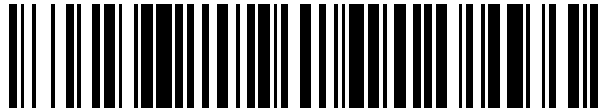


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 291**

51 Int. Cl.:

C07K 2/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2012 PCT/IN2012/000104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12123959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2012 E 12738623 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2675824**

54 Título: **Copolímero-1, proceso para la preparación y sus métodos de análisis**

30 Prioridad:

14.02.2011 IN 409MU2011

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**USV PRIVATE LIMITED (100.0%)
B. S. D. Marg Station Road Govandi
Mumbai 400 088, IN**

72 Inventor/es:

**SATHE, DHANANJAY GOVIND;
NAIDU, AVINASH, VENKATRAMAN;
SUBRAMANIAN, SUNDARAM;
BHATTACHARYYA, ANINDYA, SIBNATH;
SHEKHAWAT, RAKESH;
SAKSENA, DIVYA LAL;
SUKUMAR, RAMANUJAM y
PATIL, SANJAY VYANKATRAO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 654 291 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

Copolímero-1, proceso para la preparación y sus métodos de análisis

5 Campo de la invención:

La presente invención se refiere al uso de fracciones de polipéptidos como marcadores de pesos moleculares para acetato de glatiramer.

10 Antecedentes de la invención:

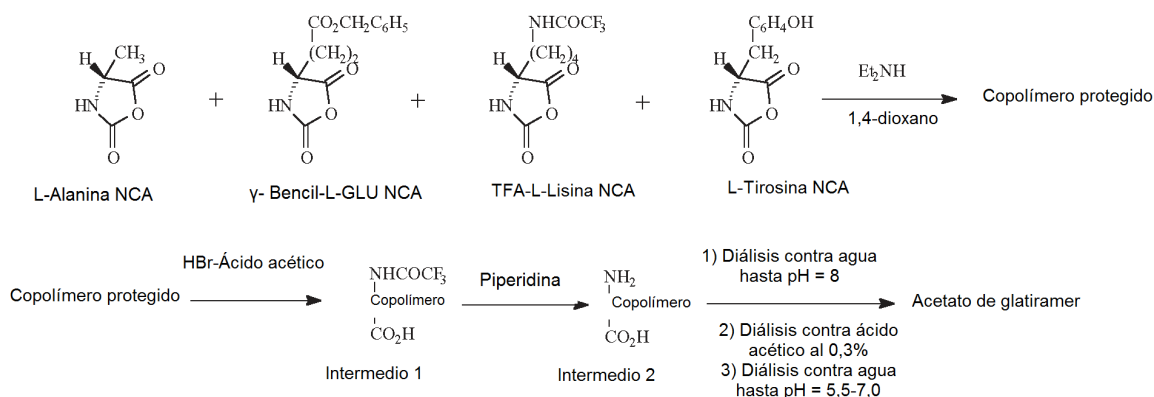
Una o más de las enfermedades neurológicas más comunes en adultos humanos es la esclerosis múltiple. Esta dolencia es una enfermedad del SNC inflamatoria crónica caracterizada patológicamente por la desmielinización en el cerebro y la médula espinal. Acetato de glatiramer (GA), conocido también como copolímero-1, ha mostrado ser también eficaz en el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM). Las inyecciones subcutáneas diarias de acetato de glatiramer (20 mg/inyección) reducen las lesiones, los índices de recidiva y la progresión de la discapacidad (Johnson K. P. et al., *Neurol.*, 1995, 45(7): 1268-76). Acetato de glatiramer reduce la proporción de nuevas lesiones de EM que evolucionan a "agujeros negros". (Filippi M. et al., *Neurol.*, 2001, 57:731-733).

20 Acetato de glatiramer (copolímero 1) se comercializa con el nombre comercial COPAXONE®. Está homologado para reducir la frecuencia de las recidivas en pacientes con esclerosis múltiple remitente recidivante (RRMS). Acetato de glatiramer consiste en sales de acetato de polipéptidos sintéticos, que contienen cuatro aminoácidos de origen natural: ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina con una fracción molar promedio de 0,141, 0,427, 0,095 y 0,338 respectivamente. Se sintetiza polimerizando químicamente los cuatro aminoácidos para dar como resultado el producto con el intervalo de pesos moleculares deseado. El peso molecular promedio de acetato de glatiramer es de 4.700-11.000 daltons [etiqueta estadounidense para polvo liofilizado] o 5.000-9.000 daltons [Etiqueta estadounidense para la jeringa precargada/Resumen de características del producto]. Copaxona comprende una mezcla de polipéptidos que tienen diferentes pesos y secuencias moleculares.

La fórmula estructural de copaxona es
 30 (Glu, Ala, Lys, Tyr)_x. XCH₃COOH
 (C₅H₉NO₄. C₃H₇NO₂. C₆H₁₄N₂O₂. C₉H₁₁NO₃)_x. XC₂H₄O₂

El proceso para la preparación de acetato de glatiramer se describe en Euro. J. Immun. 1.242-248(1971) [Tietelbaum et al] y documento US3849550 [Tietelbaum et al]. El documento US3849550 divulga un proceso, en el que los anhídridos de N-carboxi de tirosina, alanina, glutamato de γ-bencilo y ε-N-trifluoroacetil lisina se polimerizan a temperatura ambiente en dioxano anhidro con dietilamina como iniciador. El desbloqueo del grupo γ-carboxilo del ácido glutámico se efectúa mediante bromuro de hidrógeno en ácido acético glacial al que sigue la eliminación de los grupos trifluoroacetilo de los restos de lisina mediante piperidina 1 M.

40 El proceso para la preparación del copolímero 1 también se divulga en los documentos US5800808, IN 190759, US5981589, US6054430, US6342476, US6362161 y WO00/05250. Estos documentos detallan el proceso para preparar el copolímero 1 que implica la polimerización de cuatro N-carboxianhídridos de aminoácidos para obtener el copolímero protegido y la desprotección del copolímero protegido utilizando bromuro de hidrógeno en ácido acético y piperidina para obtener el copolímero desprotegido que a continuación se somete a diálisis para la purificación y el intercambio de sales.



Esquema I

50 El documento US20060172942 divulga un proceso para la preparación de acetato de glatiramer que implica polimerizar N-carboxianhídridos de tirosina, alanina, γ-glutamato de bencilo y trifluoroacetil lisina para obtener

polipéptidos protegidos. El grupo protector de bencilo de los polipéptidos protegidos se elimina mediante hidrogenólisis catalítica seguido por la eliminación del grupo protector de trifluoroacetilo poniendo en contacto el polipéptido con una base orgánica. Los grupos trifluoroacetilo libres y las impurezas de bajo peso molecular se eliminan de la mezcla polipeptídica mediante ultrafiltración seguida por puesta en contacto de la mezcla polipeptídica con una solución acuosa de ácido acético para obtener la sal de acetato del polipéptido.

El documento US7049399 describe un proceso para la preparación de un polipéptido que comprende la polimerización de una mezcla de los N-carboxianhídridos de L-alanina, L-tirosina, un L-glutamato protegido y una L-lisina protegida para obtener el copolímero protegido o una de sus sales; la desprotección del copolímero protegido (o una de sus sales) para producir el polipéptido o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en una única etapa; la separación y purificación del polipéptido (o una de sus sales farmacéuticamente aceptables) para obtener un polipéptido purificado. La desprotección del copolímero protegido se lleva a cabo tanto mediante hidrogenación con transferencia catalítica o hidrogenación catalítica bajo presión de hidrógeno que varía entre 40-100 psi (275,79-689,476 kPa) y a una temperatura comprendida en el intervalo de 50° - 80 °C.

La desventaja con respecto al proceso divulgado en estos documentos es que la hidrogenólisis requiere una elevada presión y temperatura, que a su vez necesita una precaución de funcionamiento adicional a gran escala, aumentando de esta manera el coste de producción. Como Copaxone es estable a una baja temperatura de 2 °C a 8 °C, una elevada temperatura durante la etapa final puede dar como resultado la degradación del producto reduciendo por tanto la calidad y el rendimiento del producto deseado.

El documento W02006050122 describe un proceso en dos etapas para preparar acetato de glatiramer. El proceso implica polimerizar una mezcla de N-carboxianhídrido de L-tirosina, N-carboxianhídrido de L-alanina, N-carboxianhídrido de L-glutamato protegido y N-carboxianhídrido de L-lisina N-protegida, en un disolvente aprótico polar, en presencia de un iniciador, para formar un glatiramer protegido; añadiendo un ácido y/o una base orgánica o inorgánica al glatiramer protegido formado para formar glatiramer; y tratar el glatiramer obtenido con ácido acético para formar acetato de glatiramer. La desprotección del glatiramer protegido se lleva a cabo mediante dos métodos diferentes. Un primer método de desprotección es mediante tratamiento con un ácido, y un segundo método para la desprotección se lleva a cabo mediante tratamiento con un hidróxido de metal alcalinotérreo. La desventaja de este proceso es que el uso de un hidróxido de metal alcalinotérreo para la desprotección de péptidos da como reacciones lentas y la formación de elevados niveles del diastereómero resultante de la racemización/epimerización de los centros estereogónicos (Ahmed F. Abdel-Magid et. al., Tetrahedron Letters 39, 3391 (1998)).

El documento W02006029393 divulga un proceso para producir una mezcla de polipéptidos de trifluoroacetilo que no tienen todos la misma secuencia de aminoácidos, donde cada polipéptido consiste esencialmente en alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina, en el que la mezcla tiene un peso molecular promedio deseado que comprende desproteger una mezcla de polipéptidos consistentes cada uno esencialmente en alanina, γ -glutamato de bencilo, tirosina y trifluoroacetil lisina con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético, cuya solución comprende menos de 0,5 % de bromo libre y menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos. Este divulga además que la solución de ácido bromhídrico en ácido acético que tiene menos de 0,5 % de bromo libre puede conseguirse pretratando la solución con un secuestrante de bromo, preferentemente fenol, para disminuir el nivel de bromo libre. Este divulga también el uso de 10 % a 36 % de ácido bromhídrico en ácido acético.

El documento US20080021200 divulga un proceso para preparar un polipéptido que comprende L-tirosina, L-alanina, L-glutamato y L-lisina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que dicho proceso comprende, (a) polimerizar una mezcla de N-carboxianhídrido de L-tirosina, N-carboxianhídrido de L-alanina, N-carboxianhídrido de un L-glutamato protegido y N-carboxianhídrido de una L-lisina protegida, en un disolvente polar aprótico en presencia de un iniciador, para formar un polipéptido protegido; (b) premezclar un ácido con el polipéptido protegido formado en la etapa (a) y un disolvente, para formar un producto; y (c) premezclar una sustancia seleccionada entre el grupo que consiste en diisopropilamina, isopropilamina, amoniaco, y mezclas de los mismos, con el producto formado en la Etapa (b), y agua o una mezcla de un disolvente y agua, para formar un polipéptido desprotegido o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Se divulga además que la diisopropilamina y la isopropilamina fueron las únicas aminas que eliminaron satisfactoriamente el grupo N-trifluoroacetilo del resto lisina. Se divulga también que, cuando se usa diisopropilamina o isopropilamina para la eliminación de grupo trifluoroacetilo, se obtiene una solución transparente después de aproximadamente 1 h o después de aproximadamente 1,5 h respectivamente.

El documento WO2009016643 describe un proceso para la preparación de acetato de glatiramer (copolímero 1) donde el copolímero 1 de trifluoroacetilo, obtenido después de la reacción de desbencilación, se lavó con un disolvente orgánico para eliminar el bromuro de bencilo reactivo, generado como un subproducto de reacción. El bromuro de bencilo liberado es un electrófilo muy reactivo y reacciona con nucleófilos análogos a aminas primarias y secundarias para generar los productos N-alquilados no deseados. Asimismo, es altamente lacrimógeno y el manejo en grandes cantidades a escala comercial es peligroso e inseguro. el documento WO2009016643 divulga también la reacción de desbencilación del copolímero 1 protegido durante una duración más corta de tiempo a una temperatura superior y un método para eliminar el bromuro de bencilo de la mezcla de reacción. La eliminación del grupo protector de bencilo del ácido glutámico se realiza con bromuro de hidrógeno al 33 % en ácido acético a 35-45 °C durante 1-5 horas, reduciendo por tanto el tiempo de reacción, y, a fin de eliminar el bromuro de bencilo, el producto filtrado se lava con un

disolvente orgánico. Este método emplea un disolvente orgánico adicional que es indeseable a escala comercial. De este modo, los procesos para la preparación de acetato de glatiramer anteriormente divulgados no son industrialmente factibles.

5 Los inventores de la presente invención han desarrollado un proceso simple, económico, eficaz, comercialmente viable y coherente para la preparación del copolímero 1 (Acetato de glatiramer). El uso de HBr al 33 % de conduce a la escisión de las uniones peptídicas en el polímero dando como resultado compuestos de bajo peso molecular. La presente memoria descriptiva proporciona un proceso comercialmente más viable para la preparación de acetato de glatiramer utilizando HBr de aproximadamente 7 % a 20 %, preferentemente, HBr aproximadamente al 15 % en ácido acético para la eliminación del grupo protector de bencilo a temperatura ambiente, preferentemente de 10 aproximadamente 23 °C a 30 °C, más preferentemente a aproximadamente 25 °C, lo más preferente a 25 °C±0,2 °C. La presente memoria descriptiva proporciona además un proceso para la preparación de acetato de glatiramer donde el sólido húmedo obtenido después de la primera etapa de desprotección no se somete a secado y se utiliza tal cual en la reacción adicional, lo que ahorra un tiempo considerable y por tanto se considera que es un proceso industrialmente viable. La presente memoria descriptiva proporciona además un proceso para la eliminación del grupo protector de trifluoroacetilo utilizando amina, preferentemente amina secundaria tal como dialquil amina seleccionada a partir de 15 dietilamina, dimetil amina o diisopropilamina, preferentemente dietil amina.

La técnica anterior proporciona métodos para la determinación del peso molecular de polipéptidos, en particular, acetato de glatiramer. El documento W0200018794 (WO'794) divulga el uso de una pluralidad de marcadores de pesos moleculares para establecer una relación entre el tiempo de retención en una columna cromatográfica y el peso molecular para la determinación del peso molecular promedio de lotes de acetato de glatiramer. Cada uno de estos marcadores de peso molecular divulgados en el documento WO'794 es un polipéptido y tiene una secuencia de aminoácidos predeterminada y un peso molecular definido. La presente invención proporciona el uso de fracciones de polipéptidos como marcadores de pesos moleculares para acetato de glatiramer, obtenidos sometiendo Copaxone/Acetato de glatiramer/Glatiramoides a cromatografía de exclusión molecular (SEC) o cromatografía de permeación en gel (GPC), para la determinación del peso molecular de lotes de acetato de glatiramer. Las fracciones de polipéptidos (marcadores de pesos moleculares) obtenidas mediante el proceso descrito en el presente documento tienen un peso molecular definido. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de estas fracciones de polipéptidos es aleatoria. 20 25 30

Otra técnica analítica utilizada para caracterizar un polipéptido/proteína es el mapeo de péptidos. El mapeo de péptidos es un procedimiento comparativo donde la información obtenida, en comparación con un patrón de referencia o material de referencia tratado de forma similar, confirma la estructura primaria del polipéptido/proteína. Esto ayuda a detectar si se han producido alteraciones en la estructura y demuestra la consistencia del proceso y la estabilidad genética. El documento WO2010129851 proporciona un proceso por el cual se utilizan enzimas hidrolíticas para digerir un patrón de una mezcla compleja de polipéptidos tal como acetato de glatiramer, en varios fragmentos de péptidos. Los fragmentos de péptidos se analizan mediante espectrometría de masas. Los resultados de espectrometría de masas de cada muestra se utilizan como huella para comparación con otras muestras. Cada fragmento de péptido detectado por el primer analizador de masas se seleccionó y sometió a un segundo análisis por espectrometría de masas para escindir los iones del péptido precursor en fragmentos incluso más pequeños. Se analizaron los espectros de masas obtenidos a partir del análisis de EM/EM mediante un programa informático tal como Biotoools para obtener la secuencia de cada fragmento de péptido. 35 40

45 Expert Opin. Pharmacother. (2009) 10(4) divulga que el mapeo de polipéptidos utilizando la separación mediante electroforesis capilar de fragmentos de polipéptidos obtenidos tras la digestión con tripsina y el mapeo basado en la hidrólisis proteolítica por la carboxipeptidasa P seguida por la separación de los fragmentos mediante HPLC en fase inversa son métodos de discernir las diferencias de secuencias entre las estructuras GA y las de otros glatiramoides. La carboxipeptidasa P es un reactivo caro y no fácilmente disponible. Los inventores de la presente invención ensayaron diversas combinaciones de enzimas proteolíticas. Los inventores de la presente invención han descubierto que una mezcla de polipéptidos tratados con tripsina seguida por el tratamiento con carboxipeptidasa B proporciona resultados similares a los de la carboxipeptidasa P. 50

Objetivo de la invención:

55 Un objetivo de la presente invención es proporcionar el uso de fracciones de polipéptidos como marcadores de pesos moleculares para acetato de glatiramer.

Sumario de la invención:

60 La presente invención proporciona el uso de fracciones de polipéptidos como marcadores de pesos moleculares para acetato de glatiramer, en el que las fracciones de polipéptidos tienen una secuencia de aminoácidos aleatoria similar a la de acetato de glatiramer y se obtienen mediante un proceso que comprende las etapas de,

65 a) someter una mezcla de polipéptidos, que es una mezcla de polipéptidos que contiene alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina en la misma relación molar que está presente en acetato de glatiramer, a cromatografía de

permeación en gel (GPC)/Cromatografía de exclusión molecular (SEC) para obtener fracciones de polipéptidos que tienen pesos moleculares en el intervalo de 2 kD a 30 kD;

b) seleccionar fracciones de polipéptidos a usar como marcadores de pesos moleculares a partir de dichas fracciones de polipéptidos obtenidas en la etapa a) de tal manera que una de las fracciones representa el peso molecular del vértice del pico y otras fracciones están distribuidas a ambos lados del peso molecular del vértice del pico; y

c) determinar el factor de cola de estas fracciones de polipéptidos seleccionados.

Las realizaciones preferidas de dicho uso se reivindican en las reivindicaciones 2 a 20.

Breve descripción de los dibujos:

Fig.1: Gráfica que muestra el fraccionamiento del lote n.º P53289 de Copaxone®.

Fig. 2: Perfil de pico superpuesto de las fracciones seleccionadas (marcadores de pesos moleculares).

Fig. 3: Curva de calibración de los marcadores de pesos moleculares fraccionados.

Fig. 4: Determinación del peso molecular del lote n.º 53119 de Copaxone® mediante GPC utilizando marcadores de pesos moleculares fraccionados.

Fig. 5: Gráfica que muestra el fraccionamiento de acetato de glatiramer preparado mediante el proceso descrito en el presente documento

Fig. 6: Curva de calibración del acetato de glatiramer fraccionado preparado mediante el proceso descrito en el presente documento.

Fig. 7: Determinación del peso molecular de acetato de glatiramer utilizando los marcadores proporcionados en la Tabla 4.

Fig. 8: Cromatograma superpuesto que compara el modelo de escisión de Copaxone® y acetato de glatiramer, obtenido mediante el proceso descrito en el presente documento, cuando se trata con la enzima tripsina.

Fig. 9: Cromatograma superpuesto que compara el modelo de escisión de Copaxone® y acetato de glatiramer, obtenido mediante el proceso descrito en el presente documento, cuando se trata con tripsina seguido por la enzima carboxipeptidasa B.

Descripción detallada de la invención:

La presente invención proporciona el uso de fracciones de polipéptidos como marcadores de pesos moleculares para determinar el peso molecular del acetato de glatiramer (Copolímero 1).

Los marcadores de pesos moleculares utilizados en la presente invención son fracciones de polipéptidos que consisten en polipéptidos con una secuencia de aminoácidos aleatoria similar a la del acetato de glatiramer. Estos marcadores de pesos moleculares contienen alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina en la misma relación molar que está presente en acetato de glatiramer.

Una realización de la presente invención proporciona el uso de fracciones de polipéptidos como marcadores de pesos moleculares para acetato de glatiramer, en el que las fracciones de polipéptidos tienen una secuencia de aminoácidos aleatoria similar a la de acetato de glatiramer, y se obtienen mediante un proceso que comprende las etapas de,

a) someter una mezcla de polipéptidos que es una mezcla de polipéptidos que contienen alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina en la misma relación molar que está presente en acetato de glatiramer, a cromatografía de permeación en gel (GPC)/Cromatografía de exclusión molecular (SEC) para obtener fracciones de polipéptidos que tienen pesos moleculares en el intervalo de 2 kD a 30 kD;

b) seleccionar fracciones de polipéptidos a usar como marcadores de pesos moleculares a partir de dichas fracciones de polipéptidos obtenidas en la etapa a) de tal manera que una de las fracciones representa el peso molecular del vértice del pico y otras fracciones están distribuidas a ambos lados del peso molecular del vértice del pico; y

c) determinar el factor de cola de estas fracciones de polipéptidos seleccionados.

Preferentemente, el factor de cola de estas fracciones de polipéptidos seleccionados está en el intervalo de 0,8 a 1. La simetría del pico medida según el factor de cola es de gran importancia en el análisis cromatográfico. Cuando el factor de cola aumenta, la integración se vuelve menos fiable.

El factor de cola se puede calcular según el método USP.

Preferentemente, la polidispersidad de estas fracciones de polipéptidos seleccionados es menor que o igual a 1,20.

Preferentemente, la mezcla de polipéptidos es Copaxone® o acetato de glatiramer obtenido mediante el proceso descrito en el presente documento o mediante cualquier otro proceso conocido.

La columna utilizada en la técnica cromatográfica se selecciona entre Superosa-12 o Superdex-75, preferentemente Superosa-12. La fase móvil se selecciona entre acetato de amonio o formiato de amonio. Se usa acetato de amonio o

formiato de amonio en un intervalo de concentración de 0,1 a 0,3 M, preferentemente 0,2 M. El pH de la fase móvil es aproximadamente de 4 a 6, preferentemente 5. El caudal y la cantidad de solución de Copaxone®/acetato de glatiramer que se va a cargar en la columna depende del radio y la longitud de la columna. Los detectores utilizados para la técnica cromatográfica se seleccionan entre detector de UV, detector de índice de refracción, MALLS, detector de fluorescencia o sus combinaciones.

En una realización preferida de la presente invención, aproximadamente 0,5 a 4 mg de Copaxone®/acetato de glatiramer, preferentemente 2 mg, se somete a GPC (SEC) en una columna Superosa-12 o Superdex-75 utilizando formiato de amonio 0,2 M o acetato de amonio pH 5,0 como fase móvil. Se recogieron 22 fracciones individuales en un intervalo de 1 minuto como en la Fig. 1. Todas las fracciones se liofilizaron por separado. De las 22 fracciones, se seleccionaron cinco fracciones de tal manera que se seleccionaron dos de cada lateral del vértice del pico y de la fracción del vértice del pico. se determinó el factor de cola de estas fracciones de polipéptidos. El factor de cola está preferentemente en el intervalo de 0,8 a 1. Estas fracciones seleccionadas se suspenden en acetato de amonio o formiato de amonio 0,2 M pH 5,0 y la concentración final de cada una de estas fracciones se lleva hasta 1-10 mg/ml, preferentemente 6 mg/ml. Se determinaron los pesos moleculares de estas fracciones seleccionadas se determinaron utilizando SEC-MALLS. se determinaron el Mp (Peso molecular del vértice del pico), Mw (Peso molecular promedio en peso), Mn (Peso molecular promedio en número) y la polidispersidad de cada fracción seleccionada. valores casi idénticos de Mp, Mw y Mn sugieren que estas fracciones son casi monodispersas. La polidispersidad de estas fracciones es menor de 1,05. Estas fracciones caracterizadas se utilizaron como marcadores de pesos moleculares para la determinación de Mp, Mw y Mn de los lotes de acetato de glatiramer. Cada una de estas fracciones de polipéptidos consiste en un polipéptido con una secuencia de aminoácidos aleatoria. Se representó gráficamente la curva de calibración utilizando el log del peso molecular y el tiempo de retención de estas fracciones como se muestra en la Fig.3. El coeficiente de correlación (R^2) para la curva de calibración es 0,996.

Las condiciones de SEC-HPLC utilizadas para el fraccionamiento de Copaxone® son como se proporcionan en la Tabla 1 a continuación,

Tabla 1: Condiciones cromatográficas de SEC-HPLC

HPLC	HPLC de Waters
Detectores	UV, RI y MALLS
Software	Empower 2 y Astra
Columna	Superosa 12 (10/300 GL) o Superdex-75
Fase móvil	Acetato de amonio 0,2 M pH 5,0 o Formiato de amonio 0,2 M pH 5,0
Caudal	0,5 ml/min.
Detección UV	275 nm
Condiciones de RI	Sensibilidad: 32, Temp.: 30 °C
MALLS	Wyatt MiniDawn Treos

Se determinaron el Mp (Peso molecular del vértice del pico), Mw (Peso molecular promedio en peso) y Mn (Peso molecular promedio en número) para la fracción seleccionada se proporcionan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: Fracciones caracterizadas utilizadas como marcadores de pesos moleculares

Fracción	Mp (kD)	Mw (kD)	Mn (kD)	Polidispersidad PD=Mw/Mn
Fracción n.º 5	23,77	23,88	23,76	1,01
Fracción n.º 7	17,07	17,16	17,07	1,01
Fracción n.º 11	8,33	8,82	8,62	1,02
Fracción n.º 13	5,59	5,98	5,83	1,03
Fracción n.º 17	3,28	3,48	3,43	1,01

El índice de polidispersidad (PDI) es una medida de la distribución de la masa molecular en una muestra de polímero dada. Se calcula dividiendo el peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número. Valores casi idénticos de Mp, Mw y Mn sugieren que estas fracciones son casi monodispersas.

En otra realización preferida de la presente invención, Aproximadamente 40 mg de acetato de glatiramer se someten a GPC en un sistema GL de Superosa-12 (10/300) utilizando acetato de amonio 0,2 M pH 5,0 como fase móvil. Glatiramer comienza a eluir después de 20 minutos. se recogieron aproximadamente 30 fracciones en un intervalo de 0,5 min. se seleccionaron 12 a 15 fracciones. Estas fracciones se analizaron para el factor de cola, el peso molecular y la polidispersidad. Se seleccionaron las fracciones de tal manera que una de estas fracciones representa el peso molecular del vértice del pico y otras fracciones están distribuidas en cualquier lado del peso molecular del vértice del pico. Las fracciones que tienen una polidispersidad de menos de 1,2 se seleccionan y liofilizan. Las fracciones que tienen una polidispersidad de más de 1,2 se someten a purificación adicional con el fin de obtener fracciones que tienen una polidispersidad menor de 1,2. Preferentemente, se seleccionan fracciones que tienen un peso molecular de 3 kD, 5 kD, 7 kD, 10 kD y 12 kD para utilizarse como marcadores de pesos moleculares.

A continuación, en la Tabla 3, se proporcionan las condiciones de GPC utilizadas para el fraccionamiento del acetato de glatiramer preparado mediante el proceso descrito en el presente documento.

Tabla 3: Condiciones cromatográficas para la cromatografía de permeación en gel	
Sistema	Actapurifier
Columna	Superosa 12 (10/300 GL)
Fase móvil	Acetato de amonio 0,2 mM (pH 5,0)
Volumen de inyección	1 ml
Caudal	0,5 ml/min.
Tiempo total de análisis	60 min
Detector	UV
Detección UV	280 nm

Se determinaron los pesos moleculares de estas fracciones seleccionadas se determinaron utilizando SEC-MALLS. A continuación, en la Tabla 4, se muestran la Mp y la polidispersidad de estas fracciones seleccionadas,

Tabla 4: Fracciones caracterizadas utilizadas como marcadores de pesos moleculares

Fracción	Mp(kD)	Polidispersidad PD=Mw/Mn
Fracción n.º 16	12,56	1,05
Fracción n.º 18	10,05	1,08
Fracción n.º 22	7,38	1,17
Fracción n.º 24	5,06	1,11
Fracción n.º 26	3,2	1,05

Se puede seleccionar cualquier número de fracciones para utilizarse como marcadores. Los criterios de selección son que una de estas fracciones debe representar el peso molecular del vértice del pico y las otras fracciones que se seleccionan deben estar distribuidas en cualquier lado del peso molecular del vértice del pico.

Preferentemente, el factor de cola de estas fracciones seleccionadas está en el intervalo de 0,8 a 1.

Estas fracciones de polipéptidos seleccionadas que se van a usar como marcadores de pesos moleculares se caracterizan además por RMN y la relación de aminoácidos. El proceso para la preparación de marcadores de pesos moleculares como se describe en el presente documento es consistente y reproducible. Los marcadores de pesos moleculares obtenidos mediante el proceso descrito en el presente documento imitan el acetato de glatiramer en términos de volumen hidrodinámico.

Una realización preferida de la presente invención proporciona el uso según la reivindicación 1, en el que dichas fracciones de polipéptidos seleccionadas se utilizan como marcadores de pesos moleculares para determinar el peso molecular de un lote de acetato de glatiramer, mediante un proceso que comprende las etapas de,

- calibrar la columna SEC/GPC utilizando las fracciones de polipéptidos seleccionadas;
- establecer una relación entre el tiempo de retención y el log del peso molecular de estas fracciones

seleccionadas por medio de una curva de calibración;

c) someter el lote de acetato de glatiramer cuyo peso molecular se va a determinar a SEC/GPC para obtener el tiempo de retención; y

5 d) utilizar la relación entre el tiempo de retención y el log del peso molecular para determinar el peso molecular del lote de acetato de glatiramer.

Preferentemente, se determina el peso molecular del vértice del pico de acetato de glatiramer.

10 En una realización preferida, el peso molecular del vértice del pico de acetato de glatiramer se determina mediante SEC-HPLC utilizando los marcadores de pesos moleculares mencionados en el presente documento. Se calibra la columna SEC-HPLC utilizando las fracciones de polipéptidos seleccionadas que sirven como marcadores de pesos moleculares como se ha mencionado en el presente documento. Se establece una relación entre el tiempo de retención y el log del peso molecular de estos marcadores de pesos moleculares representando gráficamente una curva de calibración como se muestra en la Fig. 3. Copaxone®/Acetato de glatiramer se sometió a SEC-HPLC en una columna Superosa-12 o Superdex-75, preferentemente Superosa-12 (10 x 300 mm) utilizando formiato de amonio o acetato de amonio 0,2 M pH 5,0, preferentemente acetato de amonio como fase móvil. Se cargó un volumen de inyección de 50 µl de muestra que tiene una concentración de aproximadamente 2 mg/ml en la columna. El caudal se mantuvo a 0,5 ml/min y el tiempo total de análisis es de 60 min. Se determinó el peso molecular del vértice del pico utilizando un detector UV a una longitud de onda de 275 nm. Utilizando la curva patrón, se analizaron dos lotes de Copaxone® y acetato de glatiramer como se muestra en la Fig. 4, utilizando los marcadores de pesos moleculares mencionados en la Tabla 2 anterior y los resultados son como se muestra a continuación en la Tabla 5:

Tabla 5: Peso molecular de lotes de Copaxona/Acetato de glatiramer utilizando los marcadores de pesos moleculares mencionados en la Tabla 2 anterior (Curva de calibración):

Lote n.º	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)
Ejemplo 7	7,98	8,76	5,91
Ejemplo 8	7,73	8,87	6,1
Comp. n.º 53119	6,98	8,46	5,98
Comp. n.º 53289	7,87	9,55	6,55

25 Los resultados de la prueba para GPC de COPAXONE® utilizando los marcadores de pesos moleculares mencionados en la Tabla 2 anterior, son como se resumen a continuación en la Tabla 6:

Tabla 6: GPC de COPAXONA

COPAXONE® Lote n.º	Mp [D]
538490	7571
P53131	7892
538518	7514
P53119	6983
P53289	7870
P53630	7579
P53631	7566
P53313	7025
P53154	6535
P53613	7130

30 Se analizaron dos lotes de Copaxone® y acetato de glatiramer como se muestra en la Fig. 7, utilizando los marcadores de pesos moleculares mencionados en la Tabla 4 anterior y los resultados son como se muestra a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7: Peso molecular de lotes de Copaxona/Acetato de glatiramer utilizando los marcadores de pesos moleculares mencionados en la Tabla 4 anterior (Curva de calibración):

Lote n.º	Mp (kD)
Acetato de glatiramer obtenido mediante el proceso descrito en el presente documento	7275
Acetato de glatiramer obtenido mediante el proceso descrito en el presente documento	7234
P53313	7183
P53289	7571

Los lotes de Copaxona/Acetato de glatiramer analizados mediante este método muestran un peso molecular promedio entre 5000-9000 Daltons.

5 El lote de acetato de glatiramer, cuyo peso molecular se determinó usando el anterior método, se puede usar para la preparación de marcadores de pesos moleculares como se ha mencionado en el presente documento.

10 Una realización preferida de la presente invención proporciona el uso según la reivindicación 1, en el que la consistencia y la reproducibilidad de dicho proceso se ensaya mediante un método que comprende las etapas de:

- 15 a) obtener múltiples conjuntos de marcadores de pesos moleculares, mediante el proceso definido en la reivindicación 1, a partir de diferentes lotes de Acetato de glatiramer/Copaxona, conteniendo cada conjunto de marcadores de pesos moleculares que tienen un peso molecular en el intervalo de 2000 a 13000 daltons;
- b) asignando marcadores de pesos moleculares de cada conjunto obtenido en la etapa a) utilizando un proceso estadístico de aleatorización para generar además un conjunto más grande de marcadores de pesos moleculares;
- 20 y
- c) utilizando estos conjuntos más grandes obtenidos en la etapa b) como marcadores de pesos moleculares para determinar el peso molecular de un lote de Copaxona/Acetato de glatiramer mediante GPC;

En una realización preferida, se generaron cinco conjuntos de marcadores de pesos moleculares utilizando diferentes lotes de acetato de glatiramer. Cada conjunto contiene siete marcadores de pesos moleculares que tienen diferentes pesos moleculares en el intervalo de 2000 a 13000 daltons, como se muestra en la Tabla 8 siguiente.

Tabla 8:

Conjunto 1	Conjunto 2	Conjunto 3	Conjunto 4	Conjunto 5
12628	12208	12215	12373	12580
9892	9241	9915	10128	8939
7019	7991	6706	7870	6556
6185	6335	6073	6267	5890
5163	5704	5532	5631	4969
4888	4612	4755	4000	4069
2709	2989	3775	3292	3671

25 Se aplicó el proceso estadístico de aleatorización a estos cinco conjuntos de marcadores de pesos moleculares para generar un conjunto más grande de marcadores de pesos moleculares, conteniendo cada conjunto siete marcadores de pesos moleculares como en la Tabla 9 a continuación,

Tabla 9:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12215	12628	12373	12628	12215	12215	12215	12373	12373	12628
8939	10128	9241	8939	10128	9892	9892	9915	9915	9915
7991	6556	7991	7991	6556	7991	6706	6706	6706	6556
6267	6073	6335	6073	6267	6073	5890	5890	6267	6185
4969	5163	5704	5532	5704	4969	5532	5704	4969	4969
4755	4069	4069	4069	4000	4755	4612	4755	4755	4755
2989	3775	2989	2709	2989	2989	3671	3775	3671	3292

Estos conjuntos más grandes de marcadores se usaron a continuación para determinar el peso molecular del vértice del pico del lote del acetato de glatiramer y los resultados fueron como se muestran en la tabla 10 siguiente,

5

Tabla 10:

Lote n.º	Mín.	Máx.	Dif	Media	SD	RSD	Intervalo de confianza (nivel del 95 %)
Lote 1	6811	7108	297	6916	95,00	1,37	6971
Lote 2	6739	7036	297	6842	95,61	1,40	6897
Lote 3	6763	7060	297	6867	95,37	1,39	6922

Este estudio de aleatorización revela que cualquier permutación-combinación de marcadores de pesos moleculares tomados de diferentes conjuntos proporcionará resultados predecibles basándose en un intervalo de confianza del 95 %. Esto indica que el proceso descrito en el presente documento para la preparación de marcadores de pesos moleculares es coherente, reproducible y no se ve afectado por la variación entre lotes del material de partida. Los marcadores de pesos moleculares generados usando el proceso descrito en el presente documento a partir de diferentes lotes de acetato de glatiramer proporcionaron resultados predecibles basándose en un intervalo de confianza del 95 %.

10

De manera alternativa, se pueden determinar los pesos moleculares de acetato de glatiramer utilizando glatiramoides como marcadores de pesos moleculares. Los glatiramoides son una mezcla de polipéptidos heterogéneos que comprende los cuatro aminoácidos, ácido L-glutámico, L-Alanina, L-lisina y L-tirosina en la misma relación molar que glatiramer. Se obtuvieron glatiramoides de diversos pesos moleculares inactivando la mezcla de reacción a diversos intervalos temporales durante la etapa de desprotección del ácido acético con HBr seguida por desprotección utilizando aminas tales como dietilamina, dimetilamina, diisopropilamina o piperidina, preferentemente dietilamina.

15

20

Se divulga también un proceso mejorado para la preparación de polipéptidos, particularmente acetato de glatiramer, conocido también como copolímero 1, con un peso molecular promedio de 5000-9000 Daltons, a partir de aminoácidos, concretamente, L-tirosina, L-alanina, ácido L-glutámico y L-lisina o sus sales farmacéuticamente aceptables.

25

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención se proporciona el uso según la reivindicación 4, en el que dicho copolímero 1 (acetato de glatiramer) se prepara mediante un proceso que comprende las etapas de:

30

- tratar el copolímero protegido con HBr de aproximadamente 7 % a 20 % en ácido acético a aproximadamente 25 °C durante aproximadamente 21-23 horas para obtener el copolímero de trifluoroacetilo;
- tratar dicho copolímero de trifluoroacetilo con una base para obtener el copolímero desprotegido completamente; y
- convertir el copolímero completamente desprotegido en copolímero 1.

35

El copolímero protegido se obtiene polimerizando una mezcla de N-carboxianhídrido de L-alanina, N-carboxianhídrido de L-glutamato γ -protegido, N-carboxianhídrido de L-lisina ϵ -N-protegida y N-carboxianhídrido de L-tirosina en presencia de un iniciador para obtener el copolímero protegido. El grupo protector (GP) del grupo C -carboxi libre del ácido L-glutámico se selecciona entre un grupo alquilo, arilo o aralquilo sustituido o no sustituido, preferentemente un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido y el grupo protector (GP) para el grupo ϵ -amino libre de L-lisina, se selecciona entre acilo o acilo sustituido donde los sustituyentes se seleccionan entre un grupo alquilo, arilo o halo, preferentemente un grupo trifluoroacetilo.

40

En una realización preferida de la presente invención, una mezcla de N-carboxianhídrido de L-alanina, N-carboxianhídrido de L-glutamato de γ -bencilo, N-carboxianhídrido de N-trifluoroacetil L-lisina y N-carboxianhídrido de L-tirosina, se disuelve en un disolvente adecuado, preferentemente dioxano anhídrido durante un periodo de 1 hora, preferentemente 30 min, más preferentemente 15 min. A esta mezcla, se añadió dietilamina al 1 % en dioxano anhídrido en un lote. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h a 200-215 rpm. Tras finalizar la reacción, se añadió agua desionizada a la mezcla de reacción para obtener el copolímero protegido como un sólido de color blanco. El sólido obtenido se filtró al vacío, se lavó con agua desionizada y se secó hasta que se consiguió la pérdida en el secado de un 10 % de NMT (LOD). El copolímero protegido se trató con aproximadamente 7 % a 20 % de bromuro de hidrógeno (HBr), preferentemente, aproximadamente 15 % de HBr en ácido acético y la mezcla se agitó a aproximadamente 25 °C, preferentemente a 25 °C \pm 0,28 °C durante aproximadamente 21-23 horas a 200-215 rpm para obtener un copolímero de trifluoroacetilo. A continuación, la mezcla de reacción se vertió en agua fría en hielo para obtener un sólido de color blanco que se neutralizó a continuación tratándolo con una solución de amoníaco hasta que se consiguió un pH de 6-7 y se agitó durante 24 h. El sólido se filtró y se lavó con agua. Este tratamiento de la suspensión sólida obtenida con solución de amoníaco descompone también el bromuro de bencilo que se genera durante la reacción.

El copolímero parcialmente desprotegido, el copolímero de trifluoroacetilo así obtenido, se convirtió en acetato de glatiramer mediante el proceso divulgado en la solicitud de patente india 1082/MUM/2009 publicada con fecha 23 de abril de 2009 o mediante cualquier otro método conocido.

La técnica anterior describe la eliminación del grupo protector de bencilo del ácido glutámico utilizando un 33 % de bromuro de hidrógeno en ácido acético. El uso de 33 % de HBr-ácido acético (condiciones duras para los péptidos) puede conducir a una escisión inconsistente y aleatoria de los enlaces peptídicos en el polímero que sobre la desprotección adicional da como resultado acetato de glatiramer que tiene un peso molecular inconsistente. Este proceso descrito en el presente documento emplea el uso de aproximadamente 7 % a 20 % de HBr, preferentemente, aproximadamente 15 % a aproximadamente 25 % durante aproximadamente 21-23 horas para la eliminación del grupo protector de bencilo, que sobre la desprotección adicional da como resultado acetato de glatiramer que tiene pesos moleculares que son consistentes y reproducibles.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, aproximadamente 7 % a 20 % de HBr, preferentemente, aproximadamente 15 % de HBr en ácido acético se introduce en un reactor a temperatura controlada y se agitó a 200-215 rpm durante 20-60 minutos, preferentemente 30 minutos hasta que se alcanzaron aproximadamente 25 °C. Se añadió secuestrante a la mezcla de reacción y se agitó durante 1-3 horas, preferentemente, durante 2 horas a temperatura ambiente, preferentemente a aproximadamente 25 °C a 200-215 rpm seguido por la adición de copolímero protegido al reactor y agitación a temperatura ambiente, preferentemente a aproximadamente 25 °C, más preferentemente a 25 °C \pm 0,2 °C a 200-215 rpm durante 20-25 horas, preferentemente 21-23 horas. La mezcla de reacción se inactivó en agua fría para obtener un sólido de color blanco seguido por la adición de una solución de amoníaco hasta que se consiguió el pH de 6-7 y se agitó durante 24 h. El sólido obtenido, el copolímero de trifluoroacetilo, se filtró, se lavó con agua y se secó al aire. Los secuestrantes utilizados para reducir el contenido de bromo libre se seleccionaron entre fenol, resorcinol, tirosina, bisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, naftaleno, 1-naftol o 2-naftol, preferentemente fenol o resorcinol.

Se divulga también un proceso para la preparación de acetato de glatiramer que comprende someter el copolímero protegido a una reducción del tamaño de partículas, con el fin de obtener uniformidad en el tamaño de partículas, antes de la desprotección. Esto asegura consistencia y reproducibilidad en los pesos moleculares de los lotes de acetato de glatiramer. En una realización preferida, el copolímero protegido se pasa a través de un tamiz de malla 30 con el fin de obtener un tamaño de partículas uniforme.

Se divulga también un proceso para la preparación de copolímero 1 (acetato de glatiramer) que comprende tratar el copolímero protegido o copolímero de trifluoroacetilo con dialquil amina tal como dietilamina, dimetilamina, diisopropilamina, preferentemente dietilamina para obtener copolímero parcialmente desprotegido o copolímero completamente desprotegido y convertir el copolímero parcialmente desprotegido o el copolímero completamente desprotegido obtenido en copolímero 1 (Acetato de glatiramer).

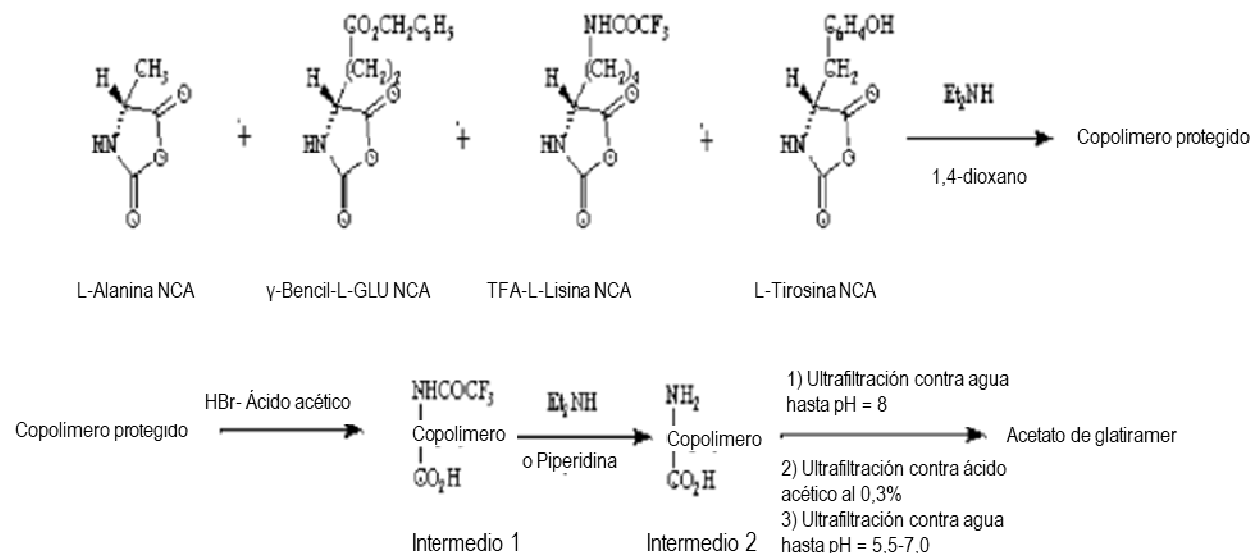
En una realización preferida de la presente invención, el copolímero parcialmente desprotegido, el copolímero de trifluoroacetilo, se suspende en un disolvente adecuad, preferentemente agua, y se trata con dietilamina seguido por agitación durante 20-30 horas, preferentemente 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se pasó a través de un filtro de 0,2 μ , se sometió a filtración en flujo tangencial a través de un casete que tiene un corte de pesos moleculares (MWCO) de 1 KD, se diafiltró con agua desionizada hasta que se consiguió un pH de 8-9, a continuación con una solución acuosa de ácido acético al 0,3 % seguido por lavado con agua desionizada hasta que se consiguió un pH de 5,5-7,0. La solución obtenida se liofilizó a continuación para obtener el copolímero 1 (Acetato de glatiramer) con el intervalo de pesos moleculares deseado. El sólido obtenido presenta un peso molecular promedio en el intervalo de 5000 a 9000 Daltons como se determinó mediante GPC y MALLS. De manera alternativa, la anterior solución puede tomarse como tal para la formulación.

En el proceso descrito en el presente documento, se usó dietilamina como un iniciador así como un agente de

desprotección. Dietilamina, cuando se usa en cantidades más pequeñas en el intervalo de 0,5 % a 5 % con respecto a los NCA de los L-aminoácidos, actúa como un iniciador, y cuando se usa en cantidades mayores en el intervalo de 1 a 5 veces el peso del copolímero protegido, actúa como un agente de desprotección para la eliminación de los grupos N^ε-trifluoroacetilo.

5

Este esquema de reacción es como se muestra en el Esquema II siguiente:



Esquema II

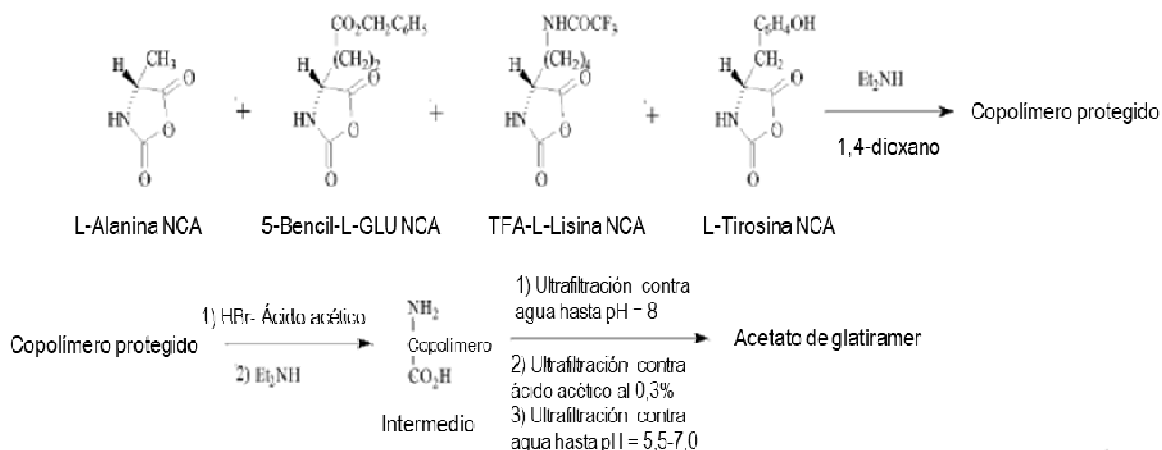
10 Se divulga también un proceso para la preparación del copolímero 1 (Acetato de glatiramer), que comprende las etapas de,

- a) polimerizar una mezcla de N-carboxianhídridos de alanina, N-carboxianhídrido de L-glutamato γ-protegido, N-carboxianhídrido de L-lisina ε-N-protegida y N-carboxianhídrido de L-tirosina en presencia de iniciador para obtener copolímero protegido;
- 15 b) tratar opcionalmente el copolímero protegido para obtener un tamaño de partículas uniforme;
- c) tratar el copolímero protegido de la etapa a) o b) con aproximadamente 7 % a 20 % de HBr, preferentemente aproximadamente 15 % de HBr en ácido acético a temperatura ambiente, preferentemente a aproximadamente 25 °C, más preferentemente a 25 °C±0,2 °C durante aproximadamente 21-23 h para obtener el copolímero parcialmente desprotegido, el copolímero de trifluoroacetilo;
- 20 d) tratar el copolímero parcialmente desprotegido obtenido, el copolímero de trifluoroacetilo con dietilamina para obtener el polímero completamente desprotegido ;
- e) someter el copolímero completamente desprotegido a purificación e intercambio de sales.

25 Preferentemente, el copolímero protegido de tamaño de partículas uniforme puede obtenerse haciendo pasar el copolímero protegido a través de un tamiz de un tamaño de malla deseado, preferentemente tamiz de malla 30.

30 Se divulga también un proceso para la preparación de acetato de glatiramer donde la secuencia de desprotección está invertida, que comprende tratar en primer lugar el copolímero protegido con dietil amina para eliminar el grupo trifluoroacetilo y a continuación con HBr/ácido acético para eliminar el grupo bencilo.

35 Se divulga también un proceso para la preparación de acetato de glatiramer donde el sólido húmedo obtenido después de la primera etapa de desprotección no está sometido a secado y se utiliza como tal para la reacción adicional que ahorra un tiempo considerable y por tanto se considera que es un proceso industrialmente viable. El Esquema de reacción es como se muestra a continuación en el Esquema III,



Esquema III

Una realización preferida de la presente invención proporciona el uso según la reivindicación 13, en el que dicha conversión del copolímero completamente desprotegido en acetato de glatiramer comprende las etapas de,

- 5 a) concentrar una solución acuosa de copolímero completamente desprotegido (Glatiramer) en un volumen mínimo utilizando filtración en flujo tangencial (TFF) haciéndolo pasar a través de una membrana de poliéter sulfona de un casete que tiene un corte de pesos moleculares (MWCO) de 1 KD;
- b) lavar la solución concentrada de la etapa a) con agua hasta que se consiguió un pH de 8 a 9 seguido por lavados con una solución de ácido acético al 0,3 % para el intercambio de sales para obtener acetato de glatiramer; y
- 10 c) lavar el acetato de glatiramer obtenido de la etapa b) con agua hasta que se consiguió un pH de 5,5 a 7 para obtener acetato de glatiramer puro.

El agua utilizada para el anterior proceso es preferentemente agua de RO (Ósmosis inversa) o WFI (agua para inyección).

- 15 Los polipéptidos de pesos moleculares bajos indeseados formados durante el proceso se eliminan mediante filtración. Las técnicas de filtración empleadas, para eliminar los polipéptidos de peso molecular indeseado se pueden seleccionar entre diálisis, ultrafiltración o filtración en flujo tangencial.

- 20 El acetato de glatiramer obtenido mediante el proceso descrito en el presente documento tiene un contenido de tirosina bromada no mayor de aproximadamente 0,15 % cuando se ensaya mediante el método de HPLC en fase inversa y un contenido de dietilamina no mayor de aproximadamente 5000 ppm, cuando se ensaya mediante el método de cromatografía de iones.

- 25 El N-carboxianhídrido (NCA) de L-aminoácidos tales como L-tirosina, L-alanina, ácido L-glutámico protegido y L-lisina protegida puede prepararse como se divulga en la solicitud de patente india 1082/MUM/2009dated con fecha 23 de abril de 2009 o mediante cualquier otro método conocido.

- 30 El copolímero 1 (Acetato de glatiramer) obtenido mediante el proceso descrito en el presente documento caracterizado mediante MALDI, IR, RMN, GPC, CD, UV y análisis de aminoácidos (AAA), se encuentra que es equivalente a COPAXONE®.

- 35 Acetato de glatiramer, preparado mediante el proceso descrito en el presente documento tiene un peso molecular promedio de entre 5000-9000 D y está sustancialmente exento de especies de elevado peso molecular que tienen un peso molecular igual o mayor que aproximadamente 35 KD. se puede determinar el peso molecular del acetato de glatiramer obtenido utilizando los marcadores descritos en el presente documento.

- 40 Acetato de glatiramer es una mezcla de polipéptidos compuestos por una mezcla de alanina, ácido glutámico, lisina y tirosina en una relación molar de aproximadamente 4,6:1, 5:3, 6:1 respectivamente. Las fracciones molares correspondientes son aproximadamente 0,427 para alanina, 0,141 para ácido glutámico, 0,338 para lisina y 0,095 para tirosina, que puede variar en aproximadamente ± 10 %. Las fracciones molares de aminoácidos se determinan mediante cromatografía líquida de rendimiento ultra alto (UPLC) utilizando una columna AccQTag Ultra (2,1x100 mm, 1,7 μ m) y un detector UV. Se utilizó un sistema en gradiente como la fase móvil.

La fracción molar medida para la muestra innovadora (COPAXONE®) y el copolímero 1 (acetato de glatiramer) preparados como se describe en el presente documento se encuentra que está en el intervalo mencionado en la Tabla 11.

5 En la Tabla 11 se resume el intervalo normalizado de fracciones molares para los aminoácidos:

Aminoácidos	Fracción molar est.	Intervalo de fracción molar est.
L-Tirosina	0,095	0,085 -0,104
Ácido L-glutámico	0,141	0,127 -0,155
L-lisina	0,338	0,304 -0,372
L-Alanina	0,427	0,384 -0,470

10 Otro método adicional para caracterizar polipéptidos es el mapeo de péptidos. este implica un tratamiento químico o enzimático del polipéptido resultante en la formación de fragmentos de péptidos seguida por la separación en identificación de los fragmentos de una manera reproducible. El mapeo de péptidos es un procedimiento comparativo, debido a que la información obtenida, en comparación con el material de referencia tratado de forma similar, confirma la estructura primaria del polipéptido. Se puede revisar un mapeo de péptidos como una huella de una proteína/polipéptido.

15 Una realización preferida de la presente invención proporciona el uso según la reivindicación 13, en el que el acetato de glatiramer se caracteriza adicionalmente por el mapeo de péptidos utilizando tripsina y carboxipeptidasa B, que comprende las etapas de,

- 20 a) tratamiento enzimático del acetato de glatiramer utilizando tripsina para obtener fragmentos de péptidos de longitudes de cadenas cortas;
- b) tratar los fragmentos de péptidos obtenidos en la etapa a) con carboxipeptidasa B dando como resultado una fragmentación adicional de la cadena peptídica;
- 25 c) separar y analizar los fragmentos de péptidos obtenidos en la etapa b) utilizando la técnica de HPLC para obtener el cromatograma; y
- d) comparar el cromatograma obtenido de esta manera con el cromatograma de referencia normalizado para determinar la similitud estructural.

Preferentemente, el patrón de referencia es Copaxone® (formulación comercializada).

30 En una realización preferida, El acetato de glatiramer obtenido como se describe en el presente documento se somete a tratamiento enzimático utilizando tripsina (tratada con tosil-L-fenil alanina clorometil cetona) a una temperatura de aproximadamente 37 °C y un pH de aproximadamente. Este tratamiento se continuó durante aproximadamente 4 horas para obtener fragmentos de péptidos de longitudes de cadena cortas. Esta mezcla de fragmentos de péptidos obtenida tras el tratamiento con tripsina se sometió a tratamiento con carboxipeptidasa B a 37 °C durante

35 aproximadamente 18 horas que dio como resultado una fragmentación adicional de la cadena peptídica. Esos fragmentos se separaron y analizaron en una columna de HPLC C18, de 250 x 4,6 mm para obtener un cromatograma. El cromatograma obtenido de esta manera se comparó con el cromatograma obtenido sometiendo Copaxone® al mismo tratamiento que se ha mencionado anteriormente.

40 El cromatograma superpuesto del lote 53378 de Copaxone® y los lotes de acetato de glatiramer obtenidos como se describe en el presente documento se trataron con tripsina sola como se muestra en la Fig. 8. El cromatograma superpuesto del lote 53378 de Copaxone® y los lotes de acetato de glatiramer obtenidos como se describe en el presente documento se trataron con carboxipeptidasa B como se muestra en la Fig 9. Estos perfiles de cromatograma indican la similitud estructural entre los lotes de copaxona y acetato de glatiramer, obtenidos como se describe en el

45 presente documento.

En la Fig. 8 y la Fig. 9, (1) representa la solución de blanco; (2) representa el modelo de fragmentación para el patrón de referencia Te., lote 53378 de Copaxone®; y (3) y (4) representan el modelo de fragmentación para los dos lotes de acetato de glatiramer obtenidos mediante el proceso que se describe en el presente documento.

50 La técnica anterior divulga el uso de tripsina y carboxipeptidasa P para el mapeo de péptidos de acetato de glatiramer. Los inventores de la presente invención han descubierto que el acetato de glatiramer tratado con tripsina seguido por tratamiento con carboxipeptidasa B proporciona un modelo de escisión similar al de carboxipeptidasa B. Carboxipeptidasa B se selecciona sobre carboxipeptidasa P debido a su fácil disponibilidad y ahorro económico.

55

Se divulga también una composición farmacéutica en la forma de una forma farmacéutica inyectable que comprende una cantidad eficaz de acetato de glatiramer; y un agente de tonicidad farmacéuticamente aceptable.

5 Se divulga también una composición farmacéutica en la forma de una inyección subcutánea que comprende una dosis unitaria de 1 ml de una solución acuosa que comprende:

- a) 20 mg de acetato de glatiramer; y
- b) 40 mg de manitol.

10 Se divulga también un proceso para preparar una composición farmacéutica en la forma de una inyección subcutánea que comprende:

- a) proporcionar una solución concentrada de acetato de glatiramer con una concentración (ensayo) que varía desde 25 mg/ml a 45 mg/ml;
- 15 b) disolver el agente de tonicidad en parte de una cantidad de agua para inyección para formar una solución;
- c) añadir la cantidad requerida de solución concentrada de acetato de glatiramer a una solución de la etapa (b);
- d) constituir el volumen final de solución utilizando agua para inyección;
- e) filtrar la solución de la etapa (d) a través de un filtro de calidad esterilizante de 0,2 μ para obtener la solución filtrada;
- 20 f) introducir dicha solución filtrada en viales.

Se divulga también un proceso para preparar una composición farmacéutica en la forma de una inyección subcutánea que comprende:

- a) proporcionar una solución concentrada de acetato de glatiramer con una concentración (ensayo) que varía desde 30 mg/ml a 40 mg/ml;
- b) disolver manitol en parte de la cantidad de agua para inyección;
- c) añadir la cantidad requerida de solución concentrada de acetato de glatiramer a la solución de la etapa n);
- 30 d) constituir el volumen final de solución utilizando agua para inyección;
- e) filtrar la solución de la etapa d) a través de un filtro de calidad esterilizante de 0,2 μ para obtener la solución filtrada;
- 25 f) introducir dicha solución filtrada en viales.

35 Se divulga también un proceso para preparar una composición farmacéutica en la forma de una inyección subcutánea que comprende:

- a) proporcionar acetato de glatiramer;
- b) disolver el agente de tonicidad en parte de una cantidad de agua para inyección para formar una solución;
- c) disolver acetato de glatiramer en la solución de la etapa b);
- 40 d) constituir el volumen final de solución utilizando agua para inyección;
- e) filtrar la solución de la etapa d) a través de un filtro de calidad esterilizante de 0,2 μ para obtener la solución filtrada;
- f) introducir dicha solución filtrada en viales.

45 Se divulga también un proceso para preparar una composición farmacéutica en la forma de una inyección subcutánea que comprende:

- a) proporcionar acetato de glatiramer;
- b) disolver manitol en parte de una cantidad de agua para inyección para formar una solución;
- 50 c) disolver acetato de glatiramer en la solución de la etapa (b);
- d) constituir el volumen final de solución utilizando agua para inyección;
- e) filtrar la solución de la etapa (d) a través de un filtro de calidad esterilizante de 0,2 μ para obtener la solución filtrada;
- 55 f) introducir dicha solución filtrada en viales.

Se usó acetato de glatiramer en la preparación de la composición farmacéutica tanto como un sólido liofilizado o como una solución acuosa que contiene acetato de glatiramer en el intervalo de concentración de aproximadamente 25-45 mg/ml.

60 Acetato de glatiramer se puede usar en el intervalo de aproximadamente 1,0 % a 4,0 % en peso de composición total. Se pueden usar agentes de tonicidad en el intervalo de aproximadamente 0,9 % a 9,75 % en peso de la composición total.

65 En la práctica, el agente de tonicidad que se puede usar incluye, aunque no de forma limitativa, cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sacarosa, lactosa, galactosa, trehalosa, glicina, o una de sus mezclas.

En la práctica, la composición puede esterilizarse usando filtros de membrana que tengan un tamaño de poro de aproximadamente 0,2 micrómetros. Los filtros de membrana adecuados que se pueden usar incluyen fluoruro de polivinilideno (PVDF), polietersulfona (PES) y una membrana de acetato de celulosa.

- 5 Salvo que se indique de otra forma, las siguientes definiciones se muestran para ilustrar y definir el significado y el alcance de los diversos términos utilizados para describir la invención en el presente documento.

La expresión "temperatura ambiente" debe entenderse que significa una temperatura que varía desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente 25 °C a 35 °C.

- 10 El término acetato de glatiramer incluirá Copaxone®, acetato de glatiramer preparado mediante el proceso que se describe en el presente documento o preparado mediante cualquier otro proceso. Los términos "copolímero 1" y "acetato de glatiramer" como se usan en el presente documento son sinónimos.

- 15 La expresión "sustancialmente exento" como se usa en el presente documento significa acetato de glatiramer que contiene menos de aproximadamente 0,2 % de especies de alto peso molecular que tienen un peso molecular igual o mayor de aproximadamente 40 KD, preferentemente menor de aproximadamente 0,2 % de especies de 35 KF, más preferentemente menor de aproximadamente 0,2 % de especies de 35 KD y cantidades no detectables de especies de 40 KD.

- 20 Se pueden seleccionar iniciadores a partir de bases, nucleófilos o sus combinaciones. En particular, El iniciador puede incluir una o más aminas, alcoholes, agua o sus combinaciones.

- 25 Las aminas empleadas pueden ser aminas primarias, secundaria o terciaria. Las aminas adecuadas incluyen, pero no de forma limitativa, dimetilamina, dietilamina, di-n-propilamina, diisopropilamina, di-secbutilamina, N-etilmetilamina, di-n-butilamina, di-isobutilamina, di-terc-butilamina, diamilamina, di-n-octilamina, di-(2-etilhexil)amina, di-isononilamina, dialilamina, N-metilanilina, difenilamina, o una de sus combinaciones, siendo preferible dietilamina. Otros iniciadores que se pueden usar para la polimerización incluyen K-tOBu, NaH, KH, trietilamina, tetrametilpiperidina, dicitclohexilamina, dicitclohexilundecano, diisopropil amina de litio, t-BuLi o sus combinaciones. El iniciador se usa en una cantidad de aproximadamente 0,2 % a 4 %, preferentemente 0,5 a 1,5 %.

- 35 El disolvente adecuado utilizado se selecciona entre el grupo que consiste en agua, alcohol, disolventes apróticos polares, hidrocarburos clorados o hidrocarburos. El disolvente preferido utilizado para la desprotección es agua. Se puede seleccionar un alcohol a partir de un alcohol lineal o ramificado. el disolvente aprótico polar se selecciona entre acetato de metilo, acetato de etilo, dimetilfurano, dimetilformamida, 1,4-dioxano, tetrahidrofurano o sus mezclas. se puede seleccionar un hidrocarburo clorado entre dicloruro de metileno, cloroformo o dicloruro de etileno. Se puede seleccionar un hidrocarburo entre hexano, pentano, ciclohexano y similares.

- 40 Otros ácidos que se pueden usar en vez de la mezcla de HBr-ácido acético se pueden seleccionar entre HCl, H₂SO₄, HNO₃, ácido fosforoso, ácido fosfórico, ácido fluorosulfónico, ácido clorosulfónico, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido bencenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido p-(n-dodecil)bencenosulfónico o sus combinaciones

- 45 Se proporcionan ejemplos para ilustrar los aspectos concretos de la divulgación y no para limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos:

Ejemplo 1(A):

- 50 **Determinación del peso molecular de lotes de acetato de glatiramer**

a) Fraccionamiento de copaxona mediante SEC - HPLC:

- 55
- Se llevó a cabo la SEC-HPLC con una columna Superosa 12 (10/300 GL) utilizando acetato de amonio 0,2 M pH 5,0 como fase móvil, a un caudal de 0,5 ml/min.
 - Se inyectaron 100µl de Copaxona (B. N.º P53289, 20mg/ml) a la columna según el método optimizado, constituyendo la concentración inyectada final como 2 mg.
 - Se inició el pico de la copaxona eluyendo a aproximadamente 17 min y finalizó a aproximadamente 40 min.
- 60
- Se recogieron 22 fracciones individuales en un intervalo de 1 minuto (Fig. 1) iniciando desde el minuto 17º y finalizando en el minuto 39º utilizando un HPLC de Waters y un recolector de fracciones automatizado.
 - Las 22 fracciones recogidas por separado se liofilizaron completamente.

b) Análisis del copolímero fraccionado (Copaxona) mediante SEC-MALLS:

Condiciones cromatográficas:

HPLC	HPLC de Waters
Detectores	UV, RI y MALLS
Software	Empower 2 y Astra
Columna	Superosa 12 (10/300 GL)
Fase móvil	Acetato de amonio 0,2 mM (pH 5,0)
Caudal	0,5 ml/min.
Detección UV	275 nm
Condiciones de RI	Sensibilidad: 32, Temp. : 30 °C
MALLS	Wyatt MiniDawn Treos

- 5
- Se tomaron dos fracciones, cada una en un lateral del vértice del pico y la fracción en el vértice del pico (Total: 5 fracciones, Fig. 2) para SEC - MALLS. se resuspendieron estas en acetato de amonio 0,2 M pH 5,0 constituyéndose la concentración final de cada fracción a 6 mg/ml.
 - Se llevó a cabo el análisis para determinar el Mp, Mw, el Mn y la polidispersidad de cada fracción.

Resultados:

Fracción	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Polidispersidad
Fracción n.º 5	23,77	23,88	23,76	1,01
Fracción n.º 7	17,07	17,16	17,07	1,01
Fracción n.º 11	8,33	8,82	8,62	1,02
Fracción n.º 13	5,59	5,98	5,83	1,03
Fracción n.º 17	3,28	3,48	3,43	1,01

- 10
- Los valores idénticos de Mp, Mw y Mn sugieren que las muestras fraccionadas fueron casi monodispersas. La polidispersidad de las muestras fraccionadas era menos de 1,05.

c) Uso de copolímeros fraccionados caracterizados como marcadores de pesos moleculares para la determinación de Mp, Mw y Mn de glatiramer mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC):

- 15
- Las fracciones 5, 7, 11, 13 y 17 eluyeron a un tiempo de retención de 21,317, 23,100, 26,833, 28,750 y 32,417 minutos respectivamente.
 - se realizó la curva de calibración utilizando el software Empower de Waters. Se utilizó una técnica relativa y su 1^{er} ajuste de orden para representar gráficamente la curva (Fig. 3).
 - R2 para la curva de calibración de las fracciones de copaxona era de 0,996.
 - Usando esta curva patrón, se analizaron dos lotes cada uno de copaxona y acetato de glatiramer obtenidos mediante el proceso descrito en el presente documento (Fig. 4) y los resultados fueron del siguiente modo:
- 20

Resultados con la curva de calibración de las fracciones de

Lote n.º	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)
Ejemplo 7	7,98	8,76	5,91
Ejemplo 8	7,73	8,87	6,1
Comp. n.º 53119	6,98	8,46	5,98
Comp. n.º 53289	7,87	9,55	6,55

Ejemplo 1(B):**Determinación del peso molecular de lotes de acetato de glatiramer**

- 30
- a) Fraccionamiento de acetato de glatiramer obtenido mediante el proceso descrito en el presente

documento:

- Aproximadamente 40 mg de acetato de glatiramer se sometieron a GPC en una columna de Superose 12 (10/300 GL), Sistema: Acta purifier que utiliza acetato de amonio 2 M pH 5,0 como fase móvil, a un caudal de 0,5 ml/min.
- Se inició el pico de glatiramer eluyendo después de aproximadamente 20 min y finalizó después de aproximadamente 40 min.
- Se recogieron 30 fracciones individuales en un intervalo de 0,5 minutos (Fig. 5) iniciando desde el minuto 21º y finalizando aproximadamente en el minuto 41º.
- Se analizaron aproximadamente 15 fracciones para la polidispersidad y el peso molecular.
- Se seleccionaron las fracciones de tal manera que una de estas fracciones representa el peso molecular del vértice del pico y otras fracciones están distribuidas en cualquier lado del peso molecular del vértice del pico.
- Las fracciones que tienen una polidispersidad de menos de 1,2 se seleccionaron y liofilizaron.
- Las fracciones que tienen una polidispersidad de más de 1,2 se sometieron a purificación adicional con el fin de obtener fracciones que tienen una polidispersidad menor de 1,2.
- Se seleccionaron fracciones que tienen un peso molecular de 3kD, 5 kD, 7 kD, 10kD y 12kD para utilizarse como marcadores de pesos moleculares.
- Se determinó el peso molecular de estas fracciones seleccionadas utilizando SEC-MALLS [Mismas condiciones que las mencionadas en el Ejemplo 1(A)], A continuación en la Tabla se muestran Mp y la polidispersidad de estas fracciones seleccionadas.

Fracciones caracterizadas utilizadas como marcadores de pesos moleculares

Fracción	Mp(kD)	Polidispersidad PD=Mw/Mn
Fracción n.º 16	12,56	1,05
Fracción n.º 18	10,05	1,08
Fracción n.º 22	7,38	1,17
Fracción n.º 24	5,06	1,11
Fracción n.º 26	3,2	1,05

- Todas estas fracciones seleccionadas se liofilizaron y caracterizaron.

a) Uso de fracciones caracterizadas como marcadores de pesos moleculares para la determinación de Mp, Mw y Mn de glatiramer mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)/ Cromatografía de permeación en gel (GPC):

- Las fracciones 16, 18, 22, 24 y 26 eluyeron a un tiempo de retención de 24,60, 25,88, 27,41, 28,95 y 31,31 minutos respectivamente.
- se realizó la curva de calibración utilizando el software Empower de Waters. Se utilizó una técnica relativa y su 1^{er} ajuste de orden para representar gráficamente la curva (Fig. 6).
- R2 para la curva de calibración de las fracciones caracterizadas era de 0,99.
- Usando esta curva patrón, se analizaron dos lotes cada uno de copaxona y acetato de glatiramer obtenidos mediante el proceso descrito en el presente documento (Fig. 7) y los resultados fueron del siguiente modo:

Resultados con la curva de calibración de las fracciones de copaxona:

Lote n.º	Mp (kD)
Acetato de glatiramer obtenido mediante el proceso descrito en el presente documento	7275
Acetato de glatiramer obtenido mediante el proceso descrito en el presente documento	7234
P53313	7183
P53289	7571

Ejemplo 2

- 200 g (0,84 moles de L-glutamato de ©-bencilo y 10 g de carbón activado se suspendieron en 2,4 l de tetrahidrofurano (THF). se añadieron 124,6 g (0,42 moles) de trifosgeno a la mezcla obtenida y se agitaron durante 0,5 h a 50-55 °C. Tras la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho hyflo y se purgó con nitrógeno gas a través del filtrado obtenido durante 2 h siguiendo con 35 °C. se concentró el

filtrado al vacío para obtener un aceite. El aceite obtenido se arrastró tres veces con 1 l de hexano para obtener el sólido. el sólido obtenido se agitó con 2 l de hexano, se filtró, se lavó con 2 l de hexano y se secó al vacío siguiendo a 45 °C. El material seco se pasó a través de un tamiz de malla 30 y se volvió a secar de nuevo. El sólido vuelto a secar se almacenó a -20 °C en un recipiente hermético.

5 Rendimiento: 200 g (100 % p/p p.t.a. de aminoácidos), p.f.: 92°-94 °C

Ejemplo 3

10 Se suspendieron 110 g (0,552 moles) de L-tirosina y carbón activado (5,5 g) en 1,32 l de tetrahidrofurano (THF). Se añadieron a este 89,76 g (0,302 moles) de trifosgeno. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 50-55 °C. Tras la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho hyflo. se purgó gas nitrógeno a través del filtrado obtenido durante 2 h siguiendo a 35 °C. A continuación se concentró la mezcla de reacción al vacío para obtener una masa sólida. La masa sólida obtenida se arrastró tres veces con 0,55 l de hexano y se agitó adicionalmente con 1,1 l de hexano, se filtró, se lavó con 1,1 l de hexano y se secó al vacío siguiendo a 45 °C. El material seco se pasó a través de un tamiz de malla 30 y se volvió a secar de nuevo. El sólido vuelto a secar se almacenó a -20 °C en un recipiente hermético.

15 Rendimiento: 80 g (73 % p/p p.t.a. de aminoácidos). El compuesto se descompuso de 250 °C a 270 °C.

Ejemplo 4

20 400 g (1,65 moles) de N^F-trifluoroacetil L-lisina y carbón activo (20 g) se suspendieron en 4,8 l de tetrahidrofurano (THF). Se añadieron a este 243,3 g (0,82 moles) de trifosgeno. La mezcla de reacción se agitó durante 0,5 h a 50-55 °C. Tras completar la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho hyflo. Nitrógeno gaseoso se purgó a través del filtrado obtenido durante 2 h a menos de 35 °C. A continuación, la mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un aceite. El aceite obtenido se depuró con 2 l de hexano tres veces para obtener un sólido. El sólido obtenido se lavó con 4 l de hexano, se filtró, se lavó con 4 l de hexano y se secó al vacío a menos de 45 °C. El material seco se hizo pasar a través de un tamiz malla 30 y se volvió a secar. El sólido vuelto a secar se almacenó a -20 °C en un recipiente hermético.

25 Rendimiento: 415 g (104 % p/p p.t.a. de aminoácidos), p.f.: 83 °C-86 °C

Ejemplo 5

30 200 g (2,24 moles) de L-alanina se suspendieron en 4 l de tetrahidrofurano (THF) y la mezcla se calentó a 50°- 55 °C durante 1,5 h. 10 g de carbón activo y 333 g (1,12 moles) de trifosfeno disueltos en 1 l de THF se añadieron a la suspensión calentada durante un periodo de aproximadamente 10 min a 50-55 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a la misma temperatura, y un segundo lote de 333 g (1,12 moles) de trifosfeno disuelto en 1 l de THF se añadió al mismo durante un periodo de aproximadamente 10 min seguido por agitación de la mezcla durante 1,5 h a 50-55 °C. Tras finalizar la reacción, la mezcla se filtró, y nitrógeno gaseoso se purgó a través del filtrado obtenido durante 2 h a menos de 35 °C. El filtrado se concentró al vacío a menos de 35 °C para obtener un aceite. Se añadieron 1,6 l de acetato de etilo al aceite obtenido, se agitó durante 10 min y se filtró a través de un lecho hyflo. Se añadieron 13 l de hexano al filtrado obtenido para obtener un sólido que se filtró, se lavó con 4 l de hexano y se secó al vacío a menos de 45 °C. El material seco se hizo pasar a través de un tamiz malla 30 y se volvió a secar. El sólido vuelto a secar se almacenó a -20 °C en un recipiente hermético.

35 Rendimiento: 180 g (90 % p/p p.t.a. de aminoácidos), p.f.: 91°-92 °C

Ejemplo 6

40 Una mezcla del L-aminoácidos NCA [50 g de N-carboxianhídrido de L-alanina, 35 g de N-carboxianhídrido de γ -bencil L-glutamato, 83 g de N-carboxianhídrido de N^F-trifluoroacetil L-lisina, 18 g de N-carboxianhídrido de L-tirosina] se disolvió en 3,5 l de dioxano anhidro y se agitó durante 30 min. La solución se filtró, si se observaba cualquier partícula suspendida insoluble. Una solución de dietilamina al 1 % en dioxano anhidro (266 ml) se añadió a la masa de reacción en un lote. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 24 horas a 200-215 rpm. Se añadieron 10 l de agua desionizada a la mezcla de reacción para obtener un sólido de color blanco. El sólido obtenido se filtró al vacío, se lavó con 10 l de agua desionizada y se secó al aire hasta obtener un LOD NMT del 10 %. El sólido obtenido se hizo pasar a través de un tamiz de malla 30. Rendimiento: 120 g (64,5 % p/p).

Ejemplo 7

45 En un reactor se introdujeron 960 ml de HBr al ~15 % en ácido acético a temperatura ambiente, y se agitó a 200-215 rpm durante 30 min hasta alcanzar aproximadamente 25 °C. 115 g de copolímero protegido (del Ejemplo 6) se añadieron al reactor, y se agitó a aproximadamente 25 °C a 200-215 rpm durante 23 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua fría para obtener un sólido de color blanco. Se añadió solución de amoniaco a lo anterior hasta conseguir pH 6-7, y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 h. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó al aire. Rendimiento: 75 g (65,2 % p/p)

65

Ejemplo 8

75 g de copolímero de trifluoroacetilo (del ejemplo 7) se suspendieron en 3,75 l de agua. Se añadieron 435 ml de piperidina a la suspensión en un lote, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ , se hizo pasar a través de una unidad de filtración con flujo tangencial con un casete de corte de peso molecular (MWCO) de 1 KD, se diafiltró con agua desionizada, a continuación con una solución acuosa de ácido acético al 0,3 %, y de nuevo con agua desionizada hasta conseguir pH 5,5-7. La solución obtenida se liofilizó a continuación a sequedad para obtener un sólido esponjoso de color blanco. Rendimiento: 50,5 g (67,3 % p/p), Peso molecular del vértice del pico (Mp) = 7980 D. De forma alternativa, la solución obtenida se puede tomar como tal para formulación.

Ejemplo 9

75 g de copolímero de trifluoroacetilo (del ejemplo 7) se suspendieron en 3,75 l de agua. Se añadieron 300 ml de dietilamina a la suspensión en un lote, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ , se hizo pasar a través de una unidad de filtración con flujo tangencial con un casete de corte de peso molecular (MWCO) de 1 KD, se diafiltró con agua desionizada, a continuación con una solución acuosa de ácido acético al 0,3 %, y de nuevo con agua desionizada hasta conseguir pH 5,5-7. La solución obtenida se liofilizó a continuación a sequedad para obtener un sólido esponjoso de color blanco. Rendimiento: 52,86 g (70,4 % p/p), Peso molecular del vértice del pico (Mp) = 7730 D. De forma alternativa, la solución obtenida se puede tomar como tal para formulación.

Ejemplo 10

En un reactor se introdujeron 960 ml de HBr al ~15 % en ácido acético a temperatura ambiente, y se agitó a 200-215 rpm durante 30 min hasta alcanzar 25 °C. 115 g de Copolímero protegido (Ejemplo 6) se añadieron al reactor, y se agitó a aproximadamente 25 °C a 200-215 rpm durante 23 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua fría para obtener un sólido de color blanco. Se añadió solución de amoníaco a lo anterior hasta conseguir pH 6-7, y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 h. El sólido se centrifugó, se lavó con agua y se volvió a centrifugar para obtener un sólido húmedo. El sólido húmedo se volvió a suspender en 4,6 l de agua. Se añadieron 517 ml de piperidina a la suspensión en un lote, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ , se hizo pasar a través de una unidad de filtración con flujo tangencial con un casete de corte de peso molecular (MWCO) de 1 KD, se diafiltró con agua desionizada, a continuación con una solución acuosa de ácido acético al 0,3 %, y de nuevo con agua desionizada hasta conseguir pH 5,5-7. La solución obtenida se liofilizó a continuación a sequedad para obtener un sólido esponjoso de color blanco. Rendimiento: 54,5 g (47,39 % p/p), Peso molecular del vértice del pico (Mp) = 6960 D. De forma alternativa, la solución obtenida se puede tomar como tal para formulación.

Ejemplo 11

En un reactor se introdujeron 960 ml de HBr al ~15 % en ácido acético a temperatura ambiente, y se agitó a 200-215 rpm durante 30 min hasta alcanzar 25 °C. 115 g de Copolímero protegido (Ejemplo 6) se añadieron al reactor, y se agitó a aproximadamente 25 °C a 200-215 rpm durante 23 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua fría para obtener un sólido de color blanco. Se añadió solución de amoníaco a lo anterior hasta conseguir pH 6-7, y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 h. El sólido se centrifugó, se lavó con agua y se volvió a centrifugar para obtener un sólido húmedo. El sólido húmedo se volvió a suspender en 4,6 l de agua. Se añadieron 287 ml de dietilamina a la suspensión en un lote, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ , se hizo pasar a través de una unidad de filtración con flujo tangencial con un casete de corte de peso molecular (MWCO) de 1 KD, se diafiltró con agua desionizada, a continuación con una solución acuosa de ácido acético al 0,3 %, y de nuevo con agua desionizada hasta conseguir pH 5,5-7. La solución obtenida se liofilizó a continuación a sequedad para obtener un sólido esponjoso de color blanco. Rendimiento: 55,86 g (48,57 % p/p), Peso molecular del vértice del pico (Mp) = 7291 D. De forma alternativa, la solución obtenida se puede tomar como tal para formulación.

Ejemplo 12

En un reactor se introdujeron 480 ml de HBr aproximadamente al 15 % en ácido acético a temperatura ambiente, y se agitó a 200-215 rpm durante 30 min hasta alcanzar 25 °C. 2,4 g de resorcinol se añadieron a lo anterior y se agitó durante 2 h a 25 °C a 200-215 rpm. 60 g de Copolímero protegido (Ejemplo 6) se añadieron al reactor, y se agitó a aproximadamente 25 °C a 200-215 rpm durante 23 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua fría para obtener un sólido de color blanco. Se añadió solución de amoníaco a lo anterior hasta conseguir pH 6-7, y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 h. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó al aire. Rendimiento: 36 g (60 % p/p).

El mismo ejemplo se repitió usando otro secuestrante de bromo como tirosina, bisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, naftaleno, 1-naftol o 2-naftol. 1.

Ejemplo 13

- 36 g de copolímero de trifluoroacetilo (del Ejemplo 12) se suspendieron en 1,8 l de agua. Se añadieron 209 ml de piperidina a la suspensión en un lote, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ , se hizo pasar a través de una unidad de filtración con flujo tangencial con un casete de corte de peso molecular (MWCO) de 1 KD, se diafiltró con agua desionizada, a continuación con una solución acuosa de ácido acético al 0,3 %, y de nuevo con agua desionizada hasta conseguir pH 5,5-7. La solución obtenida se liofilizó a continuación a sequedad para obtener un sólido esponjoso de color blanco.
- Rendimiento: 24,48 g (68 % p/p)
- De manera alternativa, la solución obtenida se puede tomar como tal para formulación.

Ejemplo 14

- 36 g de copolímero de trifluoroacetilo (del Ejemplo 12) se suspendieron en 1,8 l de agua. Se añadieron 144 ml de dietilamina a la suspensión en un lote, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción filtró con filtro de 0,2 μ , se hizo pasar a través de una unidad de filtración con flujo tangencial con un casete de corte de peso molecular (MWCO) de 1 KD, se diafiltró con agua desionizada, a continuación con una solución acuosa de ácido acético al 0,3 %, y de nuevo con agua desionizada hasta conseguir pH 5,5-7. La solución obtenida se liofilizó a continuación a sequedad para obtener un sólido esponjoso de color blanco.
- Rendimiento: 26,8 g (74,4 % p/p)
- De manera alternativa, la solución obtenida se puede tomar como tal para formulación.

Ejemplo 15

- En un reactor se introdujeron 460 ml de HBr al ~15 % en ácido acético y 460 ml de ácido acético a temperatura ambiente, y se agitó a 200-215 rpm durante 30 min hasta alcanzar 25 °C. 4,6 g de fenol se añadieron a lo anterior y se agitó durante 2 h a aproximadamente 25 °C a 200-215 rpm. 115 g de Copolímero protegido (Ejemplo 6) se añadieron al reactor, y se agitó a aproximadamente 25 °C a 200-215 rpm durante 21-23 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua fría para obtener un sólido de color blanco. Se añadió solución de amoníaco a lo anterior hasta conseguir pH 6-7, y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 h. El sólido se centrifugó, se lavó con agua y se volvió a centrifugar durante aproximadamente 3 h para obtener un sólido húmedo.
- El sólido húmedo se volvió a suspender en 4,6 l de agua. Se añadieron 287 ml de dietilamina a la suspensión en un lote, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ , se hizo pasar a través de una unidad de filtración con flujo tangencial con un casete de corte de peso molecular (MWCO) de 1 KD, se diafiltró con agua desionizada, a continuación con una solución acuosa de ácido acético al 0,3 %, y de nuevo con agua desionizada hasta conseguir pH 5,5-7. La solución concentrada obtenida se filtró a esterilidad, y se almacenó a de 2 °C a 8 °C en un frasco de PET G estéril, que se cubrió con una bolsa de polietileno de color negro.
- Rendimiento: 1670 l (36,1 mg/ml), Peso molecular del vértice del pico (Mp) = 6974 D.
- La solución concentrada obtenida que tiene una concentración (ensayo) de acetato de glatiramer de aproximadamente 30 - 40 mg/ml se puede tomar como tal para formulación.

Ejemplo 16

- En un reactor se introdujeron 460 ml de HBr al ~33 % en ácido acético y 460 ml de ácido acético a temperatura ambiente, y se agitó a 200-215 rpm durante 30 min hasta alcanzar aproximadamente 25 °C. 4,6 g de fenol se añadieron a lo anterior y se agitó durante 2 h a 25 °C a 200-215 rpm. 115 g de Copolímero protegido (Ejemplo 6) se añadieron al reactor, y se agitó a 25 °C a 200-215 rpm durante 21 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua fría para obtener un sólido de color blanco. Se añadió solución de amoníaco a lo anterior hasta conseguir pH 6-7, y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 h. El sólido se centrifugó, se lavó con agua y se volvió a centrifugar durante aproximadamente 3 h. El sólido húmedo se volvió a suspender en 4,6 l de agua. Se añadieron 287 ml de dietilamina a la suspensión en un lote, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ , se hizo pasar a través de una unidad de filtración con flujo tangencial con un casete de corte de peso molecular (MWCO) de 1 KD, se diafiltró con agua desionizada, a continuación con una solución acuosa de ácido acético al 0,3 %, y de nuevo con agua desionizada hasta conseguir pH 5,5-7. La solución concentrada obtenida se filtró a esterilidad, y se almacenó a de 2 °C a 8 °C en un frasco de PET G estéril, que se cubrió con una bolsa de polietileno de color negro.
- Rendimiento: 1670 l (35 mg/ml), Peso molecular del vértice del pico (Mp) = 7324 D.
- La solución concentrada obtenida que tiene una concentración (ensayo) de acetato de glatiramer de aproximadamente 30-40 mg/ml se puede tomar como tal para formulación.

Ejemplo 17

- Análisis de aminoácidos mediante LIPLC:

Condiciones cromatográficas:

Columna: AccQTag Ultra Column 2,1x100 mm, 1,7 µm
 Fase móvil A: Eluyente A1 (Fase móvil AccQTag al 5 % diluida con agua)
 Fase móvil B: Eluyente B (como tal)
 Longitud de onda: 260 nm
 Frecuencia de muestreo: 10 puntos/s
 Temp. colum.: 55 °C
 Temp. mues.: 20 °C
 Caudal: 0,7 ml/min
 Programación: Programa del gradiente
 Derivatización: Derivatización mediante AccQ. Agente de derivatización Tag

Los resultados del ensayo de las fracciones molares de los aminoácidos se resumen en la Tabla 12:

Aminoácidos	Fracción molar est.	Intervalo de fracción molar est.	COPAXONE B. N.º: 538518	Ejemplo 7	Ejemplo 8
L-Tirosina	0,095	0,085-0,104	0,099	0,090	0,100
Ácido L-glutámico	0,141	0,127-0,155	0,132	0,140	0,140
L-Lisina	0,338	0,304-0,372	0,347	0,350	0,330
L-Alanina	0,427	0,384-0,470	0,422	0,420	0,430

Ejemplo 18**Mapeo de péptidos usando la enzima tripsina**

0,25 mg de acetato de glatiramer se digirieron con 5 µg de tripsina (tratada con tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) en tampón Tris pH 7,5 0,05 M a una temperatura de aproximadamente 37 °C. Este tratamiento se continuó durante aproximadamente 4 horas para obtener fragmentos peptídicos de cadena corta. Estos fragmentos se separaron y se analizaron usando HPLC-UV en una columna HPLC C18 de 250 x 4,6 mm para obtener un cromatograma. El cromatograma así obtenido se comparó con el cromatograma obtenido sometiendo Copaxone al mismo tratamiento que se ha mencionado anteriormente.

Ejemplo 19**Mapeo de péptidos usando la enzima tripsina y carboxipeptidasa B**

3,5 mg de acetato de glatiramer se digirieron con 7 µg de tripsina (tratada con tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) en tampón Tris pH 7,5 0,05 M a una temperatura de aproximadamente 37 °C. Este tratamiento se continuó durante aproximadamente 4 horas para obtener fragmentos peptídicos de cadena corta. Esta mezcla de fragmentos peptídicos obtenidos después del tratamiento con tripsina se sometió a un tratamiento con 20 µg de carboxipeptidasa B a 37 °C durante aproximadamente 18 horas, lo que dio como resultado una fragmentación adicional de la cadena peptídica. Estos fragmentos se separaron y se analizaron usando HPLC-UV en una columna HPLC C18 de 250 x 4,6 mm para obtener un cromatograma. El cromatograma así obtenido se comparó con el cromatograma obtenido sometiendo Copaxone al mismo tratamiento que se ha mencionado anteriormente.

Ejemplo: 20

(A) Composición:

Ingrediente	Cantidad (mg/1 ml)
Acetato de glatiramer	20,00
Manitol	40,00
Agua de inyección	c.s. 1,0 ml

(B) Preparación:

Se disolvió manitol parcialmente en agua para inyección con agitación. La solución concentrada de acetato de

glatiramer API se añadió a esta solución de manitol y se mezcló. El volumen final se completó con la cantidad restante de agua para inyección. El pH de la solución se comprobó (límite de pH: 5,5 a 7,0). La solución final se filtró con un filtro de 0,2 µ de poliétersulfona de calidad para esterilización. La solución filtrada se introdujo en viales y los viales se precintaron.

5

Ejemplo 21:

Técnica estadística para evaluar la coherencia y reproducibilidad del proceso de preparación de los marcadores de pesos moleculares.

10

Se generaron cinco conjuntos de marcadores de pesos moleculares usando diferentes lotes de acetato de glatiramer. Cada conjunto contenía siete marcadores de peso moleculares que tenían diferentes pesos moleculares en el intervalo de 2000 a 13000 daltons, como se muestra en la Tabla siguiente,

Conjunt n.º 1	Conjunt n.º 2	Conjunt n.º 3	Conjunt n.º 4	Conjunto 5
12628	12208	12215	12373	12580
9892	9241	9915	10128	8939
7019	7991	6706	7870	6556
6185	6335	6073	6267	5890
5163	5704	5532	5631	4969
4888	4612	4755	4000	4069

15

El proceso estadístico de aleatorización se aplicó a estos cinco conjuntos de marcadores de pesos moleculares para generar un conjunto mayor de marcadores de pesos moleculares, conteniendo cada conjunto siete marcadores de peso moleculares como en la Tabla siguiente,

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12215	12628	12373	12628	12215	12215	12215	12373	12373	12628
8939	10128	9241	8939	10128	9892	9892	9915	9915	9915
7991	6556	7991	7991	6556	7991	6706	6706	6706	6556
6267	6073	6335	6073	6267	6073	5890	5890	6267	6185
4969	5163	5704	5532	5704	4969	5532	5704	4969	4969
4755	4069	4069	4069	4000	4755	4612	4755	4755	4755
2989	3775	2989	2709	2989	2989	3671	3775	3671	3292

20

Estos conjuntos más grandes de marcadores se usaron a continuación para determinar el peso molecular del vértice del pico del lote del acetato de glatiramer y los resultados fueron como se muestran en la tabla siguiente,

Lote n.º	Mín.	Máx.	Dif	Media	SD	RSD	Intervalo de confianza (nivel del 95 %)
Lote 1	6811	7108	297	6916	95,00	1,37	6971
Lote 2	6739	7036	297	6842	95,61	1,40	6897
Lote 3	6763	7060	297	6867	95,37	1,39	6922

25

Este estudio de aleatorización reveló que cualquier permutación-combinación de marcadores de pesos moleculares tomados de diferentes conjuntos proporcionará resultados predecibles basándose en un intervalo de confianza del 95 %. Esto indica que el proceso descrito en el presente documento para la preparación de marcadores de pesos moleculares es coherente, reproducible y no se ve afectado por la variación entre lotes del material de partida. Los marcadores de pesos moleculares generados usando el proceso descrito en el presente documento a partir de diferentes lotes de acetato de glatiramer proporcionaron resultados predecibles basándose en un intervalo de confianza del 95 %.

30

REIVINDICACIONES

1. Uso de fracciones de polipéptidos, como marcadores de pesos moleculares para acetato de glatiramer, en el que las fracciones de polipéptidos tienen una secuencia de aminoácidos aleatoria similar a la de acetato de glatiramer y se obtienen mediante un proceso que comprende las etapas de,
- 5
- a) someter una mezcla de polipéptidos, que es una mezcla de polipéptidos que contiene alanina, ácido glutámico, tirosina y lisina en la misma relación molar que está presente en acetato de glatiramer, a cromatografía de permeación en gel (GPC)/Cromatografía de exclusión molecular (SEC) para obtener fracciones de polipéptidos que tienen pesos moleculares en el intervalo de 2 kD a 30 kD;
- 10
- b) seleccionar fracciones de polipéptidos a usar como marcadores de pesos moleculares a partir de dichas fracciones de polipéptidos obtenidas en la etapa a) de tal manera que una de las fracciones representa el peso molecular del vértice del pico y otras fracciones están distribuidas a ambos lados del peso molecular del vértice del pico; y
- 15
- c) determinar el factor de cola de estas fracciones de polipéptidos seleccionados.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho factor de cola de las fracciones de polipéptidos seleccionados está en el intervalo de 0,8 a 1.
- 20
3. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la polidispersidad de dichas fracciones de polipéptidos seleccionadas es menor que o igual a 1,20.
4. El uso según la reivindicación 3, en el que dicha mezcla de polipéptidos es acetato de glatiramer.
- 25
5. El uso según la reivindicación 1, en el que dicha GPC/SEC se lleva a cabo en una columna Superosa-12 o Superdex-75 utilizando la fase móvil seleccionada entre acetato de amonio o formiato de amonio en un intervalo de concentración de 0,1 a 0,3 M.
- 30
6. El uso según la reivindicación 5, en el que la columna es Superosa 12 (10 x 300 GL); la carga de la columna no supera 50 mg y el caudal se ajusta en el intervalo de 0,4 a 0,6 ml/min.
7. El uso según la reivindicación 1, en el que dichas fracciones de polipéptidos obtenidas en la etapa a) se liofilizan o en el que el Mp de dichas fracciones seleccionadas se determina utilizando SEC-MALLS.
- 35
8. El uso según la reivindicación 1, en el que dichas fracciones de polipéptidos seleccionados se utilizan como marcadores de pesos moleculares para determinar el peso molecular de un lote de acetato de glatiramer mediante un proceso que comprende las etapas de,
- 40
- a) calibrar la columna SEC/GPC utilizando las fracciones de polipéptidos seleccionadas;
- b) establecer una relación entre el tiempo de retención y el log del peso molecular de estas fracciones seleccionadas por medio de una curva de calibración;
- c) someter el lote de acetato de glatiramer cuyo peso molecular se va a determinar a SEC/GPC para obtener el tiempo de retención; y
- 45
- d) utilizar la relación entre el tiempo de retención y el log del peso molecular para determinar el peso molecular del lote de acetato de glatiramer.
9. El uso según la reivindicación 8, en el que se determina el peso molecular del vértice del pico del lote de acetato de glatiramer.
- 50
10. El uso según la reivindicación 8, en el que dicha columna de SEC/GPC se selecciona entre Superosa-12 o Superdex-75; y la fase móvil se selecciona entre 0,1 y 0,3 M de acetato de amonio o formiato de amonio.
11. El uso según la reivindicación 1, en el que la consistencia y la reproducibilidad de dicho proceso se ensaya mediante un método que comprende las etapas de
- 55
- a) obtener múltiples conjuntos de marcadores de pesos moleculares, mediante el proceso definido en la reivindicación 1, a partir de diferentes lotes de acetato de glatiramer, conteniendo cada conjunto marcadores de pesos moleculares que tienen un peso molecular en el intervalo de 2000 a 13000 daltons;
- b) asignando marcadores de pesos moleculares de cada conjunto obtenido en la etapa a) utilizando un proceso estadístico de aleatorización para generar además un conjunto más grande de marcadores de pesos moleculares;
- 60
- y
- c) utilizar estos conjuntos más grandes obtenidos en la etapa b) como marcadores de pesos moleculares para determinar mediante GPC el peso molecular de un lote de acetato de glatiramer.
- 65
12. El uso según la reivindicación 11, en el que dichos marcadores de pesos moleculares proporcionan resultados predecibles basados en un intervalo de confianza del 95 % que demuestra la consistencia y la reproducibilidad del

proceso para la preparación de marcadores de pesos moleculares.

13. El uso según la reivindicación 4, en el que dicho acetato de glatiramer se prepara mediante un proceso que comprende las etapas de,

- 5
- a) tratar el copolímero protegido con HBr de aproximadamente el 7 % al 20 % en ácido acético a aproximadamente 25 °C durante aproximadamente 21-23 horas para obtener el copolímero de trifluoroacetilo;
 - b) tratar dicho copolímero de trifluoroacetilo con una base para obtener el copolímero completamente desprotegido; y
 - 10 c) convertir el copolímero completamente desprotegido en acetato de glatiramer.

14. El uso según la reivindicación 13, en el que dicho tratamiento en la etapa a) se lleva a cabo a 25 °C \pm 0,2 °C; dicho HBr en ácido acético está opcionalmente pretratado con un secuestrante seleccionado entre fenol, resorcinol, tirosina, bisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, naftaleno, 1-naftol o 2-naftol; y dicha base se selecciona entre dietilamina, dimetilamina o diisopropilamina.

15. El uso según la reivindicación 13, en el que dicha base es dietilamina.

16. El uso según la reivindicación 13, en el que dicha conversión del copolímero completamente desprotegido en acetato de glatiramer comprende las etapas de,

- 20
- a) concentrar una solución acuosa de copolímero completamente desprotegido hasta un volumen mínimo utilizando filtración en flujo tangencial (TFF) haciéndolo pasar a través de un casete de membrana de poliéter sulfona que tiene un corte de pesos moleculares (MWCO) de 1 KD;
 - 25 b) lavar la solución concentrada de la etapa a) con agua hasta conseguir un pH de 8 a 9 seguido de lavado con una solución de ácido acético al 0,3 % para el intercambio de sales para obtener acetato de glatiramer; y
 - c) lavar el acetato de glatiramer obtenido en la etapa b) con agua hasta conseguir un pH de 5,5 a 7 para obtener acetato de glatiramer puro.

17. El uso según la reivindicación 16, en el que el peso molecular de dicho acetato de glatiramer se determina mediante el proceso de la reivindicación 8 o en donde dicho acetato de glatiramer tiene un contenido de tirosina bromada de no más de aproximadamente el 0,15 %, cuando se ensayó mediante HPLC en fase inversa y un contenido de dietilamina de no más de aproximadamente 5000 ppm, cuando se ensayó mediante el método de cromatografía de iones.

18. El uso según la reivindicación 16, en el que dicho acetato de glatiramer tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 5000-9000 Daltons.

19. El uso según la reivindicación 13, en el que el acetato de glatiramer se caracteriza adicionalmente por el mapeo de péptidos utilizando tripsina y carboxipeptidasa B que comprende las etapas de,

- 35
- a) tratamiento enzimático del acetato de glatiramer utilizando tripsina para obtener fragmentos de péptidos de longitudes de cadenas cortas;
 - 45 b) tratar los fragmentos de péptidos obtenidos en la etapa a) con carboxipeptidasa B dando como resultado una fragmentación adicional de la cadena peptídica;
 - c) separar y analizar los fragmentos de péptido obtenidos en la etapa b) utilizando la técnica de HPLC para obtener el cromatograma; y
 - d) comparar el cromatograma obtenido de esta manera con el cromatograma de referencia normalizado para determinar la similitud estructural.

20. El uso según la reivindicación 19, en el que dicho patrón de referencia es acetato de glatiramer comercial.

