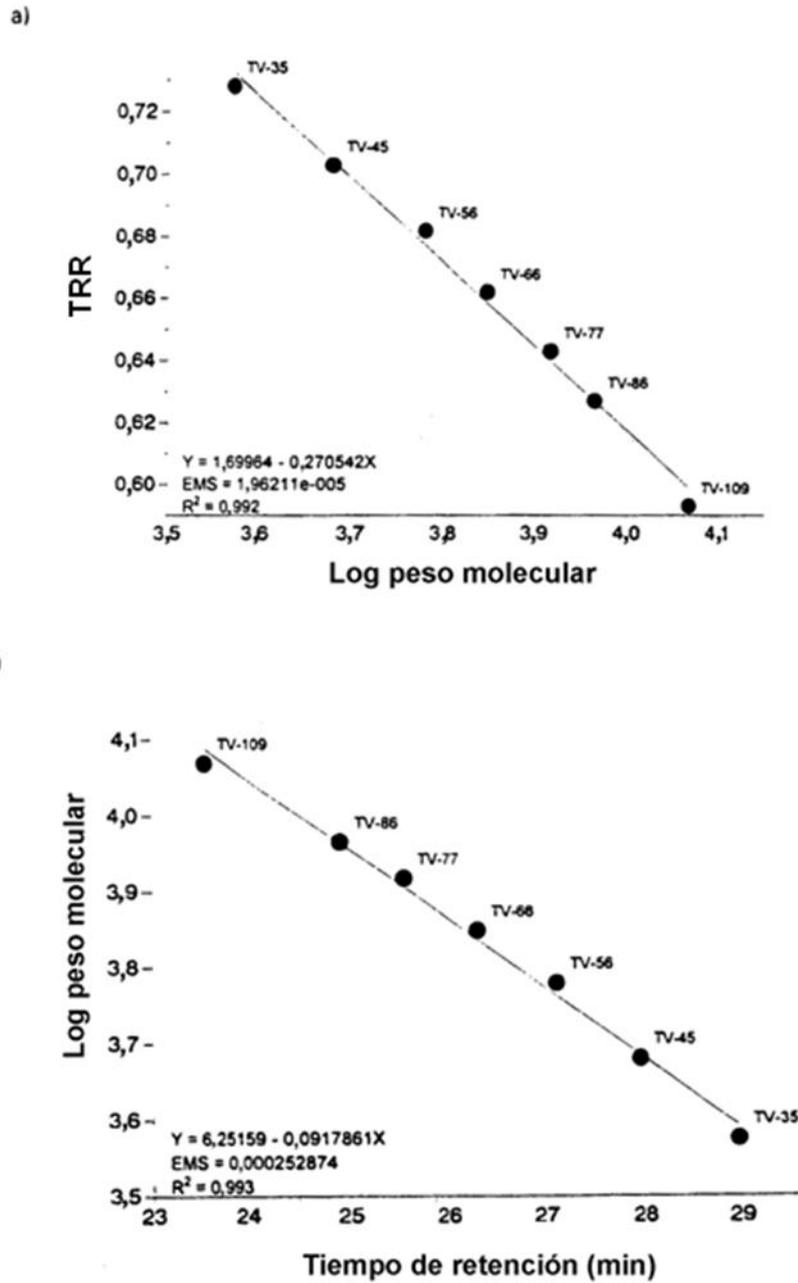
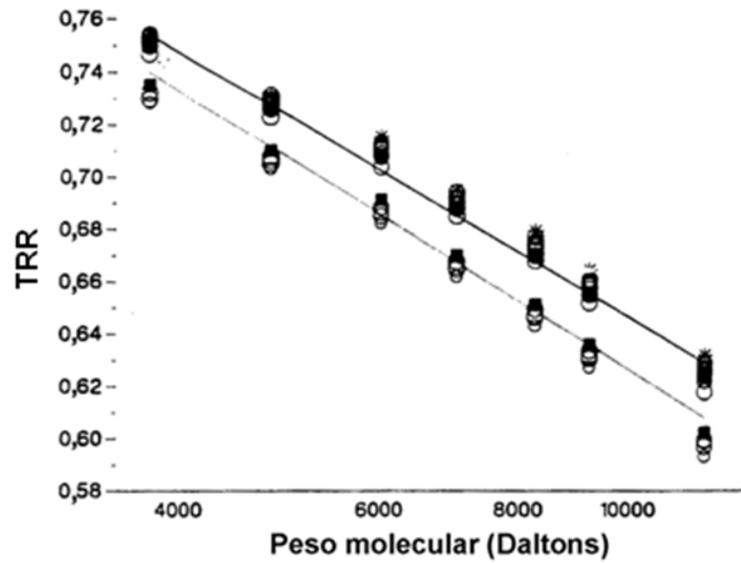


Fig. 3. Calibración de una columna de Superosa 12 con el grupo de 7 marcadores TV presentados calculada con el algoritmo basado en el TRR (a) y el algoritmo basado en Millennium (b).

a.



b.

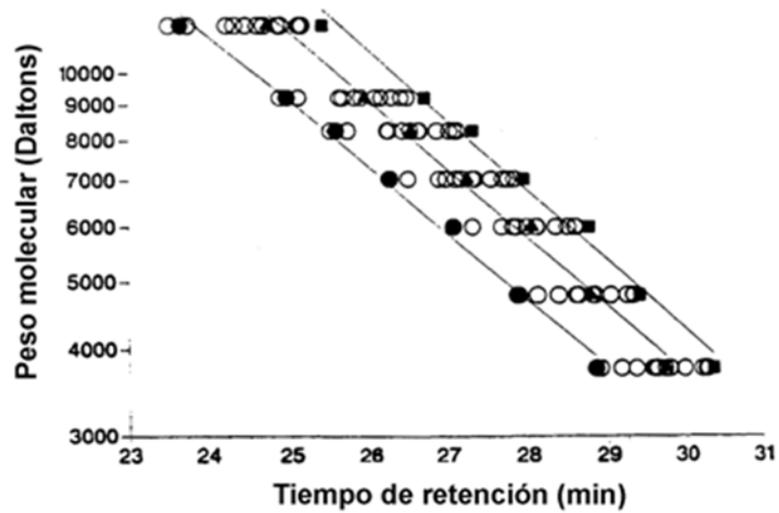


Fig. 4. Resumen de las calibraciones con marcadores TV en dos laboratorios TEVA. Los datos se obtuvieron en 16 columnas probadas entre abril de 1997 y febrero de 1998. Para cada una de las 16 columnas probadas se usan en la presentación los valores medios. Las calibraciones se presentan en el algoritmo TRR (a) usado actualmente y el algoritmo basado en Millennium (b).

Fig. 5

