

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 500**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 1/20** (2006.01)

**B01D 15/32** (2006.01)

**G01N 30/74** (2006.01)

**G01N 30/88** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2015** **E 15195917 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018** **EP 3170836**

54 Título: **Análisis mediante RP-HPLC de mezclas de polipéptidos complejos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.04.2019**

73 Titular/es:

**CHEMI SPA (100.0%)**  
**Via Dei Lavoratori, 54**  
**20092 Cinisello Balsamo (MI), IT**

72 Inventor/es:

**LATTANZIO, MARIA;**  
**GAIASSI, AURELIANO y**  
**STEVENAZZI, ANDREA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 707 500 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**

Análisis mediante RP-HPLC de mezclas de polipéptidos complejos

**Campo de la invención**

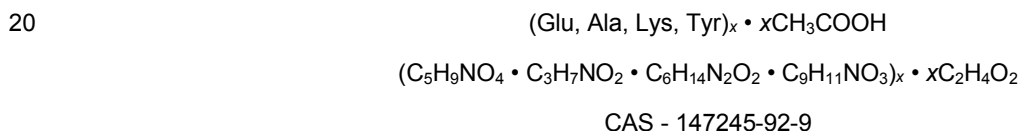
5 La presente invención se refiere a métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) útiles para la caracterización de acetato de glatirámero o mezclas de polipéptidos similares. El método descrito en el presente documento puede distinguir acetato de glatirámero de copolímeros no conformes y puede usarse para elegir lotes de acetato de glatirámero adecuados para uso farmacéutico.

**Antecedentes de la invención**

10 Los glatiramoides son una familia de copolímeros sintéticos que contienen cuatro aminoácidos: ácido L-glutámico, L-alanina, L-lisina y L-tirosina, en una razón molar definida (Varkony *et al.* 2009). El acetato de glatirámero (GA) es un miembro de la familia de los glatiramoides, y es el principio activo farmacéutico del medicamento disponible comercialmente Copaxone® (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Israel), indicado para el tratamiento de pacientes con formas recidivantes de esclerosis múltiple.

15 Según el etiquetado del producto, GA consiste en las sales de acetato de polipéptidos sintéticos, que contienen cuatro aminoácidos que se producen de manera 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. El peso molecular promedio de GA oscila entre 5.000 y 9.000 daltons.

Químicamente, GA se designa como un polímero de ácido L-glutámico con acetato (sal) de L-alanina, L-lisina y L-tirosina. Su fórmula estructural es:



(NDA 020622/S-089 Texto de etiquetado aprobado por la FDA con fecha del 28 de enero de 2014)

25 GA se sintetiza por medio de polimerización de aminoácidos seguida por una etapa de escisión o de despolimerización parcial posterior. Debido a la naturaleza estocástica de las reacciones de polimerización y escisión, los polipéptidos obtenidos mediante este procedimiento varían en cuanto a secuencia, longitud y peso molecular (MW), dando como resultado una distribución de peso molecular (MWD) característica que abarca desde aproximadamente 2.500 hasta 20.000 daltons.

30 Se describen diversos métodos analíticos útiles para caracterizar acetato de glatirámero o mezclas de polipéptidos similares en la bibliografía de patentes y algunos documentos normativos (incluyendo “campañas ciudadanas”). Estos métodos incluyen análisis de aminoácidos, cromatografía de exclusión molecular, difracción circular, cromatografía de líquidos de fase inversa, electroforesis capilar, mapeo de péptidos, secuenciación de Edman, análisis de firmas C y N-terminales (por ejemplo, dietilamida C-terminal y piroglutamato N-terminal).

35 El documento WO 03/029276 da a conocer someter a RP-HPLC una mezcla de copolímeros al azar de ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina usando un gradiente de acetonitrilo.

La presente invención se basa en un método cromatográfico nuevo y original, que puede distinguir acetato de glatirámero de polímeros no conformes y puede usarse, conjuntamente con otros atributos cualitativos, para escoger lotes de acetato de glatirámero adecuados para uso farmacéutico.

**Breve descripción de las figuras**

40 Figura 1. Análisis mediante RP-HPLC de acetato de glatirámero (gradiente lineal; disolvente A: agua con TFA al 0,10%; disolvente B: acetonitrilo con TFA al 0,08%; gradiente: B al 10% durante 5 minutos, entonces B del 10 al 40% en 35 minutos).

Figura 2. Análisis mediante RP-HPLC de acetato de glatirámero (gradiente escalonado, véase el ejemplo 3).

45 Figura 3. Composición de aminoácidos (expresada como fracciones molares de L-alanina y L-lisina) de las cuatro fracciones centrales (véase el ejemplo 4).

**Definiciones**

A menos que se defina de otro modo, todos los términos de la técnica, las notaciones y otra terminología científica usadas en el presente documento se pretende que tengan los significados entendidos habitualmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta divulgación. En algunos casos, los términos con los significados

entendidos habitualmente se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para referencia rápida; por tanto, la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse que represente una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende generalmente en la técnica.

5 Los términos “aproximadamente” y “alrededor de” se refieren en el presente documento al intervalo del error experimental, que puede producirse en una medición.

Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan “incluyendo, pero sin limitarse a”) y debe considerarse que proporcionan respaldo también a términos como “consiste esencialmente en”, “que consiste esencialmente en”, “consiste en” o “que consiste en”.

10 Los términos “consiste esencialmente en”, “que consiste esencialmente en” deben interpretarse como términos semicerrados, lo que significa que no está incluido ningún otro componente y/o etapa que afecte materialmente a las características básicas y novedosas de la invención (por tanto, pueden estar incluidos excipientes opcionales).

Los términos “consiste en”, “que consiste en” deben interpretarse como términos cerrados.

15 Los términos “ semejanza” o “criterios de semejanza” se refieren en el presente documento a aquellos atributos físicos, químicos y/o biológicos de sustancia(s) farmacológica(s) que, según una agencia normativa (por ejemplo, la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU.), deben compararse para probar que un producto farmacológico genérico contiene el/los mismo(s) principio(s) activo(s) que el producto innovador. Tomando Copaxone como ejemplo, la FDA concluyó que un solicitante de una inyección de acetato de glatirámico genérico puede demostrar la semejanza del principio activo en cuanto a los cuatro criterios siguientes: (1) esquema de  
20 reacción fundamental; (2) propiedades fisicoquímicas incluyendo la composición; (3) firmas estructurales para polimerización y despolimerización; y (4) resultados en un ensayo biológico.

El término “polímero no conforme” se refiere en el presente documento a un copolímero, o mezcla de polipéptidos, que no cumple con los “criterios de semejanza” en comparación con el producto innovador.

25 El término “glatiramoides” se refiere en el presente documento a una mezcla heterogénea de polipéptidos que contiene cuatro residuos de aminoácidos que se producen de manera natural (ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina, L-lisina) en una razón molar especificada, es decir, en la que el intervalo de fracción molar del ácido L-glutámico es de 0,129-0,153, el de L-alanina es de 0,392-0,462, el de L-tirosina es de 0,086-0,100 y el de L-lisina es de 0,300-0,374.

30 El término “mezcla de polipéptidos” en el presente documento también incluye las posibles sales farmacéuticamente aceptables, particularmente el acetato.

El término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere en el presente documento a aquellas sales que presentan la eficacia biológica y las propiedades del compuesto salificado y que no producen reacciones adversas cuando se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser sales inorgánicas u orgánicas; los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se  
35 limitan a: carbonato, clorhidrato, bromhidrato, sulfato, hidrogenosulfato, citrato, maleato, fumarato, acetato, trifluoroacetato, 2-naftalenosulfonato y para-toluenosulfonato. Puede hallarse información adicional sobre sales farmacéuticamente aceptables en Handbook of pharmaceutical salts, P. Stahl, C. Wermuth, WILEY-VCH, 127-133, 2008.

### Descripción de la invención

40 La presente invención describe un método analítico útil para caracterizar glatiramoides y valorar la identidad de acetato de glatirámico. El método descrito en el presente documento puede distinguir acetato de glatirámico de polímeros no conformes y puede usarse para elegir lotes de acetato de glatirámico adecuados para uso farmacéutico.

45 En el método de la invención, pueden prepararse glatiramoides y acetato de glatirámico siguiendo los procedimientos de fabricación ya descritos (Teitelbaum *et al.* 1971, patente estadounidense n.º 3.849.550, patente estadounidense n.º 5.800.808), lo que incluye las siguientes etapas:

Etapa (1): polimerización de los precursores de aminoácido protegidos (N-carboxianhídridos) para obtener un copolímero protegido;

50 Etapa (2): desprotección de glutamato de gamma-bencilo, usando ácido bromhídrico en ácido acético, y despolimerización parcial;

Etapa (3): desprotección de N-trifluoroacetil-lisina en piperidina acuosa.

El copolímero soluble en agua resultante puede purificarse entonces a través de múltiples etapas de diafiltración o de ultrafiltración y liofilizarse para obtener un lote de acetato de glatirámico o glatiramoides sólido.

Debido a la naturaleza estocástica de las reacciones de polimerización y escisión, GA es una mezcla compleja de polipéptidos que varían en cuanto a la longitud de cadena (peso molecular), secuencia y composición química.

5 Mientras que los homopolímeros (es decir, polímeros que contienen sólo un tipo individual de unidad de repetición) se caracterizan por su distribución de masa molar sola, y un único método cromatográfico puede ser suficiente para analizar sus atributos fisicoquímicos relevantes, los copolímeros (tales como el acetato de glicirámico) son más complejos y deben caracterizarse mediante técnicas de separación ortogonales, tales como cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de fase inversa. Los métodos ortogonales pueden detectar diferencias en la estructura o composición no observadas examinando la distribución de masa molar y la composición de elementos estructurales solas.

10 Cromatografía se define como un procedimiento mediante el cual se separan solutos mediante un proceso de distribución dinámica diferencial en un sistema que consiste en dos fases, una de las cuales es la fase móvil y la otra la fase estacionaria.

15 La cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) es un enfoque de alta resolución y versátil para el análisis de péptidos y mezclas de péptidos. Los ejemplos en la bibliografía publicada y en monografías de compendios incluyen pruebas de identificación cromatográfica, pruebas de impurezas y separación cromatográfica de mezclas de péptidos complejos, tales como digestos tripticos (mapeo de péptidos) (Vergote *et al.* 2009, Eggen *et al.* 2014).

20 En RP-HPLC, la fase estacionaria consiste normalmente en una fase orgánica apolar unida químicamente a gel de sílice, tal como un gel de sílice unido a C4 (en la que los grupos silanol de superficie se derivatizan con residuos de butilo), u otros materiales de soporte. La fase móvil es normalmente polar (acuosa) y su fuerza puede variarse a lo largo del tiempo cambiando su composición (habitualmente la razón entre un disolvente más polar y un disolvente menos polar, tales como agua y acetonitrilo, respectivamente).

25 Las interacciones de adsorción entre macromoléculas (tales como polipéptidos) y la fase estacionaria se basan en un mecanismo de unión múltiple. Una cadena polimérica sólo migra si todas sus unidades constituyentes están en la fase móvil. Por tanto, la macromolécula quedará retenida en la fase estacionaria siempre que se adsorba una de sus unidades de repetición. Suponiendo un equilibrio de adsorción-desorción independiente para cada unidad, para eluyentes débiles y cadenas poliméricas largas habrá siempre una unidad de repetición que interaccione con el material de relleno. Por consiguiente, la macromolécula quedará retenida hasta que la fuerza de la fase móvil (que está determinada por su composición) llegue a ser suficiente para provocar la desorción de todas sus unidades hidrófobas (H. Pasch, B. Trathnigg, HPLC of Polymers, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1999, párrafo 5.1).

30 El carácter hidrófobo de un péptido está determinado principalmente por el número y la naturaleza de los residuos apolares que contiene y, en parte, por su secuencia primaria y estructura de orden superior. Por tanto, se supone que la RP-HPLC separará los polipéptidos de GA por su tamaño (es decir, masa molar) y fracción molar de residuos hidrófobos (por ejemplo, alanina). Esta suposición se confirmó experimentalmente (véase el ejemplo 4).

35 En RP-HPLC, se prefiere habitualmente la elución en gradiente (variación continua de la razón de agua con respecto a acetonitrilo) con respecto a la elución isocrática debido a su mayor eficacia y tiempos de funcionamiento más cortos. No obstante, en el caso de GA la elución en gradiente proporciona un pico ancho, no resuelto que es de escasa utilidad para estudios de comparación (véase la figura 1). Por este motivo, se ha desarrollado un método de gradiente escalonado (una serie limitada de escalones isocráticos caracterizados por diferentes razones de agua con respecto a acetonitrilo), que permitió la separación de una gama de fracciones con hidrofobicidad creciente (véanse el ejemplo 3 y la figura 2).

40 En el caso de GA, un método de gradiente escalonado ha mostrado sorprendentemente tener algunas ventajas importantes con respecto a un método de gradiente lineal:

45 -- Pueden integrarse fácilmente los cromatogramas con el fin de estimar la abundancia relativa de especies (o fracciones) con diferente composición. En una realización de la invención (véase el ejemplo 3), puede evaluarse cuantitativamente el perfil cromatográfico de muestras de GA a través del análisis de las áreas de pico de siete fracciones centrales.

-- El método analítico es fácilmente ampliable a escala para dar un método de HPLC preparativa, que permite aislar y analizar fracciones con diferente composición (véase el ejemplo 4).

50 Por tanto, el contenido de la presente invención está representado por un método para analizar una mezcla de polipéptidos, comprendiendo cada uno de dichos polipéptidos ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, método que comprende someter dicha mezcla de polipéptidos a RP-HPLC en una columna cromatográfica. Según el método de la presente invención, la fase móvil contenida en la columna comprende una mezcla de al menos dos disoluciones, que tienen diferente polaridad, concretamente una disolución más polar y una disolución menos polar; en particular, según el método de la presente invención, el porcentaje en volumen de la disolución menos polar aumenta a lo largo del tiempo de manera escalonada (y, por consiguiente, el porcentaje en volumen de la disolución más polar disminuye a lo largo del tiempo de manera escalonada).

Según el método de la presente invención, la disolución más polar consiste en agua. Según el método de la presente invención, la disolución menos polar consiste en acetonitrilo.

5 Según una realización de la invención, el porcentaje en volumen de la disolución menos polar aumenta en del 2 al 4% cada de 4 a 6 minutos; según una realización preferida, el porcentaje en volumen de la disolución menos polar aumenta en el 3% cada de 4,5 a 5,5 minutos.

La fase estacionaria de la columna cromatográfica, que puede usarse en el método de la presente invención, puede ser un gel de sílice unido a alquilo, preferiblemente un gel de sílice unido a C4; una columna cromatográfica de ese tipo puede estar equipada con un detector UV.

10 El método de la presente invención puede incluir determinar la distribución de la composición química y/o el carácter hidrófobo de la mezcla de polipéptidos, que se somete a análisis mediante RP-HPLC.

15 Según una realización de la invención, la mezcla de polipéptidos que se somete a análisis mediante RP-HPLC es un glatiramoide o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente acetato de glatirámero. En la mezcla de polipéptidos que se usa en el método de la presente invención, el intervalo de fracción molar de ácido L-glutámico es de 0,129-0,153, el de L-alanina es de 0,392-0,462, el de L-tirosina es de 0,086-0,100 y el de L-lisina es de 0,300-0,374; preferiblemente la fracción molar promedio de ácido L-glutámico es de aproximadamente 0,141, la de L-alanina es de aproximadamente 0,427, la de L-tirosina es de aproximadamente 0,095 y la de L-lisina es de aproximadamente 0,338.

Los siguientes ejemplos tienen propósito de ilustrar adicionalmente la invención sin limitarla, sin embargo.

### Ejemplo 1

20 Se preparó GA mediante el método descrito anteriormente (Teitelbaum *et al.* 1971, patente estadounidense n.º 3.849.550, patente estadounidense n.º 5.800.808), lo que incluye las siguientes etapas:

#### Polimerización de los monómeros de aminoácidos protegidos

25 Se disuelven los N-carboxianhídridos (NCA) de glutamato de  $\gamma$ -bencilo (35 g), alanina (50 g), tirosina (18 g) y trifluoroacetil-lisina (83 g) en 3,5 litros de dioxano anhidro. Se inicia el procedimiento de polimerización mediante la adición de una cantidad apropiada de dietilamina. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas y entonces se vierte en 10 litros de agua purificada. Se filtra el producto, se lava con agua y se seca para obtener un lote de copolímero protegido.

#### Desprotección de glutamato de gamma-bencilo y despolimerización parcial

30 Se trata la mezcla de copolímero protegido con una disolución de ácido bromhídrico (al 33%) en ácido acético, que elimina el grupo protector bencilo de la cadena lateral del residuo de glutamato y escinde el polímero en cadenas más pequeñas. El tiempo necesario para obtener una mezcla de peso molecular promedio apropiado depende de la temperatura de reacción y del tamaño del polímero protegido. Por tanto, se efectúa una reacción de prueba a pequeña escala con cada nuevo lote: a diferentes periodos de tiempo (por ejemplo, cada hora) se determina el peso molecular promedio mediante análisis de SEC, después de la eliminación del grupo TFA restante; se traza una curva de peso molecular frente al tiempo de reacción, y se calcula el tiempo necesario para obtener el valor objetivo y se aplica a la reacción a gran escala. El producto obtenido mediante la reacción a gran escala se vierte finalmente en agua en exceso, se filtra, se lava y se seca, proporcionando el copolímero protegido con TFA.

#### Desprotección de N-trifluoroacetil-lisina en piperidina acuosa

40 Se suspende el copolímero protegido con TFA en una disolución acuosa de piperidina (1 mol/l) a una concentración de aproximadamente 18 g/l. Se agita la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente y se filtra. Se somete a ultrafiltración la disolución de copolímero frente a agua hasta que se alcanza un pH = 8. Entonces se añade ácido acético a la disolución para tener un pH en el intervalo de 4,0-4,5, y se somete a ultrafiltración el copolímero frente a agua hasta que su pH está en el intervalo de 5,5-6,0. Se concentra esta disolución y se liofiliza luego para obtener un lote de acetato de glatirámero sólido.

### 45 Ejemplo 2

Se prepararon muestras que se desvían alterando deliberadamente las "condiciones estándar" empleadas para la elaboración de GA. En particular:

-- Se obtuvo la muestra que se desvía A (copolímero bajo de peso molecular) aumentando la temperatura de reacción durante la etapa de despolimerización.

50 -- Se obtuvo la muestra que se desvía B (composición alterada) empleando un déficit de L-alanina (-10%) durante la etapa de polimerización.

-- Se obtuvo la muestra que se desvía C (composición alterada) empleando un exceso de L-lisina (+20%) durante la etapa de polimerización.

-- Se obtuvo la muestra que se desvía D (secuencias de aminoácidos alteradas) polimerizando los NCA en dimetilformamida. El uso de un disolvente aprótico polar altera la cinética de polimerización y finalmente las secuencias de las cadenas copoliméricas intermedias.

5

### Ejemplo 3

Se llevaron a cabo un análisis en un sistema de CL 1260 Infinity (Agilent Technologies) equipado con cuatro módulos: bomba binaria (modelo G1312A), desgasificador (modelo G1322A), inyector automático (modelo G1367B) y detector de red de diodos (modelo G1315D). El instrumento estaba ubicado en un laboratorio de temperatura controlada (temperatura: 24°C). Se registraron los cromatogramas y se procesaron usando el software ChemStation para sistemas de CL 3D (Agilent Technologies).

10

#### Condiciones de funcionamiento:

-- Disolvente A: agua Milli-Q con TFA al 0,10% (v/v);

-- Disolvente B: acetonitrilo con TFA al 0,08% (v/v);

15

-- Columna cromatográfica: XBridge Protein BEH C4 de Waters (tamaño de poro: 300 Å, tamaño de partícula: 3,5 µm; dimensiones: 4,6 x 150 mm);

-- Concentración de muestra: 10 mg/ml

-- Volumen de inyección: 10 µl;

-- Velocidad de flujo: 1,00 ml/min;

20

-- Gradiente escalonado: véase la tabla 1;

-- Detector: UV a 220 nm;

-- Tiempo de gradiente: 45,40 minutos;

-- Tiempo de ejecución total: 57,50 minutos.

Tabla 1. Gradiente escalonado

Escalón	Tiempo total (min)	Velocidad de flujo (µl/min)	A (%)	B (%)
0	0,00	1000	90,0	10,0
1	4,50	1000	90,0	10,0
2	4,60	1000	87,0	13,0
3	9,60	1000	87,0	13,0
4	9,70	1000	84,0	16,0
5	14,70	1000	84,0	16,0
6	14,80	1000	81,0	19,0
7	19,80	1000	81,0	19,0
8	19,90	1000	78,0	22,0
9	24,90	1000	78,0	22,0
10	25,00	1000	75,0	25,0
11	30,00	1000	75,0	25,0
12	30,10	1000	72,0	28,0
13	35,10	1000	72,0	28,0
14	35,20	1000	69,0	31,0
15	40,20	1000	69,0	31,0
16	40,30	1000	66,0	34,0
17	45,30	1000	66,0	34,0
18	45,40	1000	20,0	80,0
19	49,40	1000	20,0	80,0
20	49,50	1000	90,0	10,0
21	57,50	1000	90,0	10,0

25

Se ejecutaron, para cada muestra, seis análisis replicados consecutivos. Se alternaron los análisis de muestras con los análisis de blanco y placebo. Después de la sustracción del placebo, se integró cada cromatograma y se

normalizaron las áreas de pico con respecto al área total, siendo esta última el área de los siete picos (véase la figura 2). Para cada muestra, se notificaron las áreas de pico promedio (calculadas con respecto a seis réplicas).

Tabla 2. Resultados de análisis mediante RP-HPLC de Copaxone y cuatro muestras que se desvían. Se resaltan en negrita los parámetros fuera de la especificación.

Muestra	% de área de pico 1	% de área de pico 2	% de área de pico 3	% de área de pico 4	% de área de pico 5	% de área de pico 6	% de área de pico 7
P63037	2,8	7,0	15,2	27,7	29,0	14,5	3,8
X07181	3,2	7,9	16,2	27,9	28,5	13,2	3,0
X06251	3,2	7,6	15,5	27,9	29,5	13,4	2,9
P53886	3,5	8,2	16,8	28,1	27,8	12,7	2,8
P53890	2,8	7,5	16,6	28,9	28,6	12,8	2,7
X05981	2,6	6,6	14,8	27,9	30,5	14,5	3,1
MIN.	2,6	6,6	14,8	27,7	27,8	12,7	2,7
MÁX.	3,5	8,2	16,8	28,9	30,5	14,5	3,8
A	<b>5,7</b>	<b>11,1</b>	<b>19,7</b>	28,3	<b>23,4</b>	<b>9,6</b>	<b>2,2</b>
B	<b>4,5</b>	<b>9,8</b>	<b>19,6</b>	<b>32,1</b>	<b>25,8</b>	<b>7,4</b>	<b>0,9</b>
C	<b>9,2</b>	<b>16,6</b>	<b>25,8</b>	28,8	<b>15,7</b>	<b>3,5</b>	<b>0,4</b>
D	<b>3,9</b>	<b>6,4</b>	<b>10,0</b>	<b>18,0</b>	<b>27,3</b>	<b>24,2</b>	<b>10,3</b>

5 Se analizaron seis lotes de Copaxone de Teva y cuatro muestras que se desviaban (A a D, véase el ejemplo 2) a través del método descrito anteriormente. La comparación de los resultados (notificados en la tabla 2; se resaltan en negrita los parámetros fuera de la especificación) muestra que el método analítico puede distinguir acetato de glatirámico de copolímeros no conformes obtenidos alterando:

- 10 -- la duración y/o la temperatura de la reacción de escisión y, por tanto, el peso molecular promedio del copolímero (muestra A);
- la composición global de aminoácidos y, en última instancia, la hidrofobicidad de la mezcla de polipéptidos resultante (muestras B y C);
- las secuencias de aminoácidos de las cadenas copoliméricas intermedias (protegidas) (muestra D).

#### 15 Ejemplo 4

Se llevó a cabo el fraccionamiento semipreparativo de muestras de acetato de glatirámico usando el método de gradiente escalonado, descrito en el ejemplo 3, optimizado convenientemente para cromatografía semipreparativa.

20 Se efectuaron experimentos en un equipo ensamblado de Waters de seis módulos: un sistema de suministro de múltiples disolventes (600S Controller), un sistema de procesamiento de muestras de capacidad alta (2767 Sampler Manager), el organizador fluido de columna, una bomba con amortiguación de pulsos para la aplicación posterior a la columna (Reagent Manager), un detector UV (detector de absorbancia dual 2487), y un espectrómetro de masas (MicromassZQ). Todos estos módulos se controlaron mediante el software MassLynx MS (Waters Corporation).

#### Condiciones de funcionamiento:

- Disolvente A: agua Milli-Q con TFA al 0,10% (v/v);
- 25 -- Disolvente B: acetonitrilo con TFA al 0,08% (v/v)
- Columna cromatográfica: Jupiter C4 AXIA de Phenomenex (tamaño de poro: 300 Å, tamaño de partícula: 10 µm; dimensiones: 21,2 x 150 mm);
- Concentración de muestra: 20 mg/ml
- Volumen de inyección: 950 µl;
- 30 -- Velocidad de flujo: 20,00 ml/min;
- Gradiente escalonado: véase la tabla 1;
- Detector: UV a 220 nm;
- Tiempo de gradiente: 45,40 minutos;
- Tiempo de ejecución total: 57,50 minutos.

## ES 2 707 500 T3

Se fraccionó seis veces un lote de Copaxone (n.º X07181) según el procedimiento descrito anteriormente. Se secaron a vacío las fracciones recogidas (correspondientes a los picos 3 a 6, véase la figura 2) y posteriormente se analizaron para determinar su contenido de aminoácidos. Se hidrolizaron las muestras en HCl 6 N/H<sub>2</sub>O. Entonces, se derivatizaron los aminoácidos (con el fin de lograr derivados volátiles), y se separaron mediante cromatografía de gases en una columna capilar.

5

Los resultados del análisis de aminoácidos (véase la tabla 3 y la figura 3) confirman (experimentalmente) que la fracción molar de L-alanina ( $X_A$ ) aumenta con el tiempo de retención (y la hidrofobicidad) de los polipéptidos, mientras que disminuye la fracción molar de L-lisina ( $X_K$ ). Como resultado, la razón  $X_A/X_K$  se correlaciona con la hidrofobicidad de los polipéptidos.

10 Tabla 3. Fracciones molares de aminoácidos (%) y razón  $X_A/X_K$  de las fracciones 3-6 determinadas para seis fraccionamientos replicados de Copaxone (lote n.º X07181).

Fracción	$X_A$ (%)	$X_K$ (%)	$X_Y$ (%)	$X_E$ (%)	$X_A/X_K$
3	42,4	38,5	9,4	9,8	1,10
3	41,3	38,3	9,4	11,0	1,08
3	43,0	38,3	9,5	9,2	1,12
3	42,1	38,3	9,5	10,1	1,10
3	42,1	38,7	9,3	9,9	1,09
3	41,3	38,6	9,4	10,7	1,07
4	44,0	35,8	9,5	10,7	1,23
4	43,2	36,0	9,5	11,3	1,20
4	45,4	35,4	9,6	9,6	1,28
4	43,5	36,2	9,5	10,8	1,20
4	43,3	36,4	9,4	11,0	1,19
4	43,7	36,6	9,4	10,3	1,19
5	46,9	33,1	9,3	10,7	1,42
5	46,4	33,2	9,4	11,1	1,40
5	45,5	34,1	9,3	11,1	1,33
5	45,1	33,6	9,4	11,8	1,34
5	46,7	33,9	9,2	10,3	1,38
5	47,1	34,0	9,2	9,7	1,39
6	49,7	30,5	9,0	10,8	1,63
6	49,3	30,6	8,9	11,2	1,61
6	53,0	30,2	9,0	7,8	1,75
6	48,9	30,8	9,0	11,3	1,59
6	51,7	30,2	9,0	9,1	1,71
6	49,6	31,3	8,8	10,4	1,58



**REIVINDICACIONES**

1. Método para analizar una mezcla de polipéptidos, comprendiendo cada uno de dichos polipéptidos comprende ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, método que comprende someter dicha mezcla de polipéptidos a cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa, con una fase móvil que comprende una mezcla de al menos dos disoluciones, que tienen diferente polaridad, en el que la disolución más polar consiste en agua y la disolución menos polar consiste en acetonitrilo, en el que el porcentaje en volumen de la disolución menos polar aumenta a lo largo del tiempo de manera escalonada y en el que, en dicha mezcla de polipéptidos, el intervalo de fracción molar de ácido L-glutámico es de 0,129-0,153, de L-alanina es de 0,392-0,462, de L-tirosina es de 0,086-0,100 y de L-lisina es de 0,300-0,374, preferiblemente la fracción molar promedio de ácido L-glutámico es de aproximadamente 0,141, de L-alanina es de aproximadamente 0,427, de L-tirosina es de aproximadamente 0,095, y de L-lisina es de aproximadamente 0,338.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el porcentaje en volumen de la disolución menos polar aumenta en del 2 al 4% cada de 4 a 6 minutos.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el porcentaje en volumen de la disolución menos polar aumenta en el 3% cada de 4,5 a 5,5 minutos.
4. Método según la reivindicación 2, en el que la composición en volumen de la fase móvil cambia a lo largo del tiempo según se notifica en la siguiente tabla, en la que A representa el agua en porcentaje en volumen agua y B representa el acetonitrilo en porcentaje en volumen:

Escalón	Tiempo total (min)	Velocidad de flujo (µl/min)	A (%)	B (%)
0	0,00	1000	90,0	10,0
1	4,50	1000	90,0	10,0
2	4,60	1000	87,0	13,0
3	9,60	1000	87,0	13,0
4	9,70	1000	84,0	16,0
5	14,70	1000	84,0	16,0
6	14,80	1000	81,0	19,0
7	19,80	1000	81,0	19,0
8	19,90	1000	78,0	22,0
9	24,90	1000	78,0	22,0
10	25,00	1000	75,0	25,0
11	30,00	1000	75,0	25,0
12	30,10	1000	72,0	28,0
13	35,10	1000	72,0	28,0
14	35,20	1000	69,0	31,0
15	40,20	1000	69,0	31,0
16	40,30	1000	66,0	34,0
17	45,30	1000	66,0	34,0
18	45,40	1000	20,0	80,0
19	49,40	1000	20,0	80,0
20	49,50	1000	90,0	10,0
21	57,50	1000	90,0	10,0

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fase estacionaria de la columna cromatográfica es un gel de sílice unido a alquilo, preferiblemente un gel de sílice unido a C4.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la columna cromatográfica está equipada con un detector UV.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende determinar la distribución de composición química y/o el carácter hidrófobo de dicha mezcla de polipéptidos.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha mezcla de polipéptidos es un glatiramoide o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente acetato de glatirámico.

Figura 1

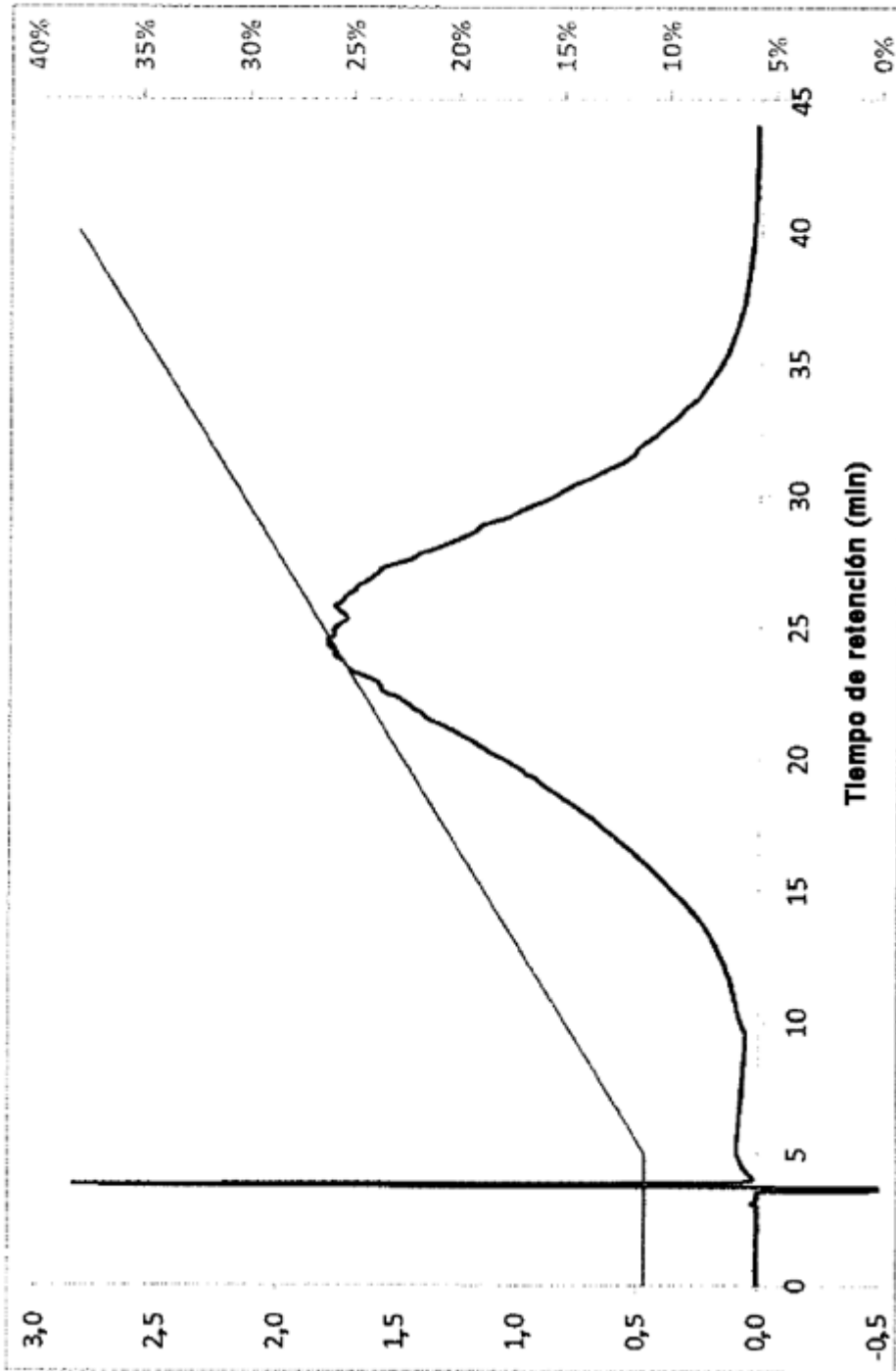


Figura 2

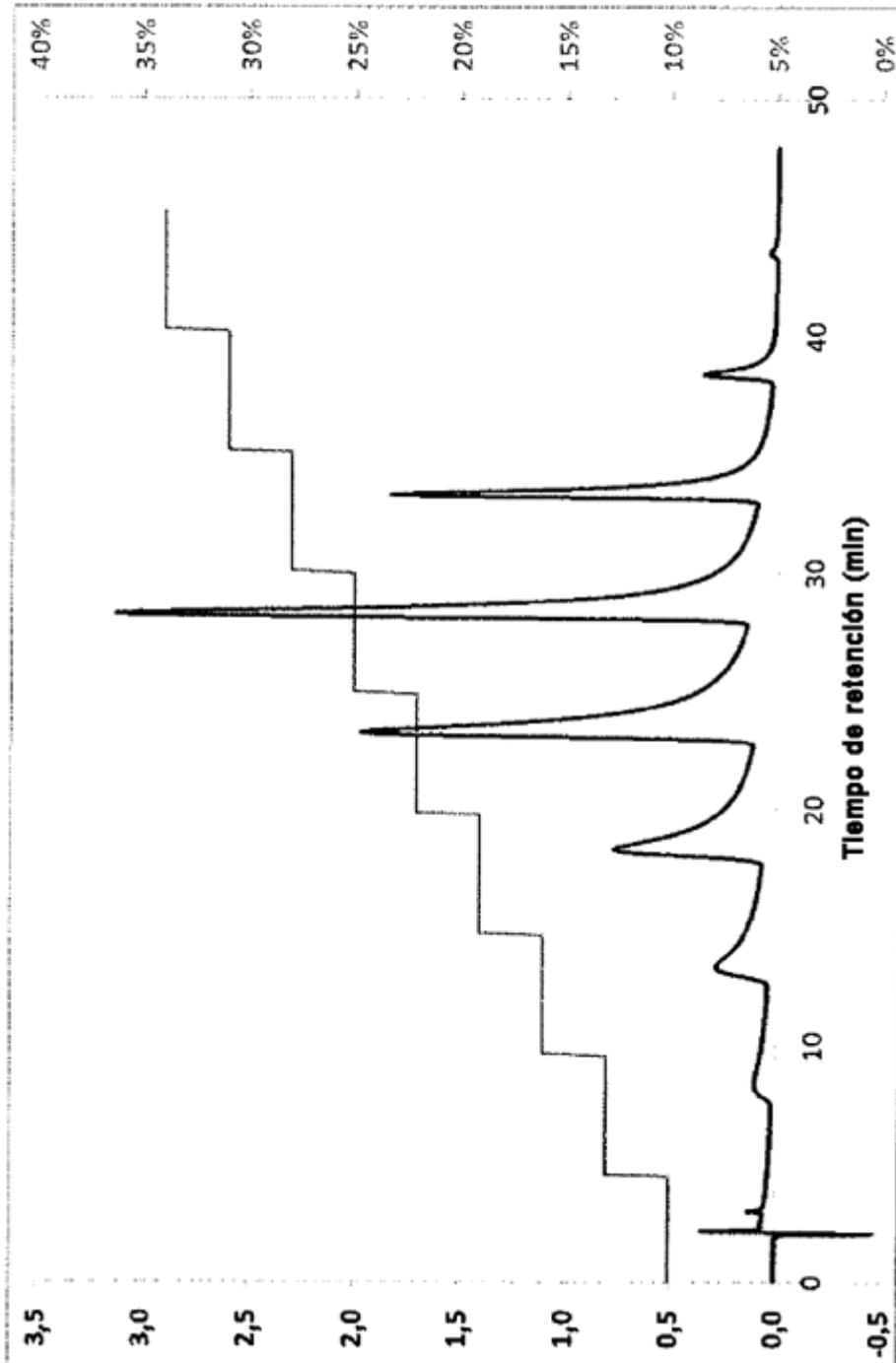


Figura 3

