

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 035**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2007 E 07761581 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2013628**

54 Título: **Métodos para evaluar mezclas de péptidos**

30 Prioridad:

**28.04.2006 US 746018 P**

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

**30.03.2016**

73 Titular/es:

**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
675 WEST KENDALL STREET  
CAMBRIDGE, MA 02142-1110, US**

72 Inventor/es:

**SHRIVER, ZACHARY;  
VENKATARAMAN, GANESH;  
LANSING, JONATHAN, C.;  
BAUER, CORINNE y  
ZHU, XIANGPING**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 565 035 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para evaluar mezclas de péptidos.

**Campo técnico**

5 La materia divulgada ahora se refiere generalmente a métodos para caracterizar péptidos, mezclas de péptidos y mezclas de polipéptidos. Más particularmente, la materia divulgada ahora se refiere a métodos para caracterizar mezclas complejas de péptidos o polipéptidos que comprenden ácido glutámico, alanina, tirosina y lisina, incluyendo, pero no limitados a, métodos para identificar, aislar, cuantificar y purificar aminoácidos, péptidos, polipéptidos y combinaciones de los mismos, que tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en al menos un extremo de los mismos.

10 **Antecedentes**

El Copolímero-1 es una mezcla compleja de polipéptidos preparada a partir de la polimerización de los aminoácidos ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina. El Copolímero-1 también se conoce como acetato de glatiramer (N° CAS 147245-92-9) y tiene la siguiente fórmula estructural:



15  $(C_5H_9NO_4 \cdot C_3H_7NO_2 \cdot C_6H_{14}N_2O_2 \cdot C_9H_{11}NO_3)_x \cdot XC_2H_4O_2$

Véase Physician's Desk Reference, Thomson PDR, Montvale, Nueva Jersey, p. 3297 (2007).

El acetato de glatiramer (GA, por sus siglas en inglés) es el ingrediente activo de COPAXONE® (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Israel), que comprende las sales de acetato de polipéptidos sintéticos que contienen aminoácidos naturales: ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, con una fracción molar media presentada de 0,141, 0,427, 0,095 y 0,338, respectivamente. *Id.* El acetato de glatiramer se ha usado mucho en el tratamiento de la esclerosis múltiple y se ha observado clínicamente que reduce la tasa de recidiva en personas con la forma recidivante-recurrente de la esclerosis múltiple (RRMS, por sus siglas en inglés).

Pruebas analíticas que se pueden usar para caracterizar el acetato de glatiramer son beneficiosas para definir la estructura de esta mezcla de péptidos compleja y mezclas de péptidos complejas similares. Tales métodos analíticos son útiles para analizar las propiedades o la calidad de un lote particular de la mezcla, para analizar fases intermedias en la preparación de acetato de glatiramer o para identificar y aislar componentes biorreactivos de una mezcla compleja o componentes distintivos del procedimiento para elaborar los mismos. Así, existe una necesidad en la técnica de pruebas analíticas que se puedan usar para caracterizar acetato de glatiramer y mezclas de péptidos complejas similares. La materia divulgada ahora se dirige, en todo o en parte, a estas y otras necesidades de la técnica.

El documento WO 2006/029411 A2 describe una composición que comprende una mezcla de polipéptidos, en donde cada polipéptido (a) es un copolímero de los aminoácidos ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina y (b) puede estar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable; y en donde en la mezcla (i) los polipéptidos tienen un peso molecular medio en el intervalo de 13.500 a 18.500 daltons, (ii) de 13% a 38% de los polipéptidos tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en un extremo de los mismos y (iii) 68% de los polipéptidos tienen un peso molecular entre 7.000 y 41.000 daltons.

**Breve resumen**

La presente invención se dirige a un método para ensayar una muestra de acetato de glatiramer según se define mediante la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

En algunas realizaciones, la materia ahora divulgada proporciona un método para detectar una modificación de al menos un extremo C de uno o más aminoácidos, péptidos, cadenas polipeptídicas y combinaciones de los mismos en una muestra, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra que se supone que contiene uno o más aminoácidos, péptidos, cadenas polipeptídicas y combinaciones de los mismos que tienen al menos un extremo C modificado; y (b) analizar la muestra mediante un método capaz de detectar una modificación de al menos un extremo C de un aminoácido, péptido, cadenas polipeptídicas y combinaciones de los mismos en la muestra. La muestra puede ser una mezcla de polipéptidos que incluye, pero no se limita a, el Copolímero-1 o precursores poliméricos del mismo (p. ej., los productos intermedios I, II y III mostrados en la Figura 1), el Copolímero-1 derivado o precursores poliméricos del mismo, el Copolímero-1 fragmentado o precursores poliméricos del mismo, el Copolímero-1 fraccionado o precursores poliméricos del mismo y combinaciones de los mismos.

La modificación de al menos un extremo C puede incluir al menos un extremo C de los uno o más aminoácidos, péptidos, cadenas polipeptídicas y combinaciones de los mismos en la muestra que tienen un resto dietilamida unido a los mismos. El método capaz de detectar una modificación de al menos un extremo C de una o más cadenas polipeptídicas en la muestra incluye, pero no se limita a, cromatografía de líquidos, cromatografía iónica,

cromatografía de gases, electroforesis capilar, espectrometría de masas, cromatografía de líquidos/espectrometría de masas, espectroscopía de NMR, un método de detección de anticuerpos, espectroscopía de Raman, espectroscopía infrarroja, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía UV-Vis, electroforesis en gel y combinaciones de los mismos.

5 Los métodos ahora divulgados también pueden incluir despolimerizar o fragmentar la muestra, fraccionar la muestra y purificar la muestra.

En algunas realizaciones, la materia ahora divulgada proporciona un método para ensayar una muestra de Copolímero-1, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra de Copolímero-1, en donde se supone que la muestra de Copolímero-1 comprende uno o más polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos; (b) determinar la presencia o la cantidad de polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos en la muestra de Copolímero-1.

En algunas realizaciones, el método comprende además comparar la cantidad de polipéptidos que tienen un resto dietilamida unidos a un extremo C de los mismos en la muestra de Copolímero-1 con un valor de referencia predeterminado, en donde el valor de referencia incluye, pero no se limita a, un valor de especificación, un valor de control y un valor obtenido a partir de una medida directa de una muestra de referencia de Copolímero-1, tal como acetato de glatiramer, o un precursor polimérico del mismo (p. ej., uno de los productos intermedios I, II y III mostrados en la Figura 1).

Habiéndose indicado anteriormente en la presente memoria ciertos aspectos de la materia ahora divulgada, que son estudiados en todo o en parte por la materia ahora divulgada, otros aspectos se harán evidentes a medida que la descripción avanza cuando se toma en conexión con los Ejemplos y Dibujos adjuntos como se describe mejor posteriormente en la presente memoria.

### Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito la materia ahora divulgada en términos generales, se hará ahora referencia a los dibujos adjuntos, que no necesariamente están dibujados a escala y en donde:

25 la Figura 1 es una ilustración gráfica no limitativa que muestra un procedimiento representativo para producir copolímero-1, es decir, acetato de glatiramer;

la Figura 2 es una ilustración gráfica no limitativa que muestra etapas representativas de la digestión de polipéptidos con una enzima proteasa, p. ej., Glu-C, y la separación de péptidos según una realización de la materia ahora divulgada, en donde los péptidos que tienen un grupo dietilamida en el extremo C en lugar de un grupo carboxilo se aíslan y a continuación se analizan;

la Figura 3 es una ilustración gráfica no limitativa que muestra un aminoácido, p. ej., alanina, y un aminoácido, p. ej., alanina, que tiene un grupo dietilamida en el extremo C en lugar de un grupo carboxilo;

la Figura 4 es una ilustración gráfica no limitativa de un método para purificar polipéptidos, p. ej., acetato de glatiramer, que tienen un grupo dietilamida en el extremo C de un aminoácido en lugar de un grupo carboxilo;

la Figura 5 es una ilustración gráfica no limitativa que muestra el espectro de  $^1\text{H}$  NMR 1D a 600 MHz de una muestra de dipéptido Ala-Ala, en donde un aminoácido alanina tiene un grupo dietilamida en el extremo C en lugar de un grupo carboxilo;

la Figura 6 es una ilustración gráfica no limitativa que muestra el espectro de  $^1\text{H}$  NMR 1D a 600 MHz de una muestra de acetato de glatiramer. El recuadro muestra una expansión centrada en las resonancias de metilo de un resto dietilamida del extremo C;

la Figura 7 es una ilustración gráfica no limitativa que muestra el espectro de  $^1\text{H}$  NMR 1D de una muestra de acetato de glatiramer después de la corrección inicial local y la integración de señales seleccionadas;

las Figuras 8A y 8B son ilustraciones gráficas no limitativas que muestran patrones de fragmentación de MS/MS representativos de dietilamina generada por fragmentación de una muestra de Copolímero-1;

la Figura 8A es una ilustración gráfica no limitativa de un patrón de fragmentación de MS/MS representativo de dietilamina; y

la Figura 8B es una ilustración gráfica no limitativa de un ion con la misma masa que la dietilamina generado mediante fragmentación en la fuente de una muestra de Copolímero-1.

50

### Descripción detallada

La materia ahora divulgada se describirá ahora más a fondo en adelante con referencia a los Dibujos adjuntos, en los que se muestran algunas, pero no todas, las realizaciones de la materia ahora divulgada. Muchas modificaciones y otras realizaciones de la materia ahora divulgada indicadas en la presente memoria se le ocurrirán al experto en la técnica de la que trata la materia ahora divulgada teniendo las ventajas de las enseñanzas presentadas en las descripciones precedentes y los Dibujos asociados. Por lo tanto, se debe entender que la materia ahora divulgada no se limita a las realizaciones específicas divulgadas y que están destinadas a ser incluidas modificaciones y otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se emplean en la presente memoria términos específicos, se usan solamente en un sentido genérico y descriptivo y no con propósitos de limitación.

Los términos "un(a)" "uno" y "el(la)" se refieren a "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Así, por ejemplo, la referencia a "una muestra" incluye una pluralidad de muestras, a menos que el contexto sea claramente contrario (p. ej., una pluralidad de muestras), etc.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende(n)" se usan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto requiera otra cosa.

Se entenderá que, aunque se hace referencia en la presente memoria a un número de solicitudes de patente, patentes y otras referencias, tal referencia no constituye un reconocimiento de que cualquiera de estos documentos forme parte del conocimiento general común de la técnica.

#### I. Consideraciones generales

Los métodos ahora divulgados se pueden usar para caracterizar uno o más péptidos, mezclas de péptidos y/o mezclas de polipéptidos, incluyendo, pero no limitados a, copolímeros, tal como una mezcla de polipéptidos que comprende una población heterogénea de polipéptidos que consiste en alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina, p. ej., Copolímero-1, también denominado en la presente memoria acetato de glatiramer, u otras mezclas de polipéptidos que tienen propiedades similares. Según se usa en la presente memoria, un "polipéptido" se refiere a un polímero que comprende residuos de aminoácido que están unidos entre sí con conexiones amida, que comúnmente se denominan enlaces peptídicos. La conexión peptídica se forma a partir de un enlace entre un grupo carbonilo en el extremo C de un aminoácido y el grupo nitrógeno del extremo N de otro aminoácido. Cuando se conectan muchos aminoácidos usando estas conexiones peptídicas, forman polipéptidos. El término "mezcla", según se usa en la presente memoria, por ejemplo, según se usa en la expresión "una mezcla de polipéptidos", se refiere, en algunas realizaciones, a una mezcla de copolímeros de los aminoácidos que comprenden ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina.

Según se usan en la presente memoria, un "copolímero", "copolímero de aminoácidos" o "preparación de copolímero de aminoácidos" es una mezcla heterogénea de polipéptidos que consiste en una pluralidad definida de diferentes aminoácidos (que consiste típicamente en entre 2-10, p. ej., entre 3-6, aminoácidos diferentes). Un copolímero se puede preparar a partir de la polimerización de aminoácidos individuales, o se puede producir recombinantemente. El término "aminoácido" no se limita a aminoácidos naturales, sino que puede incluir derivados de aminoácido y/o análogos de aminoácido. Por ejemplo, en un copolímero de aminoácidos que comprende aminoácidos tirosina, uno o más de los aminoácidos puede ser una homotirosina. Además, un copolímero de aminoácidos que tiene uno o más enlaces no peptídicos o peptidomiméticos entre dos residuos adyacentes se incluye dentro de esta definición. Un copolímero típicamente no es uniforme con respecto al peso molecular de cada especie de polipéptido dentro de la mezcla.

En una realización de la invención, el copolímero de aminoácidos es una mezcla de polipéptidos que comprende los aminoácidos Y, E, A y K; Y, F, A y K; V, Y, A y K; V, W, A y K; V, E, A y K o F, E, A y K. En otra realización de la invención, el copolímero de aminoácidos contiene cuatro aminoácidos diferentes, cada uno de una diferente de los siguientes grupos: (a) lisina y arginina; (b) ácido glutámico y ácido aspártico; (c) alanina y glicina; y (d) tirosina y triptófano. Un copolímero específico según esta realización de la presente invención comprende una mezcla de polipéptidos que comprenden alanina, ácido glutámico, lisina y tirosina. En una realización, el copolímero comprende una mezcla de polipéptidos que consiste en los aminoácidos Y, E, A y K, también denominada Copolímero-1 (Cop 1) o acetato de glatiramer. En otra realización, el copolímero de aminoácidos contiene tres aminoácidos diferentes, cada uno de uno diferente de los tres grupos susodichos (a) a (d), p. ej., Y, A y K; Y, E y K; K, E y A; o Y, E y A.

En otra realización, el copolímero de aminoácidos comprende aminoácidos que incluyen, pero no limitados a, alanina-ácido glutámico-lisina-tirosina-alanina (AEKYA), alanina-ácido glutámico-lisina-valina-alanina (AEKVA), alanina-ácido glutámico-lisina-fenilalanina-alanina (AEKFA), alanina-lisina-tirosina-alanina-ácido glutámico (AKYAE), ácido glutámico-alanina-lisina-tirosina-alanina (EAKYA), alanina-lisina-valina-alanina-ácido glutámico (AKVAE) y ácido glutámico-alanina-lisina-valina-alanina (EAKVA), alanina-lisina-fenilalanina-alanina-ácido glutámico (AKFAE) y ácido glutámico-alanina-lisina-fenilalanina-alanina (EAKFA).

Los métodos ahora divulgados son adecuados para caracterizar mezclas de polipéptidos complejas preparadas mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunos procedimientos para producir acetato de glatiramer, tales como el esquema de reacción no limitativo proporcionado en la Figura 1 y procedimientos relacionados conocidos en la técnica, se forman grupos dietilamida durante el procedimiento de fabricación. En muchos

procedimientos, la copolimerización de N-carboxianhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico, L-tirosina y L-lisina se inicia mediante la adición de dietilamina. Sin querer limitarse por ninguna teoría particular, se cree que durante este procedimiento, la dietilamina se une covalentemente al ácido carboxílico C-terminal (después de lo cual se denomina un grupo o resto dietilamida) y sigue unido al extremo de las cadenas polipeptídicas de los polipéptidos protegidos como resultado de la formación de un enlace amida en el que de otro modo estaría presente un grupo carboxilo. Los aminoácidos o las cadenas polipeptídicas que tienen un resto dietilamida en lugar de un grupo carboxilo en un extremo de los mismos también se denominan en la presente memoria "aminoácidos modificados" o "cadenas macromoleculares modificadas", respectivamente.

Los grupos dietilamida se pueden formar a partir de cualquiera de los cuatro aminoácidos usados para producir acetato de glatiramer. La despolimerización de la cadena, por ejemplo, mediante ácido bromhídrico/ácido acético, seguida por retirada de los grupos protectores y diálisis o ultracentrifugación, no hidroliza completamente el resto dietilamida o lo retira de otro modo de la mezcla de polipéptidos. Como resultado, están presentes dos tipos de residuos C-terminales en la mezcla de polipéptidos: residuos C-terminales de los cuatro aminoácidos naturales, es decir, lisina, tirosina, ácido glutámico y alanina, que tienen un grupo carboxilo libre, y residuos C-terminales que tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo libre.

## II. Métodos para evaluar mezclas de polipéptidos complejas

La materia ahora divulgada proporciona métodos para evaluar o caracterizar uno o más péptidos, mezclas de péptidos y mezclas de polipéptidos, incluyendo mezclas de polipéptidos complejas, tales como Copolímero-1 y mezclas de polipéptidos complejas similares. En algunas realizaciones, el método incluye fraccionar la mezcla de péptidos o polipéptidos (p. ej., separar la mezcla en mezclas más simples o enriquecer ciertas especies de la mezcla); detectar la presencia de ciertas macromoléculas y/o identificar las macromoléculas en la misma; y opcionalmente cuantificar la cantidad de las ciertas macromoléculas, incluyendo estructuras o macromoléculas de aminoácido modificadas, tales como péptidos o polipéptidos que tienen un resto dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en al menos un extremo de los mismos. En algunas realizaciones, la etapa de cuantificación puede incluir cuantificar la masa relativa o la cantidad molar de estructuras de aminoácido modificadas en un polipéptido o una mezcla de polipéptidos o la cantidad molar relativa de cadenas macromoleculares modificadas en una mezcla de polipéptidos .

Una realización de la materia ahora divulgada incluye un método para ensayar una muestra seleccionada del grupo que consiste en Copolímero-1 o Copolímero-1 fragmentado, fraccionado o derivado, es decir, un copolímero que tiene un resto químico ligado en uno o más residuos del copolímero, o precursores poliméricos (p. ej., los productos intermedios I, II y III mostrados en la Figura 1) del mismo, comprendiendo el método analizar la muestra mediante un método que incluye, pero no limitado a, espectroscopía de masas (MS), cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas (LC-MS), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), métodos de detección de anticuerpos, espectroscopía de Raman y electroforesis capilar.

En algunas realizaciones, los métodos ahora divulgados incluyen despolimerizar parcialmente o completamente la muestra de polipéptidos mediante un método químico o enzimático y a continuación analizar la muestra parcialmente o completamente despolimerizada mediante un método que incluye, pero no se limita a, MS, LC-MS, NMR, métodos de detección de anticuerpos, espectroscopía de Raman, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía iónica.

En algunas realizaciones, la materia ahora divulgada proporciona un método para detectar, identificar y/o cuantificar las cantidades molares relativas de aminoácidos modificados en un polipéptido o una mezcla de polipéptidos. En algunas realizaciones, el método puede incluir despolimerizar las moléculas de polipéptido mediante digestión enzimática o química. El método puede incluir determinar la cantidad molar de un resto dietilamida C-terminal en una mezcla de polipéptidos de ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina, tal como acetato de glatiramer. El método de análisis puede incluir cromatografía de líquidos, cromatografía de gases, cromatografía iónica, espectroscopía de masas, cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas, NMR, métodos de anticuerpos, espectroscopía de Raman y electroforesis capilar, preferiblemente espectroscopía de NMR multidimensional.

En una realización, la materia ahora divulgada proporciona un método para analizar una muestra de Copolímero-1 o un precursor polimérico del mismo (p. ej., producto intermedio-I, producto intermedio-II y producto intermedio III según se muestran en la Figura 1), incluyendo el método poner en contacto un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente bien a un resto estructural de dietilamida o bien a un péptido particular, con una muestra de Copolímero-1 o un precursor polimérico del mismo, bajo condiciones que permiten la unión, permitiendo de ese modo el análisis, por ejemplo, el análisis cuantitativo, del resto estructural dietilamida en la muestra de Copolímero-1, o residuos de aminoácido o cadenas polipeptídicas que tienen un resto dietilamida en un extremo de los mismos. En otra realización, el método incluye determinar la presencia de un resto dietilamida al detectar un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo unidos al resto dietilamida. En algunas realizaciones, el anticuerpo se puede absorber o ligar de otro modo, p. ej., mediante un grupo de conexión, a una superficie. En algunas realizaciones, el anticuerpo se puede marcar con un marcador, tal como un marcador fluorescente o un marcador radioisotópico.

En otra realización, la muestra, p. ej., una muestra de Copolímero-1, puede ser una muestra fraccionada por tamaño. El método puede incluir además analizar una o más fracciones de la muestra para detectar la presencia de un resto estructural dietilamida sin aislar la especie que incluye el resto dietilamida. En algunas realizaciones, la materia ahora divulgada incluye determinar la cantidad y/o la distribución por tamaño del resto estructural dietilamida. En otra realización, el método incluye además clasificar, seleccionar o descartar la muestra basándose, el menos en parte, en la determinación del resto estructural dietilamida, p. ej., el porcentaje total de cadenas peptídicas que tienen un grupo dietilamida en el extremo C en lugar de un grupo carboxilo en un extremo de las mismas. En algunas realizaciones, esta determinación se puede basar en un valor absoluto, mientras que, en otras realizaciones, esta determinación se puede basar en una comparación de la muestra bajo ensayo con un patrón estándar.

En otra realización, la materia ahora divulgada proporciona un método para ensayar un patrón de referencia para una composición, p. ej., un fármaco, al analizar una muestra, p. ej., una composición de péptidos mixtos, tal como el Copolímero-1 o más particularmente COPAXONE®, y determinar si un resto estructural dietilamida o una mezcla de restos estructurales dietilamida está presente en el patrón de referencia. En algunas realizaciones, el método ahora divulgado evalúa un valor o parámetro, en donde el valor o parámetro representa la presencia, la distribución por tamaño y/o la cantidad de un resto estructural dietilamida. Más particularmente, los métodos ahora divulgados se pueden usar para determinar la cantidad molar de un péptido o polipéptido que tiene un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en el extremo C en una mezcla de polipéptidos de ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina, tal como acetato de glatiramer. En algunas realizaciones, el método no requiere el aislamiento de la especie que se evalúa.

En una realización, la materia ahora divulgada proporciona un método para probar en una preparación de un copolímero, tal como Copolímero-1, la presencia y/o la cantidad de modificaciones o grupos modificados en el extremo carboxilo de cadenas polipeptídicas del copolímero, p. ej., la presencia o la cantidad de un resto dietilamida en el extremo C de las mismas. El método incluye evaluar la cantidad de restos dietilamida, o residuos de aminoácido, péptidos o cadenas polipeptídicas que tienen un resto dietilamida en un extremo de los mismos, en una preparación de copolímero de muestra y comparar la cantidad de restos dietilamida en la preparación con un valor de referencia, p. ej., un valor de especificación o un valor de control, o con un valor obtenido a partir de una medida directa de una preparación de copolímero de referencia. La preparación de muestra puede ser, por ejemplo, Copolímero-1 o un precursor polimérico del mismo, incluyendo Copolímero-1 fragmentado, fraccionado o derivado, o precursores poliméricos del mismo (p. ej., producto intermedio-I, producto intermedio-II y producto intermedio III según se muestra en la Figura 1). El método también puede incluir una etapa de eliminación (es decir, determinar el destino de) la preparación basada en la evaluación (p. ej., una etapa de determinación de si la preparación es adecuada o no para el uso farmacéutico, una etapa de determinación de si la preparación es adecuada o no para someter a etapas de procesamiento adicionales (p. ej., en un procedimiento de fabricación para el copolímero-1) o una etapa de aprobación de la preparación de muestra para uso farmacéutico basándose al menos parcialmente en la evaluación).

En una realización, el valor de referencia es un valor predeterminado, p. ej., un valor de especificación farmacéutico para el acetato de glatiramer, que, en algunas realizaciones, puede estar entre aproximadamente 7 y aproximadamente 20 por ciento en moles de polipéptidos, p. ej., 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 por ciento en moles de polipéptidos, incluyendo valores intermedios, p. ej., 7,5, 8,5, 9,5, 10,5 por ciento en moles y similares; en algunas realizaciones, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 18 por ciento en moles de polipéptidos; en algunas realizaciones, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 15 por ciento en moles de polipéptidos, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 12 y aproximadamente 14 por ciento en moles de polipéptidos y, en algunas realizaciones, aproximadamente 13 por ciento en moles de polipéptidos.

En otra realización, el valor es un valor predeterminado correspondiente a la cantidad de polipéptidos que tienen un resto dietilamida en lugar de un grupo carboxilo en un extremo de los mismos en una preparación de referencia, p. ej., una preparación precursora de Copolímero-1 (p. ej., producto intermedio-I, producto intermedio-II y producto intermedio III según se muestra en la Figura 1). En algunas realizaciones, una preparación precursora de Copolímero-1 de referencia tiene entre aproximadamente 60% y aproximadamente 100%, p. ej., 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 98,5, 99, 99,5, 99,9 y 100%, de restos dietilamida (por ciento en moles de polipéptidos); en algunas realizaciones, entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100%; y en algunas realizaciones, más de aproximadamente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de restos dietilamida (por ciento en moles de polipéptidos). El porcentaje total de cadenas peptídicas que tienen un grupo dietilamida en un extremo de las mismas presente en la mezcla de polipéptidos bajo prueba se puede presentar como un porcentaje absoluto o como un porcentaje relativo a un patrón de referencia, p. ej., una muestra de acetato de glatiramer que tiene propiedades conocidas. Estos valores también se pueden presentar de otros modos, p. ej., como % en moles de residuos, o porcentaje en peso (ppm), al aplicar factores de conversión apropiados conocidos en la técnica.

En una realización, una cantidad de polipéptidos que tienen un resto dietilamida en un extremo de los mismos en una preparación de muestra se puede evaluar mediante una técnica que incluye, pero no se limita a <sup>1</sup>H NMR unidimensional (1D).

En otra realización, la materia ahora divulgada proporciona una preparación de Copolímero-1 (p. ej., una preparación de acetato de glatiramer), que tiene entre aproximadamente 7% y aproximadamente 20% de restos dietilamida (por ciento en moles de polipéptidos), p. ej., 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20% de restos dietilamida (por ciento en moles de polipéptidos); en algunas realizaciones, entre aproximadamente 8% y aproximadamente 18% de restos dietilamida (por ciento en moles de polipéptidos); en algunas realizaciones, entre 10% y 15% de restos dietilamida (por ciento en moles de polipéptidos); en algunas realizaciones, entre 12% y 14% de restos dietilamida (por ciento en moles de polipéptidos); y, en algunas realizaciones, aproximadamente 13% de restos dietilamida (por ciento en moles de polipéptidos). En una realización, la preparación de Copolímero-1 es una preparación farmacéutica, p. ej., una preparación farmacéutica de acetato de glatiramer que tiene un peso molecular medio (máximo del pico) de menos de aproximadamente 13.000, 13.100, 13.200, 13.300 y/o 13.400 daltons, véase la Publicación de Patente Internacional PCT N° WO 2006/029411, página 55, línea 25, a página 56, línea 8 y páginas 60-63.

La capacidad para caracterizar tales mezclas de polipéptidos se puede usar para verificar o asegurar la coherencia entre lotes o la calidad durante un procedimiento de preparación y para verificar o evaluar la similitud de una mezcla de polipéptidos particular con un material de referencia desde una perspectiva de estructura-actividad, por ejemplo, para evaluar o asegurar la equivalencia biológica de una muestra bajo prueba y/o como parte de una prueba de liberación.

## II. Métodos generales para evaluar o caracterizar mezclas de polipéptidos complejas

En algunas realizaciones, los métodos ahora divulgados para caracterizar una mezcla de polipéptidos compleja incluyen una o más de las siguientes etapas: fragmentar, o despolimerizar, los polipéptidos que comprenden la mezcla de polipéptidos compleja; separar los péptidos, polipéptidos o fragmentos de los mismos; detectar y/o cuantificar los péptidos, polipéptidos o fragmentos de los mismos; y purificar los péptidos, polipéptidos o fragmentos de los mismos. Realizaciones representativas no limitativas de estas etapas individuales se proporcionan posteriormente en la presente memoria.

### A. Fragmentación

En algunas realizaciones, las moléculas de polipéptido presentes en una mezcla compleja se pueden fragmentar o dividir en fragmentos menores de polipéptidos mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos químicos, enzimáticos o físicos. La división se refiere generalmente a la escisión de un enlace químico dentro de una proteína, un péptido o un polipéptido para producir "fragmentos" de proteína, péptido o polipéptido. En algunas realizaciones, la fragmentación de moléculas de proteína, péptidos o polipéptidos en una mezcla compleja se puede efectuar usando agentes químicos incluyendo, pero no limitados a, un ácido fuerte, p. ej., ácido clorhídrico 6 N, un ácido débil, p. ej., ácido fórmico al 70% a 40°C, hidroxilamina, una base fuerte, p. ej., hidróxido sódico 1 N, bromuro de cianógeno, ácido yodosobenzoico o 2-nitro-5-tiocianobenzoato, seguido por el uso de una base alcalina. La fragmentación química también puede incluir agentes químicos usados para técnicas de degradación de Edman, tales como isotiocianato de fenilo y otros de estos agentes conocidos en la técnica.

Además, el agente de fragmentación puede ser una enzima proteolítica. La fragmentación se puede efectuar usando una o más proteasas, incluyendo tripsina, quimotripsina, elastasa, ficina, papaína, pepsina, plasmina, termolisina, endopeptidasa, proteinasa K, bilis de buey, pectina de limón, peroxidasa de rábano picante, gluc-C, endo lys-C, carboxipeptidasa, calpaína y subtilisina. El uso de más de una enzima proteasa puede generar fragmentos solapados. El agente proteolítico puede estar libre en solución, o inmovilizado en o sobre un soporte. Enzimas proteasa adecuadas para el uso con los métodos ahora divulgados se pueden aislar de cualquier organismo, incluyendo, pero no limitados a, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactohacillus casei*.

En otra realización, la proteína, el péptido o el polipéptido se puede fragmentar usando una técnica física, incluyendo, pero no limitada a, ebullición, ultrasonidos o cizalladura.

### B. Separación

En algunas realizaciones, los polipéptidos o polipéptidos fragmentados presentes en la mezcla compleja se pueden separar con lo que los polipéptidos o polipéptidos fragmentados se aíslan en subpoblaciones de macromoléculas. La separación se puede basar en una propiedad compartida por una clase de macromoléculas dentro de la mezcla compleja, por ejemplo, el tamaño, la carga, la hidrofobia o cualquiera de las propiedades de las macromoléculas descritas en la presente memoria. Más particularmente, las macromoléculas, o fracciones de macromoléculas, en una mezcla compleja se pueden aislar de las otras macromoléculas de la mezcla basándose en, por ejemplo, las velocidades de migración a través de un gel; el tamaño; el peso molecular; la migración en respuesta a un campo eléctrico aplicado; la carga; la hidrofobia; el punto de ebullición, la solubilidad, p. ej., a través de extracción con disolvente; la precipitación; la afinidad; la fosforilación; o la presencia de residuos de aminoácido de baja abundancia, tales como tirosina. Según esto, la separación se puede basar en cualquier propiedad química, física o funcional compartida por una población de macromoléculas dentro de la mezcla compleja.

En algunas realizaciones, se puede usar una sola etapa de separación. En otras realizaciones, se pueden usar una o más etapas de separación. Un experto normal en la técnica puede usar cualesquiera técnicas de separación en cualquier combinación y en cualquier orden para separar las macromoléculas deseadas del resto de las macromoléculas de la mezcla compleja. Además, las técnicas de separación se pueden realizar como un solo método unidimensional o como un método multidimensional. Las técnicas de separación se pueden realizar usando geles o métodos cromatográficos. La etapa de separación, p. ej., un método de separación electroforético, se puede realizar bajo condiciones simples o desnaturizantes (p. ej., dodecilsulfato sódico (SDS) o urea). Ejemplos de técnicas de separación no limitativas se proporcionan inmediatamente después en la presente memoria. Los siguientes ejemplos se pueden usar según los métodos ahora divulgados. Estos ejemplos se proporcionan para facilitar la comprensión de los métodos ahora divulgados y se entiende que no limitan de ningún modo el alcance de la materia reivindicada.

### 1. Electroforesis en gel

Los métodos para la separación se pueden basar en la movilidad de macromoléculas a través de una matriz o un gel. La electroforesis en gel proporciona separación y/o visualización de las macromoléculas y permite la determinación de ciertas propiedades de una macromolécula, incluyendo su punto isoeléctrico y/o peso molecular aproximado.

Para macromoléculas que son proteínas, péptidos, polipéptidos o fragmentos de los mismos, la secuencia de aminoácidos, el número de aminoácidos y/o los diferentes grupos R pueden dictar las propiedades de peso molecular y/o carga global (neta). Si la proteína, el péptido, el polipéptido o el fragmento del mismo tiene más aminoácidos cargados positivamente, de modo que la suma de las cargas positivas supere la suma de las cargas negativas, la proteína, el péptido, el polipéptido o el fragmento del mismo tendrá una carga positiva global y migrará hacia un electrodo cargado negativamente en un campo eléctrico. Las proteínas, los péptidos, los polipéptidos o los fragmentos de los mismos que tienen una variación de un aminoácido tienen una carga global diferente y así son distinguibles electroforéticamente.

El dodecilsulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que se une a la mayoría de proteínas o péptidos solubles en soluciones acuosa a lo largo de un amplio intervalo de pH. Las proteínas o los péptidos se unen a cantidades de SDS en proporción al tamaño de la molécula de proteína o péptido. Un gel de poli(acrilamida) con un contenido de acrilamida por encima de una densidad crítica restringe la migración de las moléculas mayores a migrar tan rápidamente como las moléculas menores. Debido a que la relación de carga a masa es casi la misma entre proteínas o péptidos desnaturizados con SDS, la separación final de las proteínas o los péptidos depende principalmente de las diferencias en el peso molecular (PM) de las proteínas o los péptidos. La separación de proteínas o péptidos mediante electroforesis en gel SDS-PAGE se puede usar para determinar la abundancia relativa de proteínas o péptidos en una muestra (p. ej., una muestra de una mezcla compleja), sus pesos moleculares aproximados y en qué fracciones se pueden encontrar. Además, la pureza de las proteínas o los péptidos en una muestra se puede valorar con esta técnica. Se pueden usar diferentes procedimientos de tinción o afinidad para detectar proteínas raras y caracterizar sus propiedades bioquímicas. También se pueden usar técnicas especializadas tales como inmunotransferencia, electroforesis bidimensional e identificación de péptidos.

### 2. Tamaño

En algunas realizaciones, el método de separación se puede basar en el tamaño, el peso molecular o la masa molar y se puede efectuar usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés), cromatografía de penetración en gel (GPC, por sus siglas en inglés) o cromatografía de filtración en gel (GFC, por sus siglas en inglés).

En la SEC, una fase móvil que comprende un disolvente y una porción de la proteína, el péptido, el polipéptido o el fragmento de los mismos dispuesto en la misma fluye por una fase estacionaria. La fase estacionaria, a través de una interacción física y/o química con la proteína, el péptido, el polipéptido o el fragmento del mismo, retiene temporalmente alguna porción de la proteína, el péptido, el polipéptido o el fragmento del mismo y de ese modo separa esa porción de la proteína, el péptido, el polipéptido o el fragmento del mismo de otras macromoléculas de la fase móvil. La fase estacionaria comprende típicamente geles basados en agarosa reticulados microporosos, geles de poli(metacrilato de metilo) modificados o sílice porosa. Las moléculas de proteína, péptido o polipéptido que son más pequeñas que el tamaño de los poros de las partículas pueden entrar en los poros y por lo tanto tener un recorrido más largo y un tiempo de tránsito más largo que moléculas mayores que no pueden entrar en los poros. Así, las moléculas mayores se eluyen antes en el cromatograma, mientras que las moléculas menores se eluyen después.

Componentes de un sistema de SEC pueden incluir: una o más bombas para mantener velocidades de flujo no pulsátiles constantes; tipos de columna para el intervalo de pesos moleculares de interés; y un sistema detector para detectar y/o cuantificar el resultado. Los sistemas detectores se pueden clasificar como sensibles a la concentración molar o sensibles a la concentración másica. Por ejemplo, un detector del índice de refracción mide el cambio en el índice de refracción a medida que cambia la concentración de proteína en la solución. Otro grupo de métodos de

concentración molar implica la entrada de luz ultravioleta, siendo la salida fluorescencia o absorción por la proteína. Otros métodos incluyen un detector de densidad y un detector de dispersión de luz evaporativo.

### 3. Procedimientos cromatográficos

5 Los métodos para la separación se pueden basar en otros procedimientos cromatográficos, incluyendo: cromatografía de gases (p. ej., cromatografía de gases-líquidos); cromatografía de gases-sólidos; cromatografía iónica, cromatografía de partición; cromatografía de adsorción; cromatografía en capa fina y cromatografía de fluidos supercríticos.

### 4. Electroforesis capilar:

10 Los métodos para la separación se pueden basar en la migración de las macromoléculas a través de un medio en respuesta a un campo eléctrico aplicado (p. ej., electroforesis). En un ejemplo, se puede usar electroforesis capilar para separar macromoléculas tanto cargadas como no cargadas (p. ej., proteínas y fragmentos de las mismas) que varían en tamaño.

15 La mayoría de las moléculas de interés biológico se cargan y así se pueden separar mediante métodos electroforéticos. Esta característica es especialmente cierta para los grupos dietilamida de los fragmentos de péptido que, cuando se ponen en el entorno apropiado, se cargan. En una realización alternativa, se puede usar un tubo de sílice fundida que tiene una longitud que varía de aproximadamente 50 cm a aproximadamente 100 cm y un diámetro interno que varía de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ . Los electrodos que se pueden usar varían de 10 a 50 kV. Para cuantificar la cantidad de cadenas peptídicas o polipeptídicas que tienen un grupo dietilamida en un extremo de las mismas en una muestra, con o sin purificación del extremo C según se describe anteriormente usando un método como cromatografía de afinidad, la muestra se separa mediante electroforesis capilar. Durante la separación, el detector se puede usar para determinar la presencia de los grupos dietilamida y determinar la cantidad de cadenas peptídicas o polipeptídicas que tienen un grupo dietilamida en un extremo de las mismas presente en la muestra.

25 La electroforesis capilar abarca una familia de técnicas de separación relacionadas que usan capilares de sílice fundida de luz estrecha para separar una mezcla compleja. Se usan altas intensidades de campo eléctrico para separar moléculas basándose en diferencias en la carga, el tamaño y la hidrofobia. La introducción de la muestra se efectúa sumergiendo el extremo del capilar en un vial de muestra y aplicando presión, vacío o voltaje. Dependiendo de los tipos de capilar y electrolitos usados, la tecnología de CE se puede dividir en varias técnicas de separación incluyendo, pero no limitadas a, electroforesis en la zona capilar (CZE, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel capilar (CGE, por sus siglas en inglés), enfoque isoeléctrico capilar (CIEF, por sus siglas en inglés), isotacoforesis (ITP, por sus siglas en inglés), cromatografía electrocinética (EKC, por sus siglas en inglés), cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC o MEKC, por sus siglas en inglés), cromatografía electrocinética de microemulsiones (MEEKC, por sus siglas en inglés), electroforesis capilar no acuosa (NACE, por sus siglas en inglés) y electrocromatografía capilar (CEC, por sus siglas en inglés).

### 35 5. Carga

Los métodos para la separación se pueden basar en la selección de la carga, incluyendo cromatografía de intercambio iónico y cromatografía catiónica. En la cromatografía de intercambio iónico, sustancias cargadas se separan a través de materiales de columna que tienen una carga opuesta. Los grupos iónicos de las columnas intercambiadoras están unidos covalentemente a la matriz de gel y son compensados por pequeñas concentraciones de iones conjugados presentes en el tampón. Cuando se añade una muestra a la columna, tiene lugar un intercambio con los iones conjugados unidos débilmente.

### 6. Hidrofobia

45 Los métodos para la separación se pueden basar en la selección de la hidrofobia, incluyendo cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía en fase inversa (RPC, por sus siglas en inglés) o RP-HPLC. Los compuestos se adhieren a columnas de HPLC en fase inversa en una fase móvil muy acuosa y se eluyen de las columnas de RP-HPLC con una fase móvil muy orgánica. En la RP-HPLC, los compuestos se separan basándose en su carácter hidrófobo.

50 Las columnas de RP-HPLC más comunes se rellenan con partículas de sílice. Las cuentas o partículas se caracterizan generalmente por el tamaño de partícula y de poro. En una realización, los tamaños de partícula varían generalmente de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , siendo las partículas de 5  $\mu\text{m}$  las más ampliamente usadas para las proteínas. El tamaño de poro de las partículas se mide en ángstroms y generalmente varía de aproximadamente 100 Å a aproximadamente 1.000 Å. En una realización, la fase estacionaria está constituida generalmente por longitudes variables de cadenas alquílicas hidrófobas que interactúan con el analito. Las columnas disponibles comúnmente para separar macromoléculas incluyen, pero no se limitan a, cadenas alquílicas que tienen longitudes C-4, C-8 o C-18. Una columna C-4 se usa generalmente para capturar proteínas mayores y una columna C-18 se usa generalmente para capturar proteínas pequeñas o moléculas pequeñas. En

general, se usan disolventes de fase inversa independientemente de la naturaleza hidrófila o hidrófila de las moléculas de proteína.

#### 7. Extracciones con disolvente

5 El método de separación se puede basar en la extracción con disolvente. La extracción con disolvente implica repartir una macromolécula entre disolventes o un disolvente y una fase sólida. Debido a que las macromoléculas que tienen diferentes solubilidades en las dos fases se distribuyen de forma diferente entre las dos fases, es posible la extracción y/o el enriquecimiento de las macromoléculas. Una macromolécula se puede separar basándose en sus propias características hidrófobas/hidrófilas y las de las dos fases usadas. Los procedimientos de extracción con disolvente pueden usar cualquier disolvente adecuado para el uso en la separación de macromoléculas, tales como polipéptidos.

#### 8. Precipitación

15 El método de separación se puede basar en procedimientos de precipitación, lo que también depende de la solubilidad de las macromoléculas. Por ejemplo, proteínas, péptidos o polipéptidos que son solubles en soluciones basadas en agua tienen aminoácidos hidrófilos sobre sus superficies que atraen e interactúan con moléculas de agua. Esta solubilidad es una función de la intensidad iónica y el pH de la solución. Las proteínas, los péptidos y los polipéptidos tienen puntos isoeléctricos a los que las cargas de sus grupos laterales de aminoácido se equilibran entre sí. Si la intensidad iónica de una solución es bien muy alta o bien muy baja, las proteínas, los péptidos o los polipéptidos tenderán a precipitar en su punto isoeléctrico. Así, la solubilidad también es una función de la intensidad iónica.

#### 20 9. Afinidad

El método de separación se puede basar en la selección por afinidad de un subgrupo de macromoléculas en la muestra. La selección por afinidad incluye inmunoafinidad usando anticuerpos policlonales y/o monoclonales y/o cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. El método de selección por afinidad también incluye: afinidad a cisteína usando un reactivo acilante; o afinidad a histidina, carbohidratos y/o restos fosfato.

25 La cromatografía de afinidad confía en la unión de la proteína, el péptido o el polipéptido específicamente a un ligando inmovilizado mientras que el resto de la proteína, el péptido o el polipéptido pasa a través de la columna. Se puede usar cualquier ligando, incluyendo cualquier ligando generado químicamente o una molécula biológica, tal como un azúcar o una molécula de proteína. Ligandos adecuados también incluyen anticuerpos monoclonales o policlonales.

#### 30 10. Proteínas fosforiladas

El método de separación se puede basar en la selección de fosfopéptidos, incluyendo procedimientos que usan anticuerpos que reaccionan con aminoácidos fosforilados (p. ej., fosfotirosina y fosfoserina). Otros métodos incluyen usar columnas de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) cargadas con galio, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía que contiene circonia.

#### 35 11. Aminoácidos de baja abundancia

40 El método de separación se puede basar en la selección de moléculas peptídicas que comprenden ciertos aminoácidos de baja abundancia, tales como tirosina. Por ejemplo, se pueden seleccionar moléculas de proteína, péptido o polipéptido que comprenden tirosina usando sales de diazonio. Las moléculas de proteína, péptido o polipéptido que comprenden triptófano se pueden derivar con cloruro de 2,4-dinitrofenilsulfenilo a pH 5,0 y seleccionar con un anticuerpo reactivo con el 2,4-dinitrofenol. Métodos para separar moléculas de proteína, péptido o polipéptido que comprenden histidina incluyen la acetilación de grupos amino primarios y la selección en columnas de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) cargadas con cobre.

#### C. Detección y/o cuantificación

45 La detección y la cuantificación (colectivamente denominadas en la presente memoria "etapa de evaluación") es un análisis de la mezcla compleja o fracciones de la mezcla compleja, que da como resultado la generación de datos cualitativos o cuantitativos referentes a la misma. La etapa de evaluación puede incluir cualquiera de los procedimientos descritos posteriormente en la presente memoria, solos o en combinación en cualquier orden y pueden incluir: electroforesis en gel; análisis de la composición de aminoácidos; secuenciación de aminoácidos (p. ej., secuenciación N-terminal); análisis de azúcares; secuenciación de azúcares; espectroscopía de fluorescencia; espectrometría de masas, tal como MALDI MS (desorción/ionización láser asistida por matriz-espectrometría de masas, por sus siglas en inglés); MS/MS; NMR; MALDI TOF/TOF; ionización con electropulverización (ESI, por sus siglas en inglés); cuadrupolo; atrapamiento iónico; análisis de masas del sector magnético o de resonancia ciclotrónica iónica; análisis de digestión ortogonal; cuantificación por CE y/o HPLC; espectroscopía infrarroja; espectroscopía UV-vis; espectroscopía de absorción atómica; espectroscopía de Raman; espectroscopía de rayos X; procedimientos térmicos; potenciometría; y/o microscopía electrónica. Más particularmente, el método analítico

incluye, pero no se limita a, espectroscopía de masas, cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas, NMR, métodos de detección de anticuerpos, espectroscopía de Raman y electroforesis capilar.

### 1. Espectrometría de masas

5 La etapa de evaluación puede incluir técnicas de espectrometría espectral de masas o de masas en tándem (MS/MS, por sus siglas en inglés). En esta técnica, los iones del polipéptido molecular originario se fragmentan en iones menores que se seleccionan y se fragmentan adicionalmente para dar información relativa a la naturaleza de la mezcla de péptidos. Para caracterizar un tipo de mezcla de péptidos por espectrometría de masas, a un tipo de péptido o un segmento particular de un tipo de péptido se le pueden dar cargas positivas y negativas, o se puede ionizar y volatilizar en un espectrómetro de masas. Las moléculas de péptido volatilizadas ionizadas o el segmento de 10 las mismas se pueden analizar a continuación mediante el espectrómetro de masas, lo que produce un espectro de masas de la molécula de péptido o el segmento.

Un espectrómetro de masas determina el peso de moléculas peptídicas y segmentos de moléculas peptídicas, cuando se analiza una molécula peptídica o un segmento, la información proporcionada por espectrometría de masas se puede usar para inferir la secuencia de residuos de aminoácido en la molécula peptídica o el segmento. 15 Los espectrómetros de masas también son suficientemente sensibles para proporcionar información acerca de modificaciones en residuos de aminoácido particulares de una molécula peptídica o segmento. Métodos tales como ionización con desorción láser asistida por matriz (MALDI) e ionización por electropulverización (ESI) y nanopulverización, GC/MS, LC/MS, MS/MS, LC MS/MS, SIMS, instrumentos con transformación de Fourier, una espectrometría de masas con microsonda láser, instrumentos en fase gaseosa y de desorción, espectrometría de 20 masas que implica ionización electrónica (EI), ionización química (CI), ionización de campos, desorción de campos, bombardeo atómico rápido, desorción plasmática, desorción térmica, ionización electrohidrodinámica e ionización por termopulverización están todos abarcados dentro del significado de espectroscopía de masas.

### 2. Espectroscopía de NMR

25 La etapa de evaluación puede incluir espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR). La NMR es un fenómeno que se produce cuando los núcleos de ciertos átomos se sumergen en un campo magnético estático y se exponen a un segundo campo magnético oscilatorio. Algunos núcleos experimentan este fenómeno y otros no, dependiendo de si poseen un espín propiamente dicho. Así, la espectroscopía de NMR se puede usar para estudiar la estructura química de muchas moléculas que poseen una característica de espín.

Técnicas de NMR adecuadas incluyen, pero no se limitan a,  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{18}\text{O}$ . Más de 200 isótopos tienen momentos magnéticos y se pueden estudiar usando NMR. La NMR se puede realizar en estados de solución y sólido y todos los tipos de experimentos de NMR están dentro del alcance de la materia ahora divulgada incluyendo desacoplamiento de banda ancha, desacoplamiento fuera de resonancia, potenciación nuclear de Overhauser (NOE, por sus siglas en inglés) y NMR bidimensional (NMR 2D). Ejemplos representativos de métodos de NMR incluyen, 30 pero no se limitan a: experimentos monopulsátiles; espectroscopía de desacoplamiento y diferencia de espín; experimentos multipulsátiles, incluyendo ecos simples, modulación de J, transferencia poblacional, transferencia de polarización selectiva, transferencia de polarización no selectiva-INEPT, INEPT inversa, INEPT reenfocada; NMR 2D, incluyendo secuencia bidimensional básica, métodos que implican retirar el acoplamiento heteronuclear y/o homonuclear; HMQC de espectros detectados inversamente, experimentos de correlación de desplazamiento homonuclear-COSY; variaciones en COSY, coherencia de múltiples cuantos-INADEQUATE, secuencias de espín 35 bloqueado-TOCSY, espectroscopía bidimensional con disolvente suprimido, NMR tridimensional (NMR 3D); métodos que estudian conexiones a través de enlaces; métodos que estudian conexiones a través del espacio, p. ej., experimentos de NOE, incluyendo NOESY y ROESY; y métodos que miden las velocidades de relajación, incluyendo la recuperación de la inversión, la recuperación de la saturación y la saturación progresiva.

45 Opcionalmente, los métodos de NMR ahora divulgados pueden incluir métodos para suprimir señales que surgen de disolventes, tampones y/o contaminantes, incluyendo, pero no limitados a, técnicas de presaturación o "flip-back".

### 3. Espectroscopía infrarroja

La etapa de evaluación puede ser espectroscopía infrarroja (espectroscopía IR), incluyendo espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (FTIR). La espectroscopía IR es un tipo de espectroscopía que usa la porción infrarroja del espectro electromagnético y se puede usar para investigar la composición de una muestra, así 50 como información química detallada sobre las estructuras de biomoléculas. Cuando se realiza de un modo con resolución temporal, se pueden examinar los productos intermedios estructurales en reacciones biológicas. Para medir una muestra, un haz de luz infrarroja monocromático se hace pasar a través de la muestra y se registra la cantidad de energía absorbida a diferentes frecuencias, o longitudes de onda de radiación IR. La posición de los picos de absorción IR se puede relacionar con tipos específicos de enlaces químicos que tienen frecuencias 55 específicas a las que vibran. Dentro del significado de la espectroscopía infrarroja, la invención también incluye todas las formas de espectroscopía infrarroja incluyendo, pero no limitadas a, espectroscopía infrarroja con reflexión interna, espectroscopía infrarroja fotoacústica, espectroscopía infrarroja cercana, espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano, espectroscopía infrarroja lejana y espectroscopía infrarroja de emisión.

#### 4. Electroforesis en gel

La etapa de evaluación puede incluir electroforesis en gel. La descripción de la etapa de electroforesis en gel que se analiza anteriormente se incorpora en la presente memoria mediante referencia con la intención de aplicarla a la etapa de evaluación

#### 5. Espectroscopía de emisión

La etapa de evaluación puede incluir espectroscopía de emisión, que abarca fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia moleculares. La fluorescencia y la fosforescencia se producen como resultado de la absorción de fotones. La quimioluminiscencia se basa en los espectros de emisión de especies excitadas formadas como resultado de una reacción química. Las medidas de la intensidad de las características de fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia permiten la determinación cuantitativa de una especie orgánica e inorgánica. Generalmente, los instrumentos tienen una fuente, filtros y/u otros dispositivos para separar o discriminar entre longitudes de onda, tales como un monocromador, detectores, celdillas y compartimentos. Algunos instrumentos que se pueden usar en la espectroscopía de fluorescencia incluyen fluorómetros, sensores de fluorescencia de fibra óptica, espectrofluorómetros y fosforímetros.

#### 6. Espectroscopía UV-vis

La etapa de evaluación puede incluir espectroscopía UV-vis, que sondea las transiciones electrónicas de moléculas a medida que absorben luz en las regiones UV y visible del espectro electromagnético. Cualquier especie con un sistema extendido de enlaces dobles y sencillos alternativos absorberá luz UV y cualquier cosa con color absorbe luz visible, haciendo la espectroscopía UV-vis aplicable a una amplia gama de muestras. Con respecto a la instrumentación, la fuente de luz es habitualmente una lámpara de hidrógeno o deuterio para medidas UV y una lámpara de wolframio para medidas visibles. Las longitudes de onda de estas fuentes de luz continuas se seleccionan con un separador de longitudes de onda, tal como un prisma o un monocromador de gratícula. Los espectros se obtienen al barrer el separador de longitudes de onda y se pueden realizar medidas cuantitativas a partir de un espectro o con una sola longitud de onda. Existe una variedad de métodos de espectroscopía UV-vis. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a: ultravioleta/visible molecular, espectroscopía de absorción, espectroscopía ultravioleta, espectroscopía de absorción ultravioleta/visible.

#### 7. Espectroscopía de Raman

La espectroscopía de Raman se puede usar para cuantificar la cantidad de cadenas peptídicas o polipeptídicas que tienen un grupo dietilamida en un extremo de las mismas en una muestra. La ventaja de la espectroscopía Raman es que el agua no da lugar a una señal de Raman. Las intensidades de Raman son directamente proporcionales a la concentración de la especie medida. A este respecto, la espectroscopía Raman se puede usar para determinar la concentración de una especie particular presente.

Durante la excitación de Raman, el cambio en los valores relativos de las áreas de los picos de Raman que surgen de vibraciones moleculares se puede usar como una medida del porcentaje de diversas estructuras presentes dentro de una muestra, por ejemplo una muestra purificada. Durante la purificación del extremo C como se describe anteriormente en la presente memoria usando un método de separación, tal como cromatografía de afinidad, el péptido C-terminal aislado se puede analizar usando espectroscopía de Raman. Los picos de Raman correspondientes a los grupos que constituyen los grupos dietilamida son claramente evidentes durante la espectroscopía de Raman. Se pueden usar diversos tipos de técnicas de Raman para analizar los grupos dietilamida. Una muestra representativa incluye espectroscopía de Raman convencional, espectroscopía de Raman de resonancia y espectroscopía de Raman mejorada superficialmente.

#### 8. Métodos de detección de anticuerpos

Un anticuerpo específico para una estructura seleccionada (o específico para las otras estructuras de una muestra) se puede usar para determinar la presencia y/o la cantidad de una estructura seleccionada en una muestra, p. ej., una cantidad de cadenas peptídicas o polipeptídicas que tienen un grupo dietilamida en un extremo de las mismas en una muestra de Copolímero-1 o COPAXONE®. Por ejemplo, un anticuerpo específico para los grupos de los péptidos C-terminales, N-terminales o internos modificados o no modificados está fácilmente disponible o se puede desarrollar mediante métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, para determinar la cantidad de cadenas peptídicas o polipeptídicas que tienen presente un grupo dietilamida en un extremo de las mismas, con o sin purificación de los péptidos C-terminales según se describe anteriormente en la presente memoria usando un método de separación, tal como cromatografía de afinidad, los péptidos C-terminales purificados se pueden incubar con un anticuerpo preseleccionado durante un período de tiempo, p. ej., dos horas, a temperatura ambiente. El anticuerpo sólo se unirá a cadenas específicas para la estructura modificada para la que se producía, p. ej., los péptidos C-terminales. El anticuerpo también puede incluir un marcador que emite fluorescencia cuando se expone a radiación electromagnética. Después de un período de tiempo, p. ej., dos horas, los anticuerpos en exceso se separan por lavado y la muestra se purifica y opcionalmente se cuantifica.

A continuación, la muestra purificada se expone a radiación electromagnética, lo que hace que los anticuerpos unidos emitan fluorescencia. La cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de grupos dietilamida presentes en los péptidos C-terminales.

#### D. Purificación

5 La etapa de purificación, denominada alternativamente en la presente memoria una etapa de enriquecimiento, produce una fracción de macromoléculas que tiene una proporción mayor de las macromoléculas seleccionadas. La fracción de macromoléculas resultante de la etapa de purificación puede incluir macromoléculas distintas a las macromoléculas seleccionadas. Cualquiera de los métodos de separación descritos anteriormente se puede usar para la etapa de purificación. La descripción de la etapa de separación divulgada anteriormente en la presente memoria se incorpora mediante referencia con la intención de aplicar estas técnicas a la etapa de purificación.

10 En algunas realizaciones, la purificación de las cadenas peptídicas o polipeptídicas que tienen un grupo dietilamida en un extremo de las mismas se puede alcanzar mediante cualquier método conocido en la técnica. Un método de purificación se muestra en la Figura 4. Más particularmente, el Copolímero-1 se puede tratar con un alcohol, dando como resultado la transesterificación de los grupos carboxilato. Alternativamente, el copolímero-1 se puede tratar con EDC/química de aminas. El tratamiento con cualquiera de estas químicas da como resultado que se protejan los grupos carboxilato en el ácido glutámico y el extremo C del polipéptido. También se conocen en la técnica otros métodos de purificación. Por ejemplo, el Copolímero-1 se puede tratar con una proteína que se une a los grupos carboxilato, p. ej., biotina. Si se alcanza por medios químicos o biológicos, este copolímero modificado se puede despolimerizar a continuación mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como una digestión química o enzimática. Esta digestión produce tres tipos de estructuras péptidos N-terminales, péptidos internos y péptidos C-terminales.

15 Para purificar los péptidos C-terminales, se pueden usar métodos tales como tratamiento con anticuerpos o cromatografía de afinidad. Los péptidos N-terminales, los péptidos internos y los péptidos C-terminales se ponen en una columna de cromatografía de afinidad. Las condiciones y la columna se eligen de modo que los péptidos N-terminales y los péptidos internos modificados se unan a la columna. Los péptidos C-terminales se eluyen a través de la columna con la fase móvil. A continuación, la fase móvil se retira dando como resultados los péptidos C-terminales purificados. A continuación, los péptidos C-terminales purificados se pueden cuantificar y analizar mediante cualquier método conocido en la técnica.

20 Además, la etapa de purificación puede incluir ligar la proteína, o un fragmento de la misma, a un marcador de afinidad. Los marcadores de afinidad se pueden añadir al extremo N-terminal o C-terminal de la proteína. Marcadores de afinidad incluyen: marcadores de histidina (His); marcadores de glutatión-S-transferasa (GST); marcadores de V5; marcadores de FLAG; marcadores de hemaglutinina (HA) de influenza; marcadores de Myc; marcadores de VSV-G; marcadores de tiorredoxina (Trx). Otros marcadores proteínicos que tienen afinidad para un ligando incluyen: marcadores específicos para lisina; biotina, estreptavidina, proteína que se une a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés); S-tag; dominio de unión a DNA (DBD, por sus siglas en inglés) de Lex A; dominio de unión a DNA de GAL4; virus del herpes simple (HSV, por sus siglas en inglés) y proteína BPI 6.

#### III. Aplicación de los métodos ahora divulgados para evaluar o caracterizar mezclas de polipéptidos complejas

Los métodos de fragmentación, separación, detección y/o cuantificación y purificación divulgados inmediatamente antes en la presente memoria se pueden aplicar a la caracterización de mezclas de polipéptidos complejas.

#### 40 A. Fragmentación seguida por MS o LC/MS

En una realización, el método actualmente divulgado incluyó detectar restos terminales no carboxílicos, es decir, grupos dietilamida, en una mezcla de polipéptidos usando despolimerización enzimática seguida por detección por MS o LC-MS. En esta realización, el polipéptido o la mezcla de polipéptidos se despolimeriza, preferiblemente al añadir una o más proteasas a la mezcla. Proteasas adecuadas incluyen tripsina, quimotripsina, elastasa y glu-C y mezclas de las mismas. La proteasa se puede seleccionar basándose en las propiedades de división de la proteasa específica. Por ejemplo, la tripsina divide el extremo C de lisina o arginina; la quimotripsina prefiere una cadena lateral aromática en el residuo cuyo carbono carbonílico es parte del enlace peptídico que se va a dividir; y Glu-C divide el extremo C del glutamato. La relación enzima/CPX es preferiblemente aproximadamente 1:50 en peso.

50 Se pueden usar disolventes y tampones adecuados durante la etapa de despolimerización. Por ejemplo, para tripsina y Glu-C, soluciones preferibles incluyen bicarbonato amónico 50 mM; para la digestión con quimotripsina, soluciones preferibles pueden incluir Tris-HCl 10 mM y cloruro cálcico 10 mM como tampón. Se pueden usar otros disolventes y tampones compatibles conocidos en la técnica. La etapa de despolimerización, que también se denomina en la presente memoria etapa de digestión, avanza hasta que los polipéptidos se despolimerizan sustancialmente en péptidos individuales. Para proporcionar una despolimerización controlada, la etapa de despolimerización se puede producir a una temperatura elevada, por ejemplo entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 40°C, a lo largo de un período de tiempo. En algunas realizaciones, con tripsina la despolimerización se produce a aproximadamente 37°C y para quimotripsina y Glu-C la temperatura de despolimerización es aproximadamente 25°C. La despolimerización avanza hasta que se produce una

despolimerización adecuada, en algunas realizaciones, durante al menos 12 horas y en algunas realizaciones aproximadamente 16 horas. La digestión se puede terminar después de que se haya producido una digestión adecuada mediante métodos conocidos en la técnica, tales como calentamiento y ajuste del pH. En algunas realizaciones, los polipéptidos se pueden desnaturar mediante calentamiento o adición de un disolvente de

5

Después de la despolimerización, los fragmentos de polímero digeridos comprenden péptidos N-terminales, péptidos internos y péptidos C-terminales, según se muestra en la Figura 2. Estos fragmentos de polímero digeridos se pueden aislar a continuación usando una técnica de separación. En algunas realizaciones, los péptidos se separan usando cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (HPLC en fase inversa), en donde los

10

fragmentos carboxiterminales se separan de los fragmentos no carboxiterminales, según se muestra en la Figura 2. En algunas realizaciones, las fases móviles usadas en la HPLC en fase inversa incluyen agua y acetonitrilo. Una pequeña cantidad de un ácido, tal como ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés), se puede añadir a las fases móviles tanto de agua como de acetonitrilo. Aunque sin querer limitarse por una teoría, el ambiente ácido suprime la interacción de los grupos básicos de los péptidos o las proteínas con silanoles superficiales del relleno de la columna. En algunas realizaciones, las fases móviles comprenden TFA aproximadamente al 0,05% en agua de

15

calidad para HPLC y TFA aproximadamente al 0,04% en acetonitrilo de calidad para HPLC. En algunas realizaciones, la columna de HPLC en fase inversa es una columna C-18 que tiene un relleno de octadecilsílice y con un diámetro interno de 4,6 mm, una longitud de 150 mm, un tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$  y un tamaño de poro de 120 Å. Alternativamente, se puede usar cromatografía de intercambio de cationes fuertes. El

20

intercambio de cationes fuertes permite la separación de los fragmentos carboxiterminales de los fragmentos no carboxiterminales. Una vez que se aíslan los fragmentos no carboxiterminales, se pueden identificar usando espectrometría de masas (MS) o cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS). La Figura 3 representa la alanina del péptido y el grupo dietilamida de la alanina. Al realizar el análisis, las cadenas peptídicas o polipeptídicas que tienen un grupo

25

dietilamida en un extremo de las mismas se pueden identificar por un cambio de masa resultante de 56,1 Da desde el peso molecular del péptido natural, tal como el mostrado en la Figura 3.

B. Detección y cuantificación de cadenas peptídicas o polipeptídicas que tienen un grupo dietilamida en un extremo de las mismas usando NMR

Otra realización de la invención incluye un método para detectar y cuantificar aminoácidos no naturales, incluyendo aminoácidos que tienen grupos dietilamida C-terminales en un extremo de los mismos, en mezclas de polipéptidos, tales como acetato de glatiramer, utilizando NMR. La NMR es un fenómeno que se presenta cuando los núcleos de ciertos átomos se sumergen en un campo magnético estático y se exponen a un segundo campo magnético oscilatorio. Algunos núcleos experimentan este fenómeno y otros no, dependiendo de si poseen una característica de espín. Las espectroscopía de NMR se puede usar para estudiar la estructura química.

30

Por otra parte, la NMR se puede usar para muchas moléculas que poseen una característica de espín. Estas incluyen, pero no se limitan a,  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{18}\text{O}$ . Más de 200 isótopos tienen momentos magnéticos y se pueden estudiar usando NMR. La NMR se puede realizar en estados de solución y sólido y todos los tipos de experimentos de NMR se pueden aplicar a los métodos ahora divulgados incluyendo desacoplamiento de banda ancha, desacoplamiento fuera de resonancia, potenciación nuclear de Overhauser (NOE) y NMR bidimensional (NMR 2D). Ejemplos representativos de métodos de NMR incluyen, pero no se limitan a: experimentos monopulsátiles; espectroscopía de desacoplamiento y diferencia de espín; experimentos multipulsátiles, incluyendo ecos simples, modulación de J, transferencia poblacional, transferencia de polarización selectiva, transferencia de polarización no selectiva-INEPT, INEPT inversa, INEPT reenfozada; NMR 2D, incluyendo secuencia bidimensional básica, métodos que implican retirar el acoplamiento heteronuclear y/u homonuclear; HMQC de espectros detectados inversamente, experimentos de correlación de desplazamiento homonuclear-COSY; variaciones en COSY, coherencia de múltiples cuantos-INADEQUATE, secuencias de espín bloqueado-TOCSY, espectroscopía bidimensional con disolvente suprimido, NMR tridimensional; métodos que estudian conexiones a través de enlaces; métodos que estudian conexiones a través del espacio, es decir, experimentos de NOE, incluyendo NOESY y ROESY; y métodos que miden las velocidades de relajación, incluyendo la recuperación de la inversión, la recuperación de la saturación y la saturación progresiva.

35

40

45

50

Opcionalmente, los métodos de NMR ahora divulgados pueden incluir métodos para suprimir señales que surgen de disolventes, tampones y/o contaminantes, incluyendo, pero no limitados a, técnicas de presaturación o "flip-back".

En estas realizaciones, la mezcla de polipéptidos se puede analizar en su forma intacta o desnaturada, con o sin despolimerización. La despolimerización se puede llevar a cabo usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente en la presente memoria.

55

Las mezclas de polipéptidos que se van a analizar pueden estar en muchas formas y muestras disponibles comercialmente de mezclas de polipéptidos, tales como acetato de glatiramer, típicamente están disponibles en forma liofilizada. Para preparar inicialmente una muestra que incluye mezclas de polipéptidos, agentes portadores

farmacológicos, tales como manitol, se pueden retirar usando métodos conocidos, tales como intercambio de tampón. A continuación, la muestra se puede redisolverse en un disolvente, tal como D<sub>2</sub>O. La muestra se puede disolver en un tampón apropiado, tal como Tris(fosfato de tris-2,3-dibromo-1-propanol).

5 Se pueden realizar diferentes tipos de métodos de NMR sobre muestras para determinar las propiedades de los péptidos en las muestras y para identificar y cuantificar restos en las mismas. Múltiples métodos de NMR, incluyendo métodos de NMR multidimensionales, se pueden realizar sobre muestras de pequeña cantidad tanto para identificar especies como para cuantificar sus cantidades molares relativas. Además de la NMR de protón 1D, la espectroscopía de correlación heteronuclear bidimensional de un único cuanto usando <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (HSQC 2D) es útil para determinar el acoplamiento directo carbono/protón y para la integración, según se explica posteriormente.

10 En algunas realizaciones, se puede usar espectroscopía de correlación total 2D (TOCSY) para determinar el acoplamiento protón/protón y para la integración. Se puede usar espectroscopía de correlación 2D (COSY) para determinar el acoplamiento protón/protón y para la integración. La espectroscopía nuclear 2D de efecto Overhauser (NOESY) o la espectroscopía rotacional de efecto Overhauser (ROESY) se pueden usar para determinar la interacción protón/protón a través del espacio. También se pueden usar NOESY-HSQC 3D y ROESY-HSQC 3D para verificar las asignaciones de desplazamientos químicos.

En algunas realizaciones, se puede usar una combinación de métodos de NMR para detectar o identificar las macromoléculas en una mezcla. Por ejemplo, en el siguiente ejemplo, se usaron <sup>1</sup>H NMR 1D y TOCSY NMR 2D para identificar y cuantificar aductos de dietilamida.

20 Usando el espectro de <sup>1</sup>H NMR 1D, se mide el área bajo cada pico con relación a otros picos identificados para determinar el contenido molar relativo de especies individuales. Por lo tanto, usando esta técnica analítica, se puede calcular el % en moles de cada especie identificada en el espectro de NMR. El % en moles de cada especie se puede calcular mediante comparación de picos de la misma especie de polipéptido, mientras que las cantidades absolutas de cada especie se pueden determinar a través del uso de una señal de referencia calibrada. Una señal de referencia puede proceder de otra molécula de la muestra o de una fuente de radiofrecuencia calibrada.

25 Según esto, al usar bien la digestión enzimática seguida por el método de MS o LC-MS según se describe en la presente memoria o bien la NMR multidimensional como se describe en la presente memoria, es posible medir y cuantificar los niveles de aductos de dietilamida en una mezcla de polipéptidos .

### Ejemplos

30 Los siguientes Ejemplos se han incluido para proporcionar una guía para un experto normal en la técnica para poner en práctica realizaciones representativas de la materia ahora divulgada. A la luz de la presente divulgación y el nivel general de experiencia en la técnica, los expertos pueden apreciar que los siguientes Ejemplos pretenden ser solamente ejemplares y que se pueden emplear numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance de la materia ahora divulgada. Los siguientes Ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

#### 35 Ejemplo 1

Análisis de aductos de dietilamida en acetato de glatiramer

Este ejemplo muestra un modo de detectar y cuantificar aductos de DEA en una preparación de copolímero mediante NMR.

40 Señales de NMR distintivas procedentes de aductos de dietilamida se determinaron a partir de Ala-Ala-dietilamida. El espectro de <sup>1</sup>H NMR 1D se muestra en la Figura 5. La muestra se disolvió en 700 µl de Tris-d11 10 mM, pH 8 con sal sódica de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato-d<sub>6</sub> 4 mM (DSS-d<sub>6</sub>). Los desplazamientos químicos se determinaron con relación al <sup>1</sup>H del metilo de DSS. Los dos grupos metilo del resto dietilamida producen señales distintas a 1,26 y 1,09 ppm.

45 Muestras procedentes de un lote de acetato de glatiramer (COPAXONE®) se analizaron mediante <sup>1</sup>H NMR 1D. Aproximadamente 0,700 ml de acetato de glatiramer formulado se liofilizaron hasta sequedad. El polvo se redisolvió en 0,700 ml de D<sub>2</sub>O y se liofilizó. El procedimiento de disolución y liofilización se repitió tres veces. A continuación, la muestra se redisolvió en 0,700 ml de Tris-d11 10 mM, pH 8 con DSS-d<sub>6</sub> 4 mM. La Figura 6 es el espectro de <sup>1</sup>H NMR 1D para acetato de glatiramer con supresión de la señal de disolvente residual. Las señales grandes procedentes de 3,65-3,90 ppm surgen de manitol y la señal grande en 1,92 ppm es del acetato usado para formular el acetato de glatiramer. Las señales de <sup>1</sup>H del metilo de los aductos de dietilamida son visibles a 1,25 y 1,10 ppm. Aunque se solapan con la cola de las señales de metilo de la alanina, el valor inicial es suficientemente suave para sustraer la característica ancha y obtener un valor inicial localmente plano para la integración (Figura 7). La señal procedente de la característica a 3,00 ppm surge de la suma de H $\alpha$  de lisina y H $\beta$  de tirosina. Cada residuo de lisina y cada residuo de tirosina tiene dos núcleos de <sup>1</sup>H que dan lugar a esta señal. Así, la señal a 3,00 ppm es proporcional a dos veces el contenido de lisina y tirosina. La señal de metilo de la dietilamida a 1,10 ppm es proporcional a tres veces el contenido de aducto de dietilamida, ya que cada grupo metilo tiene tres núcleos de <sup>1</sup>H.

La cantidad de dietilamida se puede determinar a partir de la relación de la señal de metilo de dietilamida a la señal de polipéptido a 3,00 ppm. A partir del análisis de aminoácidos, se encontró que este lote de acetato de glatiramer consiste en 33,7% de lisina y 9,1% de tirosina. Por lo tanto, la dietilamida representa  $(2 * [1,10 \text{ ppm integral}] * ([\text{mol \%Lys}] + [\text{mol \%Tyr}])) / (3 * [3,00 \text{ ppm integral}]) = (2 * 1,00 * 42,8 \%) / (3 * 193,16) = 0,14\%$  en moles de residuos.

5 Alternativamente, este valor se puede traducir en masa total de aducto de dietilamida o % en moles de cadenas.

Se obtuvieron valores similares con múltiples muestras de acetato de glatiramer procedentes de múltiples lotes, bien con o bien sin manitol. Las muestras se almacenaron según las instrucciones del fabricante antes del análisis.

## Ejemplo 2

### Análisis por LC/MS de dietilamina

10 Este ejemplo muestra un modo de detectar y cuantificar aductos de DEA en una preparación de copolímero mediante espectroscopía de masas.

Se pueden presentar diversas modificaciones de residuos terminales en las cadenas polipeptídicas del Copolímero-1 a partir de diversas rutas de reacción. Por ejemplo, se pueden presentar modificaciones de los residuos N- y C-terminales, tales como DEA en el extremo C. Estas modificaciones son un resultado directo del procedimiento de producción del Copolímero-1. Verificar estas modificaciones puede proporcionar información acerca del procedimiento. Si estas especies están presentes en una cantidad significativa, puede ser necesario cuantificarlas como impurezas.

15

La evidencia espectral másica de la existencia de DEA se muestra en las Figuras 8A y 8B. También se ha detectado DEA mediante NMR.

20 En referencia ahora a las Figuras 8A y 8B, la Figura 8A muestra un patrón de fragmentación por MS/MS de DEA representativo. El enlace amida entre la DEA y el grupo carboxílico de un péptido es frágil y se puede romper mediante colisión con moléculas de gas, tal como nitrógeno. En la fragmentación de la muestra, los compuestos se fragmentan en fragmentos menores en una fuente iónica y pueden generar algunos tipos de iones fragmentados, tales como iones DEA. Se generó un ion con la misma masa que DEA, 74,09, mediante fragmentación en la fuente de una muestra de Copolímero-1. La Figura 8B muestra que la fragmentación por MS/MS de este ion genera el mismo patrón que la DEA.

25

Aunque la materia precedente se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, se entenderá por los expertos en la técnica que se pueden poner en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un método para ensayar una muestra de acetato de glatiramer, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar la muestra de acetato de glatiramer, en donde se sospecha que la muestra comprende uno o más polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos;
- 5 (b) determinar la cantidad de polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos en la muestra al detectar restos dietilamida cuando están presentes en el extremo C;
- (c) comparar la cantidad de polipéptidos que tienen el resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos en la muestra con un valor de especificación farmacéutica predeterminado para el acetato de glatiramer, en donde el valor de especificación para el acetato de glatiramer tiene un intervalo de aproximadamente 7% en moles a aproximadamente 20% en moles de polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos; y
- 10 (d) clasificar la muestra basándose en la cantidad de polipéptidos que tienen restos dietilamida unidos al extremo C de los mismos en la muestra, en donde la clasificación de la muestra comprende aprobar la muestra para uso farmacéutico.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que la muestra de acetato de glatiramer se selecciona del grupo que consiste en acetato de glatiramer, acetato de glatiramer fragmentado, acetato de glatiramer fraccionado y acetato de glatiramer derivado.
3. El método según la reivindicación 1, en el que el valor de especificación para el acetato de glatiramer tiene un intervalo de aproximadamente 8% en moles a aproximadamente 18% en moles de polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos.
- 20 4. El método según la reivindicación 3, en el que el valor de especificación para el acetato de glatiramer tiene un intervalo de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 15% en moles de polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos.
5. El método según la reivindicación 4, en el que el valor de especificación para el acetato de glatiramer tiene un intervalo de aproximadamente 12% en moles a aproximadamente 14% en moles de polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos.
- 25 6. El método según la reivindicación 1, en el que la determinación de la cantidad de polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos en la muestra de Copolímero-I comprende un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de líquidos, cromatografía iónica, cromatografía de gases, electroforesis capilar, espectrometría de masas, cromatografía de líquidos/espectrometría de masas, espectroscopía de NMR, un método de detección de anticuerpos, espectroscopía de Raman, espectroscopía infrarroja, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía UV-Vis, electroforesis en gel y combinaciones de los mismos.
- 30 7. El método según la reivindicación 6, en donde el método se selecciona del grupo que consiste en electroforesis capilar, espectrometría de masas, cromatografía de líquidos/espectrometría de masas, espectroscopía de NMR, un método de detección de anticuerpos y espectroscopía de Raman.
- 35 8. El método según la reivindicación 7, en donde el método es espectroscopía de NMR y el método de NMR se selecciona del grupo que consiste en NMR unidimensional, NMR bidimensional y NMR tridimensional,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{15}\text{N}$  NMR y combinaciones de las mismas.
9. El método según la reivindicación 8, en donde el método de NMR comprende además cuantificar la señal de NMR para determinar una cantidad de cadenas polipeptídicas que tienen al menos un extremo C modificado.
- 40 10. El método según la reivindicación 9, que comprende cuantificar la señal de NMR mediante un método seleccionado del grupo que consiste en:
- (a) integrar uno o más picos de NMR asignados al extremo C modificado;
- (b) someter a deconvolución a uno o más picos de NMR asignados al extremo C modificado; y
- 45 (c) referir la señal de NMR asignada al extremo C modificado a una de una señal de NMR asignada a un copolímero que comprende una mezcla de polipéptidos, una molécula de referencia añadida a la muestra, una muestra externa, una señal de radiofrecuencia calibrada y combinaciones de las mismas.
11. El método según la reivindicación 8, en donde el método de NMR comprende además poner en contacto la muestra con un desnaturalizante químico, por ejemplo, con un desnaturalizante químico seleccionado del grupo que consiste en urea y guanidina.
- 50

12. El método según la reivindicación 6 o 7, en donde el método es el método de detección de anticuerpos y el método de detección de anticuerpos se selecciona del grupo que consiste en inmunotransferencia, cromatografía de afinidad y ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas.
- 5 13. El método según la reivindicación 1, que comprende además fraccionar la muestra antes de determinar la cantidad de polipéptidos que tienen un resto dietilamida unido a un extremo C de los mismos en la muestra de Copolímero-I en la etapa (b).
14. El método según la reivindicación 13, que comprende fraccionar la muestra mediante un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de líquidos, cromatografía iónica, cromatografía de afinidad, electroforesis capilar y combinaciones de las mismas.
- 10 15. El método según la reivindicación 1, que comprende además purificar la muestra antes de analizar la muestra en la etapa (b).
16. El método según la reivindicación 1, que comprende además fragmentar la muestra, por ejemplo, mediante despolimerización química o mediante digestión enzimática.

FIG.1

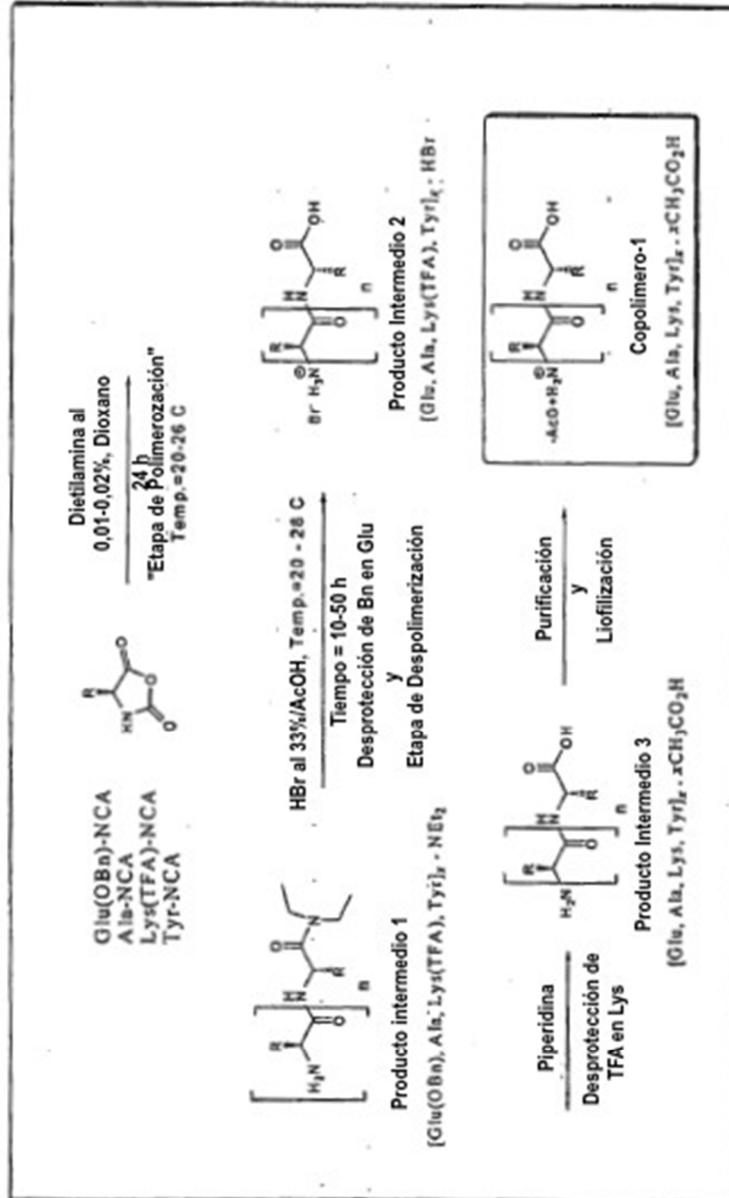


FIG. 2

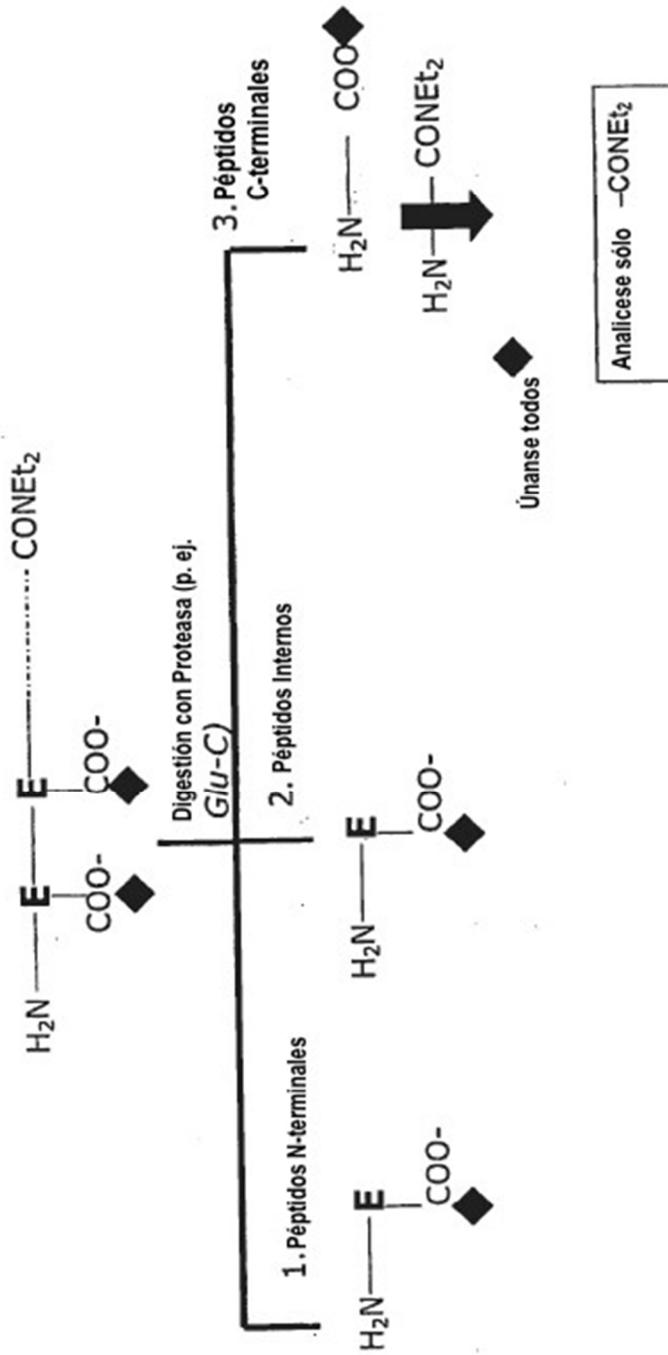




FIG. 4

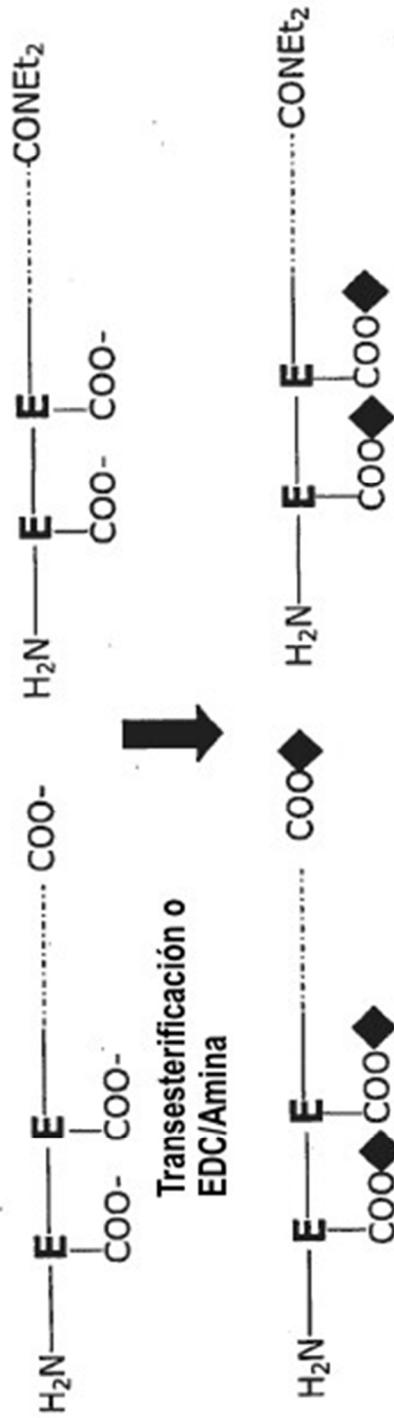


FIG. 5

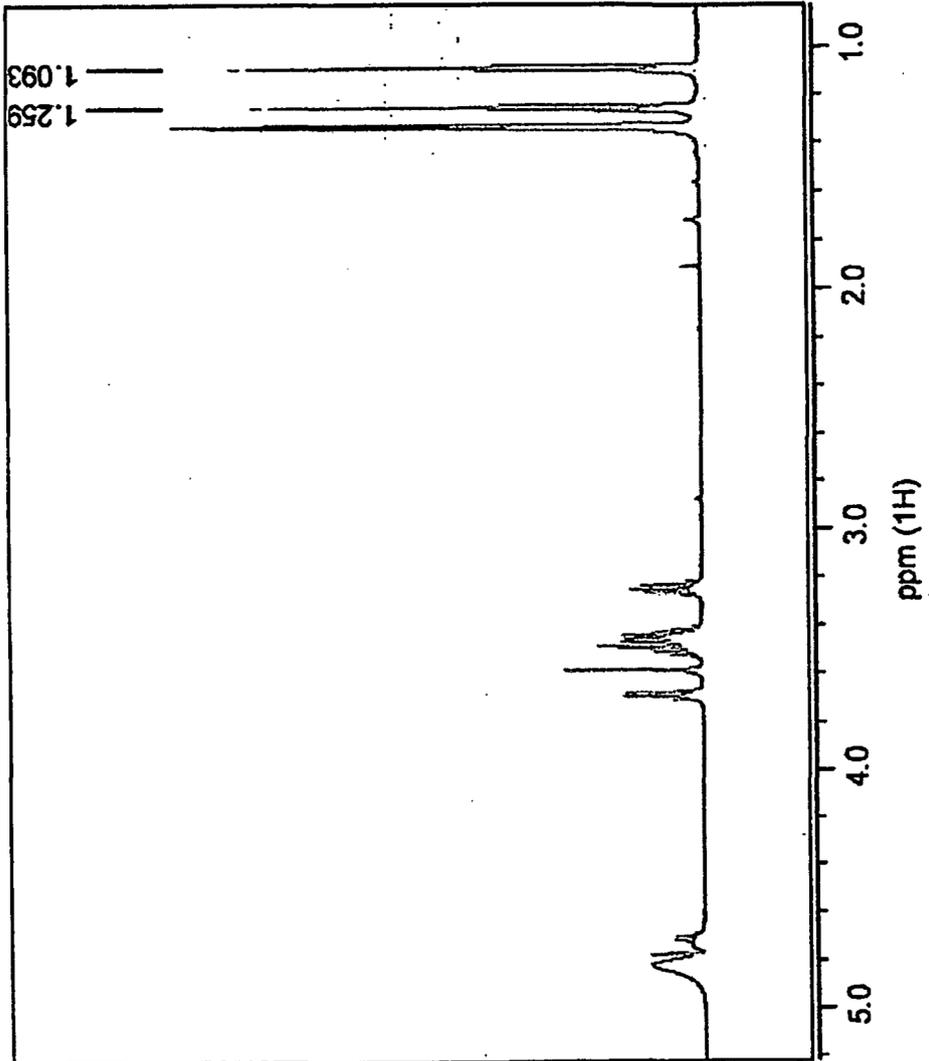


FIG. 6

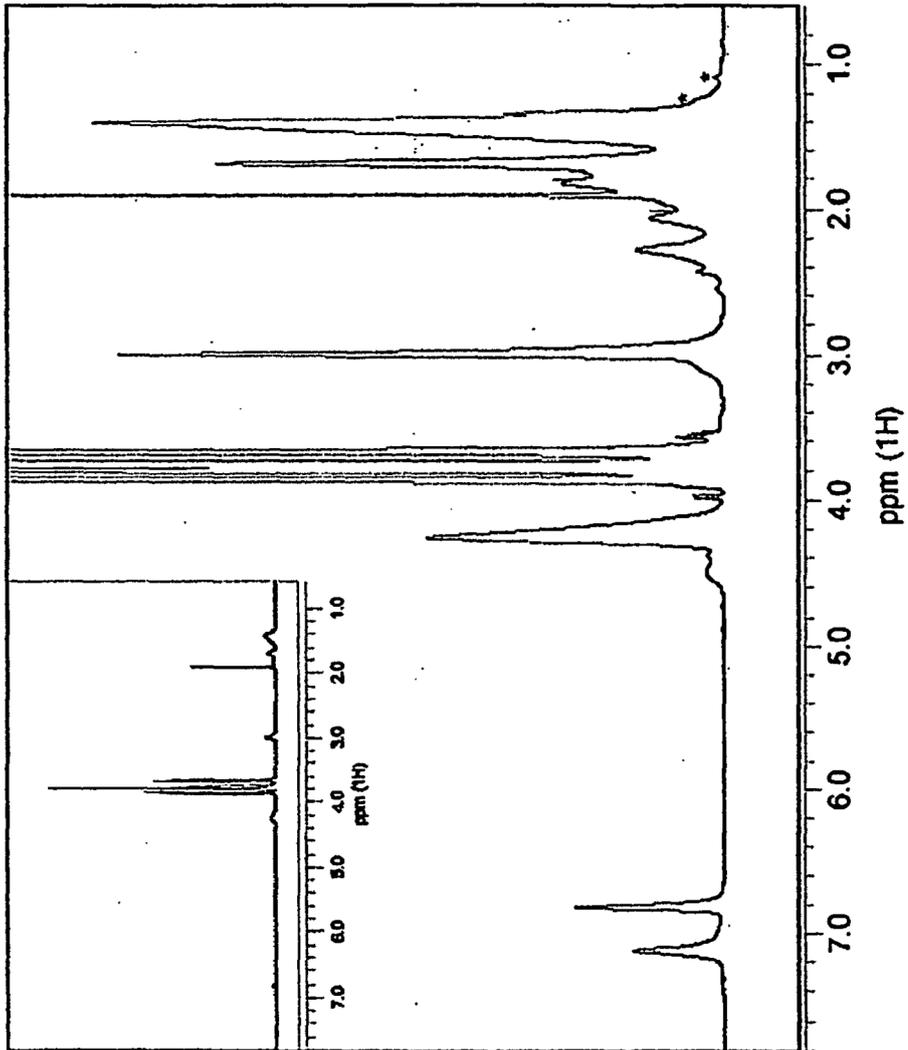


FIG. 7

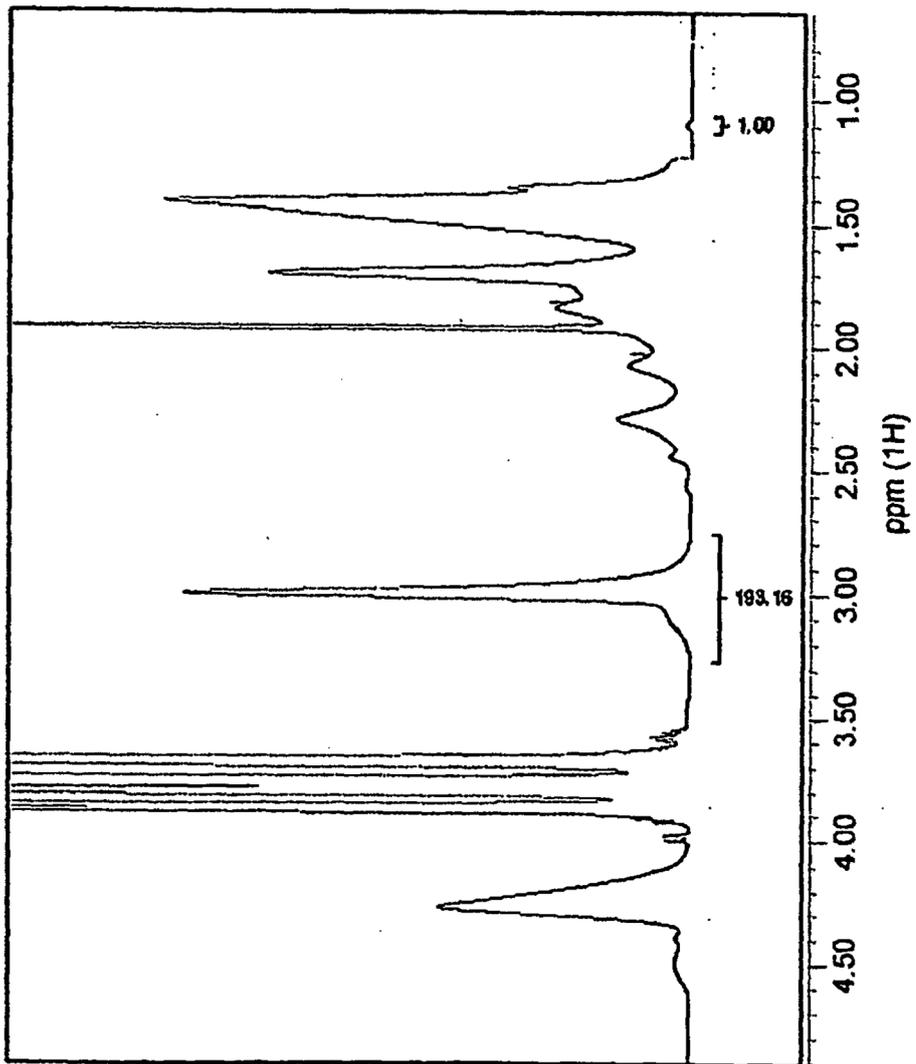


FIG. 8A

Máx. 500,81 recuentos

+TOF Product0(74.1): 0.117 a 0.334 min: desde DEA\_DF50.ms2.wiff  
a=3.56633255668805340e-004, ID=-2.24070593271955330e+001

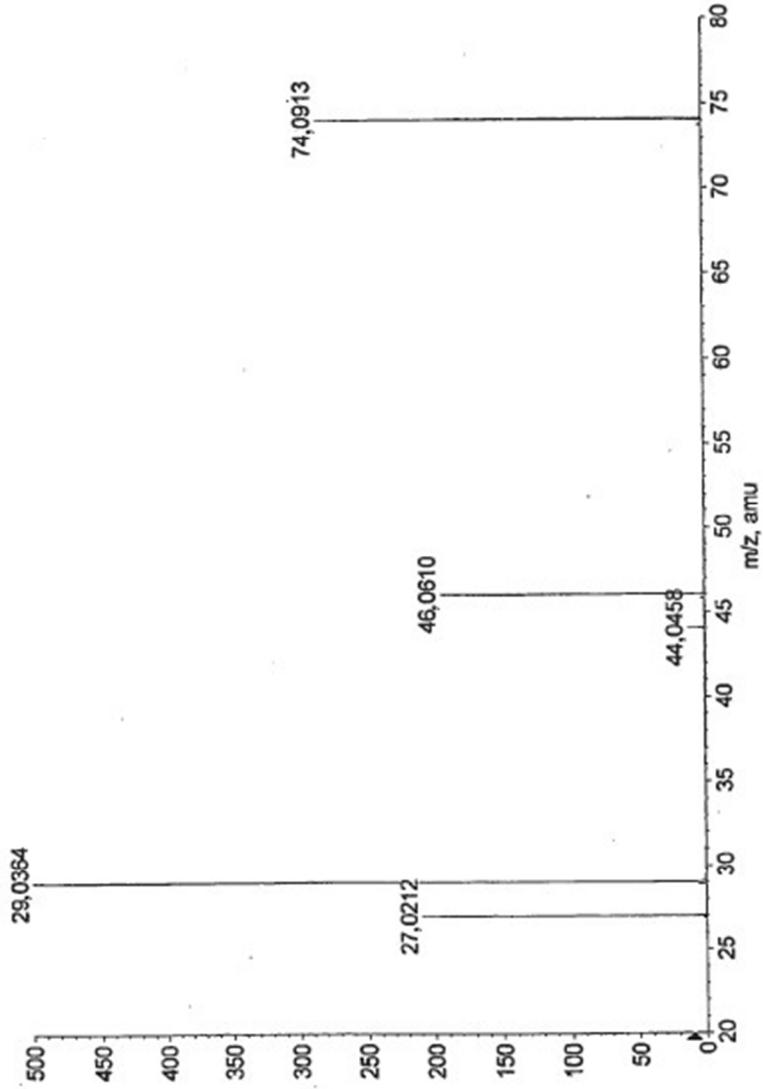


FIG. 8B

