

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 179**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2015** E 15186742 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** EP 3147667

54 Título: **Análisis de la distribución de peso molecular de mezclas de polipéptidos complejas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.02.2020**

73 Titular/es:

**CHEMI S.P.A. (100.0%)  
Via dei Laboratori, 54  
20092 Cinisello Balsamo (Milano), IT**

72 Inventor/es:

**STEVENAZZI, ANDREA;  
DISTASO, ANDREA;  
GAIASSI, AURELIANO;  
SPURIA, ELEONORA y  
CAPPELLETTI, SILVANA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 744 179 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 de la distribución de peso molecular de mezclas de polipéptidos complejas

5 La presente invención se refiere a métodos analíticos sencillos de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC en inglés) útiles para la evaluación de distribuciones de peso molecular (MWD en inglés) precisas de determinadas mezclas de polipéptidos conocidas como glatiramoides. El uso de un método de SEC basado en uno o más patrones de MWD amplía proporcionalmente el perfil de distribución de peso molecular absoluto (no relativo) de mezclas de polipéptidos complejas como, por ejemplo, el polímero de acetato de glatirámero (GA en inglés).

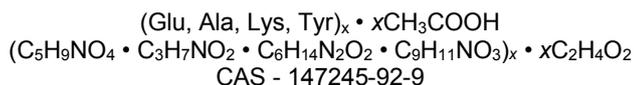
10

**Antecedentes de la invención**

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

20 De acuerdo con el etiquetado del producto, el GA consiste en las 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. El peso molecular promedio del GA varía de 5.000 a 9.000 Da.

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



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

El GA se sintetiza a través de la polimerización de aminoácidos, seguida de una etapa posterior de escisión o despolimerización parcial. Debido a la naturaleza estocástica de las reacciones de polimerización y escisión, los polipéptidos obtenidos mediante este proceso varían en secuencia, longitud y peso molecular (MW en inglés), lo que da como resultado una distribución de peso molecular (MWD en inglés) característica que abarca de aproximadamente 2.500 a 20.000 Da.

40 El MW promedio y la MWD representan características importantes para distinguir el GA de otros glatiramoides o mezclas de polipéptidos similares. De hecho, las diferencias en el perfil de MWD pueden ser tanto indicativas de un proceso de fabricación diferente como parcialmente predictivas de una actividad biológica diferente. En comparación con el GA, los copolímeros de MW alto son altamente inmunogénicos y tóxicos, mientras que los glatiramoides de MW bajo muestran una potencia biológica menor en los modelos farmacológicos (Ramot y col., 2012).

45 La MWD, o la distribución de masa molar, de un polímero describe la relación entre el número de moles de cada especie de polímero ( $N_i$ ) y la masa molar ( $M_i$ ) de esa especie. La MWD se puede representar ya sea de forma gráfica, es decir, como una curva acumulativa o diferencial (véanse las Figuras 5 y 6), o de forma numérica, como una tabla en la que se representa la MWD acumulativa que indica el porcentaje en masa de las macromoléculas que tienen un peso molecular menor de o igual a un valor específico (véase la Tabla 1).

50 Como alternativa, la MWD se puede representar mediante el cálculo de los promedios de peso molecular más comunes. Se pueden definir diferentes valores, o momentos, promedio, dependiendo de la fórmula estadística que se aplique. En la práctica, se usan al menos tres promedios:

55 -- Masa molar promedio en número:  $M_n = \sum(N_i M_i) / \sum N_i$

-- Masa molar promedio en peso:  $M_w = \sum(N_i M_i^2) / \sum(N_i M_i)$

-- Masa molar promedio en Z:  $M_z = \sum(N_i M_i^3) / \sum(N_i M_i^2)$

60 en los que  $N_i$  es el número de moléculas con masa molar  $M_i$ .

Si el polímero es una muestra homogénea ("monodispersa"), entonces todos los promedios de peso molecular son equivalentes. En el caso de una muestra de polímero heterogénea ("polidispersa"), la relación de  $M_w$  respecto a  $M_n$  ( $D = M_w/M_n$ ) y la de  $M_z$  respecto a  $M_w$  ( $D' = M_z/M_w$ ) son medidas de la dispersión (heterogeneidad) de la MWD.

65

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una técnica cromatográfica que separa las moléculas en

solución por su tamaño molecular o, de manera más precisa, por su volumen hidrodinámico. La fase estacionaria de la SEC es un material poroso con una distribución de tamaño de poro característica y, dependiendo del tamaño molecular, una fracción mayor o menor de los poros es accesible a las macromoléculas. Por consiguiente, el volumen de elución de un soluto aumenta a medida que disminuye su tamaño molecular. Cuando se calibra correctamente, un sistema de SEC es el método más conveniente para la determinación de la MWD total de un polímero, tal como GA.

Se describen dos estrategias o métodos diferentes en la literatura de patentes para la obtención de la distribución de peso molecular de una mezcla de polipéptidos a través de SEC. El primer grupo de métodos proporciona valores de peso molecular basados en una calibración obtenida con un conjunto de patrones monodispersos. Estos patrones son moléculas individuales (obtenidas mediante síntesis o tecnología de ADN recombinante) o mezclas con MWD estrecha obtenidas mediante el fraccionamiento de una muestra de gliciramoide y, en todos los casos, son diferentes del verdadero GA.

Un segundo grupo de métodos proporciona valores "absolutos" del peso molecular usando, en general, un detector sensible al peso molecular, por ejemplo, una dispersión de luz de ángulo recto (RALS en inglés), una dispersión de luz de ángulo bajo (LALS en inglés), híbridos de RALS/LALS o una dispersión de luz de múltiples ángulos (MALS en inglés), normalmente en combinación con un detector de concentración, ya sea basado en el índice de refracción (RI en inglés) o la absorción ultravioleta (UV).

Existen numerosas patentes (US 6.514.938, US 6.800.287, US 7.074.580, US 7.163.802, US 7.615.359 y US 8.399.211) que enseñan cómo usar patrones fabricados con moléculas de polipéptidos individuales para la calibración de las columnas de SEC empleadas en la determinación de la MWD de lotes de GA. La necesidad de usar un conjunto de patrones dedicados depende de las características estructurales particulares de los polipéptidos de GA. El fraccionamiento por SEC está regulado por el volumen hidrodinámico molecular, por lo que la MWD de un copolímero se puede estimar con precisión solo si los patrones de MW tienen la misma estructura de orden superior (y, por tanto, la misma densidad o volumen específico parcial) de la muestra (S. Mori y H.G. Barth *Size Exclusion Chromatography*, Springer, 1999, págs. 101-104). Por ejemplo, mediante el uso de una mezcla comercial de proteínas como el patrón de MW, el MW aparente obtenido de GA resultó ser más alto que el obtenido usando un conjunto de péptidos de tipo GA (véase la solicitud de patente US 2007/059798). Esto se debe a que las proteínas globulares están más estructuradas que los polipéptidos de GA, teniendo de este modo una densidad más alta (o un volumen específico parcial más bajo). Por consiguiente, el uso de marcadores de proteínas "normales" disponibles en el mercado no es adecuado para la determinación de la MWD de lotes de GA.

No obstante, cualquier conjunto de patrones de polipéptidos, que consista ya sea en moléculas individuales o mezclas con MWD estrecha, seguirá siendo diferente de la mezcla de GA, que contiene una gran cantidad de polipéptidos de diferentes tamaños que cubre por completo el intervalo completo de pesos moleculares de la MWD. Por tanto, la MWD evaluada mediante estos métodos solo puede ser relativa, no absoluta. Además, resulta evidente que la preparación de cantidades suficientes de péptidos largos y puros (ya sea mediante síntesis química o mediante tecnología de ADN recombinante) puede ser muy laboriosa y costosa. Los métodos que proporcionan una MWD relativa también se desvelan en los documentos US 2002/115103, WO 00/18794, WO 2012/123959 y WO 2012/016042.

El otro procedimiento, basado en métodos de SEC absoluta, se ha sugerido recientemente en la solicitud de patente US 2014/0045740 y en el *Journal of Separation Science*, Volumen 38, Número 9, páginas 1537-1543, mayo de 2015: de acuerdo con esa enseñanza, cada lote de GA se puede analizar usando cromatografía SEC acoplada a detectores de dispersión de luz de múltiples ángulos e índice de refracción (SEC-MALS-RI en inglés). Aunque el método es "absoluto" y supera la necesidad de calibración de columna, esta técnica no es adecuada para aplicarse de manera rutinaria para fines de control de calidad y/o liberación de lotes. De hecho, el detector de MALS está sujeto a algunos problemas prácticos: (a) una baja relación señal respecto a ruido, debido a la presencia de partículas extrañas; (b) la alta sensibilidad de la señal de MALS incluso a fenómenos de agregación pequeños y reversibles. Estos problemas prácticos reducen la repetibilidad y reproducibilidad del análisis de MWD por medio del método de SEC-MALS-RI.

Por tanto, resulta evidente la necesidad de un método analítico más práctico y robusto útil para la determinación de la MWD detallada y precisa del GA y otras mezclas de polipéptidos de tipo GA. La evaluación precisa de la MWD a través de tales métodos analíticos es crucial para la elección de lotes de GA adecuados para uso farmacéutico.

### Sumario de la invención

La invención, en su forma más amplia, se define mediante la reivindicación 1 independiente. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones 2-10.

La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de un método para la evaluación de la distribución de peso molecular (MWD) de varias mezclas de polipéptidos. En algunos casos, el método analítico descrito en la presente invención se puede aplicar a mezclas de copolímeros que contienen residuos de aminoácidos de ácido L-glutámico,

L-alanina, L-lisina y L-tirosina en una relación molar específica y, en algunos casos preferidos, la mezcla que se va a analizar puede estar destinada a la preparación de un producto farmacológico terapéuticamente equivalente a Copaxone®.

5 El método descrito en el presente documento implica el uso de una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) convencional en un conjunto de columnas adecuado y describe condiciones experimentales específicas calibradas en uno o más lotes de tipo GA usados como patrones de peso molecular amplio. La calibración de patrones amplios una técnica bien establecida para la determinación del peso molecular mediante SEC.

10 En el método de la invención, el patrón amplio es una mezcla de polipéptidos obtenida usando el mismo procedimiento usado para la preparación de las mezclas que se van a analizar; el patrón amplio es una mezcla de polipéptidos de tipo GA y es una mezcla que muestra propiedades fisicoquímicas y biológicas similares o idénticas a las de Copaxone®. El/los patrón/patrones amplio/s tienen una estructura sustancialmente idéntica a la de los lotes de polipéptidos que se van a analizar. En consecuencia, la calibración de SEC y la MWD final de los polipéptidos se pueden considerar como absolutos.

15 En el método descrito en el presente documento, el patrón amplio que se va a usar como calibrante del sistema de SEC se analiza preliminarmente usando un detector sensible a la masa molar, tal como una combinación de detectores de MALS-RI o MALS-UV. De esta manera, el valor de peso molecular absoluto del polímero se determina en cada volumen de elución. Mediante el uso del método de SEC-MALS-RI o SEC-MALS-UV absoluto, se podría determinar la función experimental  $\text{Log } M = f(V)$ , en la que M representa el peso molecular determinado mediante el detector de MALS y V es el volumen de elución. La función experimental  $\text{Log } M = f(V)$  representa la curva de calibración del sistema de SEC en condiciones específicas, que incluyen el tipo de polímero y las condiciones experimentales.

20 En la calibración del sistema de SEC, la MWD del/de los patrón/patrones se puede expresar en dos métodos alternativos: 1) mediante los promedios calculados ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_z$ ) y si se conoce también la viscosidad intrínseca; 2) mediante la MWD acumulativa. De manera específica, la MWD acumulativa del calibrante se puede representar como una tabla que indica los percentiles (por ejemplo, 1 %, 5 %, ..., 95 %, 99 %) y los pesos moleculares correspondientes. Cada percentil indicado en la tabla representa la fracción en peso de macromoléculas en la mezcla que tienen un peso molecular menor de o igual al valor del peso molecular especificado.

25 Mediante el uso de uno de los dos métodos descritos (promedios o MWD acumulativa), el soporte lógico cromatográfico de SEC disponible en el mercado puede calcular la curva de calibración absoluta,  $\text{Log } M = f(V)$ , para cualquier otro sistema de SEC después de la calibración con el mismo conjunto de patrones. Cuando sea posible, la curva de calibración es lineal, pero también se podrían usar curvas polinomiales (típicamente y preferentemente de tercer orden).

30 Después, la curva de calibración del/de los patrón/patrones de MWD se aplica al cromatograma de los lotes de polipéptidos que se van a analizar (es decir, la señal del detector de concentración, ya sea de RI o UV) para determinar la MWD completa de las muestras, los promedios de peso molecular ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_z$ ), el peso molecular en el pico máximo ( $M_p$ ), la dispersión de peso molecular ( $M_w/M_n$  y/o  $M_z/M_w$ ).

35 La MWD medida, sea como sea expresada, se puede comparar con determinados intervalos de valores preseleccionados, tales como las especificaciones de liberación para los principios farmacéuticos activos (API) o para los productos farmacológicos, y el resultado, solo o junto con otros atributos de calidad, se puede usar para decidir si la mezcla examinada se puede usar o no para la preparación de un producto farmacológico. En algunos casos, la MWD de las mezclas de polipéptidos de tipo GA se puede comparar con la de un número adecuado de lotes comerciales de Copaxone® y el resultado se puede usar como criterios de igualdad.

#### 50 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Espectros de RMN del patrón amplio (panel superior) y de un lote de Copaxone® (panel inferior).

55 Figura 2. Espectros de CD del patrón amplio (línea continua) y de un lote de Copaxone® (línea discontinua).

Figura 3. Cromatogramas de SEC del patrón amplio (línea continua) y de un lote de Copaxone® (línea discontinua).

Figura 4. Curva de calibración experimental y ajustada para la muestra de patrón amplio.

60 Figura 5. Distribución de masa molar acumulativa del patrón amplio. Esta describe el crecimiento de la fracción en peso (%) como función de  $\text{Log } M$ .

Figura 6. Distribución de masa molar diferencial del patrón amplio.

65 Figura 7. Comparación de las curvas de calibración ( $\text{Log } M$  en comparación con TR) obtenida a partir de: un lote del

patrón amplio de la invención (círculos); un lote de Copaxone® (n.º X07341, cuadrados).

### Definiciones

5 A menos que se definan de otro modo, todos los términos y las expresiones, notaciones y otra terminología científica de la técnica usados en el presente documento pretenden tener los significados comúnmente entendidos por aquellos expertos en la materia a la que pertenece la presente divulgación. En algunos casos, los términos o las expresiones con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para una referencia rápida; por tanto, la inclusión de tales definiciones en el presente documento no se debe interpretar como que representa una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende, en general, en la técnica.

15 Las expresiones "de manera aproximada" y "aproximadamente" se refieren, en el presente documento, al intervalo del error experimental, que se puede producir en una medición.

20 Las expresiones "que comprende/n", "que tiene/n", "que incluye/n" y "que contiene/n" se deben interpretar como expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye/n, pero sin limitación") y se deben considerar como que proporcionan soporte también a expresiones como "consisten esencialmente en", "que consiste/n esencialmente en", "consisten en" o "que consiste/n en".

25 Las expresiones "consisten esencialmente en", "que consiste/n esencialmente en" se deben interpretar como expresiones semicerradas, lo que significa que no se incluyen otros ingredientes y/o etapas que afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la invención (por tanto, se pueden incluir excipientes opcionales).

Las expresiones "consiste en", "que consiste/n en" se deben interpretar como expresiones cerradas.

30 Las expresiones "igualdad" o "criterios de igualdad" se refieren, en el presente documento, a aquellos atributos de sustancia/s farmacológica/s física/s, química/s y/o biológica/s que, de acuerdo con una agencia reguladora (por ejemplo, la Food and Drug Administration de Estados Unidos), se deben comparar para demostrar 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 inyección de acetato de glatirámico genérico puede demostrar la igualdad de los principios activos con respecto a los siguientes cuatro criterios: (1) esquema de reacción fundamental; (2) propiedades fisicoquímicas, incluyendo composición; (3) identificaciones estructurales para la polimerización y despolimerización; y (4) resultados en una prueba biológica.

40 El término "glatiramoides" se refiere, en el presente documento, a una mezcla heterogénea de polipéptidos que contienen cuatro residuos de aminoácidos de origen natural (ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina, L-lisina) en una relación molar específica, es decir, en la que el intervalo de fracción molar del ácido L-glutámico es de 0,129-0,153, el de la L-alanina es de 0,392-0,462, el de la L-tirosina es de 0,086-0,100 y el de la L-lisina es de 0,300-0,374.

La expresión "mezcla de polipéptidos", en el presente documento, también incluye las posibles sales farmacéuticamente aceptables, en particular, el acetato.

45 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere, en el presente documento, a aquellas sales que poseen la eficacia y propiedades biológicas del compuesto salificado y que y que no producen reacciones adversas cuando se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser sales inorgánicas u orgánicas; los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación: carbonato, clorhidrato, bromhidrato, sulfato, hidrógeno sulfato, citrato, maleato, fumarato, acetato, trifluoroacetato, 2-naftalenosulfonato y para-toluenosulfonato. Se puede encontrar información adicional sobre las sales farmacéuticamente aceptables en el *Handbook of pharmaceutical salts*, P. Stahl, C. Wermuth, WILEY-VCH, 127-133, 2008.

55 La expresión "sistema de SEC convencional" se refiere, en el presente documento, a un sistema cromatográfico equipado con un detector de concentración únicamente. En algunos casos, el detector de concentración puede ser un detector de DRI o UV. Por tanto, se puede usar un sistema de SEC convencional para determinar la MWD absoluta de una muestra si y solo si esta se ha calibrado previamente con los patrones de MW adecuados.

### Descripción de la invención

60 La presente invención describe algunos métodos analíticos útiles para la evaluación de la distribución de peso molecular (MWD) de los glatiramoides. Los glatiramoides son mezclas de copolímeros de aminoácidos que contienen residuos de ácido L-glutámico, L-alanina, L-lisina y L-tirosina en algunas proporciones específicas. En algunos casos, tales mezclas pueden tener una composición similar a la del acetato de glatirámico (GA), en el que la relación molar promedio de los cuatro aminoácidos es de 0,141, 0,427, 0,338 y 0,095, respectivamente.

De acuerdo con la presente invención, la mezcla que se va a analizar puede tener propiedades fisicoquímicas en acetato de glatirámero y puede estar destinada a la preparación de un producto farmacológico terapéuticamente equivalente a Copaxone®. Por tanto, el método descrito en el presente documento se puede usar para distinguir el acetato de glatirámero de los copolímeros no conformes.

5 En el método de la invención, los glatiramoides y el acetato de glatirámero se pueden preparar siguiendo los procesos de fabricación ya descritos (Teitelbaum y col., 1971, patente estadounidense n.º 3.849.550, patente estadounidense n.º 5.800.808), que incluyen las siguientes etapas:

10 Etapa (1): polimerización de los precursores de aminoácidos protegidos (N-carboxianhídridos) hasta obtener un copolímero protegido;

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

15 Etapa (3): desprotección de la lisina de N-trifluoroacetilo en piperidina acuosa;

Etapa (4): purificación y liofilización.

20 El método descrito en el presente documento implica el uso de una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) convencional en un sistema cromatográfico adecuado, que se calibra usando un lote de copolímero como patrón de peso molecular amplio. La calibración de patrones amplios es un método bien establecido para la determinación de la MWD de mezclas complejas, tales como heparinas de bajo peso molecular (2014). El método también se describe en varios libros de texto y en monografías de farmacopea.

25 En la presente invención, el patrón amplio debe ser una mezcla de polipéptidos de tipo glatirámero y, en algunos casos preferidos, esta puede ser una mezcla que muestre propiedades fisicoquímicas y biológicas comparables a las de Copaxone®. En particular, el patrón amplio debe ser una mezcla de polipéptidos que tengan la misma estructura de orden superior (y, por tanto, la misma densidad o volumen específico parcial) que los polipéptidos que comprenden Copaxone®.

30 En los métodos descritos en el presente documento, el MW del patrón amplio se puede determinar mediante una serie de técnicas complementarias, tales como osmometría, dispersión de luz estática, viscosimetría y ultracentrifugación analítica. En algunos casos, la MWD del patrón amplio se puede caracterizar mediante una técnica adecuada de espectrometría de masas (EM), tal como EM de bombardeo con átomos rápidos, EM de desorción/ionización por láser asistida por matriz o EM de electropulverización. En una realización preferida, el patrón amplio se fracciona mediante un sistema de SEC optimizado (columna, tampón de elución, flujo, concentración de muestra, volumen de inyección, etc.) y se analiza usando un detector sensible a la masa molar, tal como MALS, acoplado a un detector de concentración, tal como un detector de índice de refracción diferencial (DRI en inglés) o un detector de absorción ultravioleta (UV), tal como se desvela, por ejemplo, en, tal como se desvela, por ejemplo, en Ollia y col., J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 833-841.

35 El MW absoluto del copolímero se puede determinar en cada incremento de volumen usando el procedimiento de gráfico de Zimm. En este procedimiento, se supone que la señal de dispersión de luz es proporcional a la masa molar y la concentración de muestra en cualquier punto del cromatograma. Por tanto, un sistema de SEC acoplado a un detector de MALS y un detector de concentración (ya sea de DRI o UV) puede determinar con precisión la distribución de masa molar total de la mezcla de patrones amplios. La MWD acumulativa del patrón amplio se puede representar mediante la tabulación de los pesos moleculares correspondientes a los valores especificados del área acumulativa (expresada como un porcentaje del área de pico total). Esta tabla debe entenderse como el certificado de análisis (CoA en inglés) del patrón amplio y usarse para la calibración de un sistema de SEC convencional.

40 Las muestras se deben analizar en un sistema de SEC convencional que funcione en las mismas condiciones (columna, tampón de elución, etc.) usadas para la caracterización del patrón amplio. El patrón amplio y las muestras se deben analizar en la misma sesión o secuencia analítica. La columna cromatográfica se debe calibrar mediante la inyección del patrón amplio, el registro del cromatograma y la determinación de los tiempos de elución correspondientes a las fracciones en peso acumulativas enumeradas en el CoA. La curva de calibración se debe construir mediante la representación gráfica del logaritmo de los MW enumerados en el CoA en comparación con los tiempos de elución correspondientes y la interpolación de los puntos con una función decreciente adecuada, tal como un polinomio de tercer orden o una función lineal. En una realización preferida, la curva de calibración puede ser una función lineal (decreciente).

45 En cada muestra, la MWD se determina mediante la asignación, para cada incremento de volumen de elución, del MW calculado a través de la curva de calibración. La MWD se puede representar mediante el cálculo de los siguientes parámetros: peso molecular promedio en pico (Mp), peso molecular promedio en número (Mn), peso molecular promedio en peso (Mw), peso molecular promedio en Z (Mz) y dispersión de peso molecular (Mw/Mn y/o Mz/Mw). Además, la MWD se puede representar mediante herramientas gráficas (MWD acumulativa y diferencial)

y/o mediante la tabulación de los valores de MW para fracciones en peso acumulativas específicas. En algunos casos, las fracciones en peso acumulativas pueden ser las siguientes: 10 %, 50 %, 90 %. En otros casos preferidos, las fracciones en peso acumulativas deben ser las siguientes: 2,5 %, 16 %, 84 %, 97,5 %.

- 5 En cada muestra, grupo o lote, los parámetros de MWD se pueden comparar con un conjunto predeterminado de valores de referencia, que deben entenderse como especificaciones de liberación para principios farmacéuticos activos (API). La conformidad con estas especificaciones, sola o junto con otros criterios de calidad, se puede usar para decidir si el lote examinado es adecuado o no para uso terapéutico. En una realización preferida, los lotes que muestran un perfil de MWD correcto se pueden usar para la fabricación de soluciones inyectables que contienen 20 o 40 mg/ml de GA y 40 mg/ml de manitol.

15 En algunos casos, el método descrito en el presente documento se puede usar para analizar muestras de solución inyectable de RLD de Copaxone® con el objetivo de establecer los criterios de "igualdad". En la evaluación de la igualdad, los equivalentes terapéuticos propuestos (fármacos genéricos) y las muestras comerciales de RLD de Copaxone® se deben analizar en la misma sesión analítica y compararse.

20 Con más detalle, la presente invención se refiere a un método para la determinación de la distribución de peso molecular del acetato de glatirámico para la cromatografía de exclusión por tamaño, en el que la columna cromatográfica se calibra mediante el uso de una mezcla ("de patrones") de polipéptidos (b) que tiene una distribución de peso molecular absoluto conocida, cuyos polipéptidos también comprenden ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, para establecer una relación entre el tiempo de retención en la columna cromatográfica y la distribución de peso molecular absoluto.

25 De acuerdo con otra realización, la distribución de peso molecular absoluto de dicha mezcla de polipéptidos (b) comprende al menos un peso molecular seleccionado de: masa molar promedio en número, masa molar promedio en peso, masa molar promedio en Z y distribución de peso molecular acumulativa; preferentemente, la distribución de peso molecular absoluto de dicha mezcla de polipéptidos (b) comprende la masa molar promedio en número, la masa molar promedio en peso y la masa molar promedio en Z.

30 De acuerdo con otra realización, la determinación de la distribución de peso molecular de dicha mezcla de polipéptidos (a) comprende la determinación de al menos un peso molecular seleccionado de: masa molar promedio en número, masa molar promedio en peso, masa molar promedio en Z y distribución de peso molecular acumulativa; preferentemente comprende la determinación de la masa molar promedio en número, la masa molar promedio en peso y la masa molar promedio en Z.

35 Con más detalle, la columna cromatográfica se puede rellenar con un gel de polímero hidrófilo o un gel de sílice recubierto hidrófilo; preferentemente dicho gel de sílice recubierto hidrófilo es un gel de sílice enlazado a gliceropropilo. La columna cromatográfica normalmente está equipada con un detector de concentración, preferentemente un detector de UV.

40 En una realización de la invención, la distribución de peso molecular absoluto de la mezcla de polipéptidos (b) se determina mediante SEC-MALS, preferentemente mediante SEC-MALS-UV o SEC-MALS-RI, más preferentemente mediante SEC-MALS-UV.

45 La mezcla de polipéptidos (b), que se usa en el método de la presente invención, tiene una distribución de peso molecular acumulativa, tal como se indica en la Tabla 3; adicionalmente, el intervalo de fracción molar del ácido L-glutámico es de 0,129-0,153, el de la L-alanina es de 0,392-0,462, el de L-tirosina es de 0,086-0,100 y el de la L-lisina es de 0,300-0,374; más preferentemente, la fracción molar del ácido L-glutámico es de aproximadamente 0,138, la de la L-alanina es de aproximadamente 0,434, la de la L-tirosina es de aproximadamente 0,096 y la de la L-lisina es de aproximadamente 0,331.

Los siguientes ejemplos tienen el fin de ilustrar adicionalmente la invención sin por ello limitarla.

### 55 Ejemplo 1

La mezcla de polipéptidos se preparó mediante el método ya descrito (Teitelbaum y col., 1971, patente estadounidense n.º 3.849.550, patente estadounidense n.º 5.800.808), que incluye las siguientes etapas:

#### 60 Polimerización de los precursores de aminoácidos protegidos

65 Los N-carboxianhídridos de  $\gamma$ -bencil-glutamato, alanina, tirosina y  $\epsilon$ -N-trifluoro-acetil-lisina (en fracciones molares promedio de 0,141, 0,427, 0,095 y 0,338, respectivamente) se disuelven en dioxano anhidro a temperatura ambiente y el proceso de polimerización se inicia mediante la adición de dietilamina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas y, a continuación, se vierte en agua purificada. El producto se filtra, se lava con agua y se seca hasta obtener un lote de copolímero protegido.

Despolimerización parcial y desprotección del glutamato de gamma-bencilo

La mezcla de copolímero protegido se somete a tratamiento con una solución de ácido bromhídrico en ácido acético. El tiempo necesario para obtener una mezcla de peso molecular promedio adecuado depende de la temperatura de reacción. Por tanto, se realiza una reacción de ensayo a pequeña escala en cada nuevo lote: en diferentes períodos de tiempo (por ejemplo, cada hora), el peso molecular promedio se determina mediante análisis de SEC, después de la retirada del resto de grupo TFA; se traza una curva de peso molecular frente al tiempo de reacción y se calcula el tiempo necesario para la obtención del valor diana y se aplica a la reacción a gran escala. El producto obtenido mediante la reacción a gran escala finalmente se vierte en un exceso de agua, se filtra, se lava y se seca, produciendo la mezcla de copolímero protegido con TFA.

Desprotección de la lisina de N-trifluoroacetilo en piperidina acuosa

El copolímero protegido con TFA se suspende en una solución acuosa de piperidina (1 mol/l) a una concentración de aproximadamente 18 g/l. La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y se filtra. La solución de copolímero en bruto se ultrafiltra con agua hasta que se alcanza un pH = 8. A continuación, se añade ácido acético a la solución para que tenga un pH en el intervalo de 4,0 a 4,5 y el copolímero se ultrafiltra adicionalmente con agua hasta que su pH se encuentra en el intervalo de 5,5 a 6,0. A continuación, esta solución se concentra y se liofiliza hasta obtener un lote de acetato de glatirámero sólido.

**Ejemplo 2**

El patrón amplio se caracterizó mediante una diversidad de técnicas complementarias: espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de dicroísmo circular (CD en inglés), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), análisis de aminoácidos (AAA en inglés). La comparación de los resultados con aquellos obtenidos a partir de un lote de los fármacos enumerados de referencia (RLD en inglés) confirmó la similitud de los dos copolímeros.

Espectroscopía de RMN

La mezcla de polipéptidos (aprox. 20 mg) se disolvió en óxido de deuterio (0,75 ml). El espectro de RMN de protones se registró en un espectrómetro Bruker Avance II de 400 MHz equipado con una sonda inversa de banda ancha. El espectro presenta un patrón de resonancia característico de los residuos de aminoácidos que componen el acetato de glatirámero (véase la Tabla 1).

**Tabla 1.** Desplazamientos químicos en <sup>1</sup>H (ppm) del patrón amplio

Desplazamiento químico	Asignación
1,2 - 1,5	β-Ala, γ-Lys
1,5 - 1,7	δ-Lys
1,76	β-Lys
1,85	CH <sub>3</sub> de acetato
aprox. 2,0	β-Glu
2,22	γ-Glu
2,7 - 3,2	ε-Lys, β-Tyr
4,0 - 4,3	α-(Ala, Lys, Glu)
4,4 - 4,5	α-Tyr
6,76	3-Tyr
7,06	2-Tyr

El espectro de RMN del patrón amplio se comparó con el obtenido a partir de una muestra de Copaxone® (lote n.º 538823), que se dializó previamente con agua con el fin de retirar el manitol. Los espectros de RMN de protones se indican en la Figura 1. Los espectros muestran exactamente el mismo perfil (es decir, no hay señales adicionales o que falten), lo que confirma la similitud de las dos muestras.

Espectroscopía de CD

El CD es un método espectroscópico comúnmente usado para estudiar estructuras secundarias (por ejemplo, hélice alfa y lámina beta) en proteínas y polipéptidos. El espectro de CD del acetato de glatirámero representa una identificación de las estructuras secundarias de sus polipéptidos. La estructura secundaria está determinada principalmente por la secuencia de aminoácidos y la longitud de un polipéptido dado.

El patrón amplio y un lote de los RLD se disolvieron por separado en agua (concentración: 0,1 mg/ml) y se transfirieron a cubetas de cuarzo de 0,1 cm de longitud de trayectoria. Los espectros de CD se registraron en la

región de 260-180 nm. Los espectros de las dos muestras se indican en la Figura 2. La comparación de los espectros sugiere que las secuencias de aminoácidos y las estructuras de orden superior de los dos copolímeros son comparables.

#### 5 Cromatografía de exclusión por tamaño

El patrón amplio de la invención y una muestra de Copaxone® (lote n.º X07341) se analizaron mediante SEC (véase el Ejemplo 4). La comparación de los cromatogramas (véase la Figura 3) indica que la MWD de los dos copolímeros son comparables.

10

#### Análisis de aminoácidos

El contenido de aminoácidos del patrón amplio se determinó mediante un método validado que incluía la hidrólisis cuantitativa de la muestra y el análisis mediante cromatografía de intercambio iónico con detección electroquímica. Los resultados (expresados como fracciones molares) se compararon con los intervalos de referencia.

15

**Tabla 2.** Contenido de aminoácidos del patrón amplio

Aminoácido	Fracción molar	intervalo de fracción molar
L-Glu	0,138	0,129 - 0,153
L-Ala	0,434	0,392 - 0,462
L-Tyr	0,096	0,086 - 0,100
L-Lys	0,331	0,300 - 0,374

20 Los resultados indican que la composición del patrón amplio se encuentra dentro de los límites de especificación indicados para el acetato de glatirámero.

#### **Ejemplo 3**

#### 25 Análisis de SEC-MALS-UV del patrón amplio

La MWD del patrón amplio se analizó mediante un sistema de SEC modular de detectores múltiples. El sistema cromatográfico era un módulo Alliance 2695 LC de Waters (Milford, MA, EE.UU.) equipado con dos detectores en línea: un fotómetro de MALS Dawn DSP-F de Wyatt Technology Corp. (Santa Bárbara, CA, EE.UU.) y un detector de matriz de diodos UV 996 de Waters, usado como detector de concentración. La configuración de este sistema de SEC de detectores múltiples se realizó en serie en el siguiente orden: Alliance - UV - MALS.

30

El espectro UV del acetato de glatirámero presenta un desnivel a 220 nm, debido a la absorción de enlaces de péptidos (transición  $n-\pi^*$ ) y cadenas laterales aromáticas de L-tirosina (transición  $\pi-\pi^*$ ). Por consiguiente, se supuso que la concentración en masa de la muestra era proporcional a la señal de UV a 220 nm.

35

Los análisis se realizaron en las siguientes condiciones cromatográficas:

- columna: BioSep SEC-s2000 (tamaño de poro: 145 Å; tamaño de partícula: 5 µm; dimensiones: 7,8 x 300 mm) de Phenomenex;
- fase móvil: fosfato de sodio acuoso 0,2 M, pH 3,0;
- temperatura: 35 °C;
- desgasificador: vacío;
- caudal: 0,5 ml/min;
- volumen de inyección: 50 µl;
- concentración de muestra: 3,0 mg/ml;
- detección: UV a 220 nm;
- intervalo de adquisición de datos: 1 segundo;
- soporte lógico de adquisición y elaboración de MALS: Astra 4.73.04, de Wyatt Technology Corp. El fotómetro de MALS Dawn DSP-F es un detector de dispersión de luz de intensidad elástica o estática o total. El MALS Dawn DSP-F usa un láser de He-Ne polarizado verticalmente ( $\lambda = 632,8$  nm) y mide simultáneamente la intensidad de la luz dispersada en 15 localizaciones angulares fijas que varían, en tampones acuosos, de 14,5 ° a 158,3 °. La constante de calibración de MALS se calculó usando tolueno como patrón, para lo que se supuso un factor de Rayleigh  $R(q) = 1,406 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ . La normalización de los fotodiodos se realizó mediante la medición de la intensidad de dispersión de un patrón de MW estrecho (pululano,  $M_p = 12,0$  kg/mol,  $M_w/M_n < 1,03$ ,  $R_g = 2,1$  nm), que se consideró un dispersor isotrópico.

50

El análisis de datos de MALS requiere una medición preliminar del incremento del índice de refracción específico ( $dn/dc$ ) del polímero con respecto al disolvente. El valor de  $dn/dc$  se midió fuera de línea mediante el uso de un refractómetro diferencial Chromatix KMX-16. A 35 °C, el valor de  $dn/dc$  de las muestras (solución de acetato de

60

glatirámero en fase móvil) fue de 0,186 ml/g.

Análisis de datos y caracterización del patrón amplio

5 La masa molar absoluta del copolímero se determinó en cada incremento de volumen usando el procedimiento de gráfico de Zimm. En este procedimiento, se supone que la señal de dispersión de luz es proporcional a la masa molar y la concentración de muestra (p/v) en cualquier punto del cromatograma. Los cálculos se realizaron a través del soporte lógico Astra 4.73.04, de Wyatt Technology Corp.

10 Debido a la diferente sensibilidad de los detectores de UV y MALS, la relación de señal respecto a ruido en las extremidades del cromatograma (parte frontal y cola) es, en general, insuficiente y la precisión de los resultados de M no es adecuada (véase la Figura 4). Por tanto, los datos experimentales se dividieron en dos regiones: 1) una "buena región de datos", en la que la relación de señal respecto a ruido fue excelente, que era sustancialmente la parte central del cromatograma; 2) parte frontal y cola del cromatograma. Los puntos experimentales de la buena región de datos estaban dotados de una función lineal:  
15  $\text{Log } M = A_0 + A_1V$

La buena región de datos se seleccionó considerando el mayor número de puntos experimentales que cumplieron con las siguientes condiciones:

- coeficiente de determinación:  $R^2 > 0,99$ ;
- error típico:  $SE < 0,02$ .

20 Se seleccionaron volúmenes de elución entre 6,267 ml y 9,433 ml (un intervalo de datos grande que contiene 381 puntos experimentales).

La curva de calibración resultante (véase la Figura 4) se caracteriza por los siguientes parámetros:

- intercepción:  $A_0 = 5,9239$ ;
- pendiente:  $A_1 = -0,2386$ ;
- coeficiente de determinación:  $R^2 = 0,9933$ ;
- error típico:  $SE = 0,0181$ .

35 La curva de calibración se usó para determinar la MWD acumulativa y diferencial del patrón amplio (véanse las Figuras 5 y 6). La MWD acumulativa también se tabuló mediante la indicación de los valores de MW para las fracciones en peso acumulativas especificadas (véase la Tabla 3). Esta tabla se consideró como el certificado de análisis del patrón amplio y se usó para la calibración de un sistema de SEC convencional (véase el Ejemplo 4).

**Tabla 3.** MWD acumulativa del patrón amplio

40

Porcentaje de área	Peso molecular
1	25.000
5	18.800
10	15.800
20	12.500
30	10.500
40	8.950
50	7.760
60	6.690
70	5.750
80	4.860
90	3.860
95	3.170
99	1.990

Comparación del patrón amplio con el fármaco enumerado de referencia

45 Un lote de Copaxone® se caracterizó mediante el método descrito anteriormente y se comparó con el patrón amplio de la invención. La comparación de las dos curvas de calibración (véase la Figura 7) indica que la relación entre el volumen de elución (o el tiempo de retención) y el peso molecular hallada para el patrón amplio es comparable a la hallada para Copaxone®. Esto es consistente con los resultados de CD (véase el Ejemplo 2), que mostraron similitud con las estructuras de orden superior de los dos copolímeros.

**50 Ejemplo 4**

Análisis de muestras de acetato de glatirámero

- 5 Las muestras y el patrón amplio (sólidos o soluciones inyectables) se diluyeron a 3,0 mg/ml con el tampón de elución y se analizaron en un sistema de cromatografía de líquidos Prominence LC-20AB equipado con un detector de UV visible SPD-20A (ambos de Shimadzu Corporation). Los análisis se realizaron en las mismas condiciones cromatográficas descritas en el Ejemplo 3. La adquisición del cromatograma y el análisis de datos se realizaron a través del soporte lógico Clarity Chromatography Station - GPC Extension (de DataApex).
- 10 En el cromatograma del patrón amplio, el soporte lógico calcula el área total en el pico de glatirámero y el área acumulativa en cada punto como un porcentaje del total. A continuación, identifica los puntos en el cromatograma que corresponden al porcentaje de fracciones enumeradas en la tabla del patrón amplio y asigna los MW enumerados en la tabla a los tiempos de retención correspondientes ( $T_R$ ). A continuación, se construye la curva de calibración mediante el ajuste de log MW en comparación con  $T_R$  a una función lineal.
- 15 En cada cromatograma de muestra, el soporte lógico calcula el área total en el pico de glatirámero y el área acumulativa en cada punto como un porcentaje del total. Mediante la aplicación de la curva de calibración, el soporte lógico asigna el MW( $M_i$ ) correspondiente a cada punto en el pico de glatirámero y calcula los siguientes parámetros:
- 20 -- peso molecular promedio en pico,  $M_p$ ;
- peso molecular promedio en número,  $M_n = \Sigma(N_i M_i) / \Sigma M_i = \Sigma H_i / \Sigma(H_i / M_i)$ ;
- peso molecular promedio en peso,  $M_w = \Sigma(N_i M_i^2) / \Sigma(N_i M_i) = \Sigma(H_i M_i) / \Sigma H_i$ ;
- 25 en los que  $N_i$  es el número de moléculas con masa molar  $M_i$  y  $H_i$  es la respuesta del detector en el punto  $i$ -ésimo del cromatograma;
- dispersión,  $D = M_w / M_n$ ;
- 30 -- los pesos moleculares correspondientes a los siguientes valores del área acumulativa: 2,5, 16,0, 84,0, 97,5 por ciento ( $M_{2,5}$ ,  $M_{16}$ ,  $M_{84}$ ,  $M_{97,5}$ ).
- 35 La curva de calibración se usó para calcular los parámetros de MWD de seis lotes de RLD (véase la Tabla 2). Estos parámetros se usaron después para la evaluación de los criterios de aceptación para la elección de lotes de acetato de glatirámero adecuados para uso farmacéutico.

**Tabla 4.** Parámetros de MWD de seis lotes de RLD de Copaxone®

Lote	$M_p$	$M_n$	$M_w$	D	$M_{2,5}$	$M_{16}$	$M_{84}$	$M_{97,5}$
X06251	7.038	6.643	8.758	1,32	20.841	12.802	4.350	2.736
X06611	7.972	7.230	9.594	1,33	22.521	14.143	4.696	2.920
X06771	7.263	7.030	8.996	1,28	20.653	13.001	4.689	3.048
X07181	7.446	6.856	8.977	1,31	20.617	13.137	4.540	2.838
P63037	7.450	6.928	9.251	1,34	22.224	13.628	4.497	2.788
X07341	8.131	7.152	9.526	1,33	21.942	14.079	4.674	2.838

40

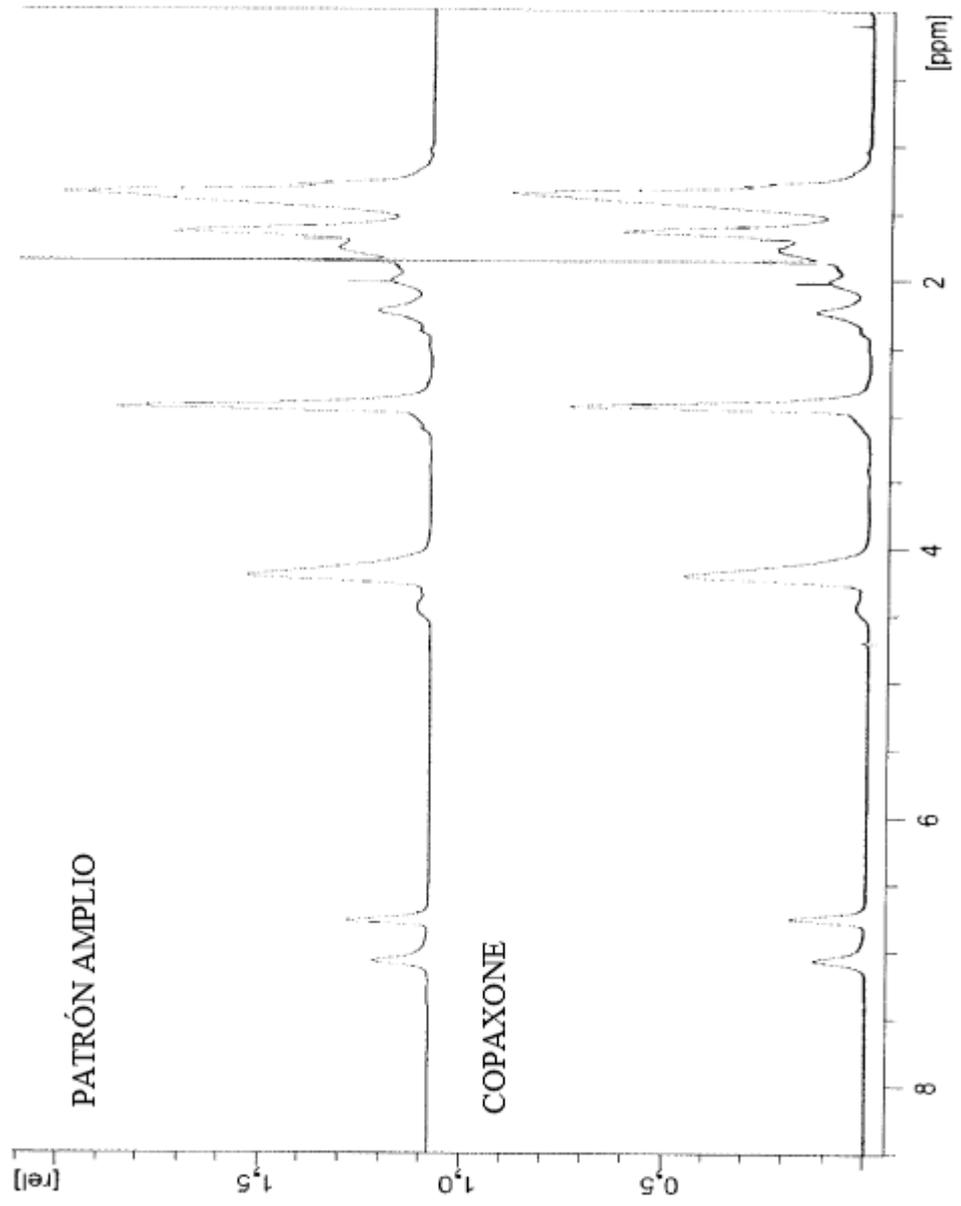
## REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación de la distribución de peso molecular del acetato de glatirámico, método que comprende someter el acetato de glatirámico a cromatografía de exclusión por tamaño, en el que la columna cromatográfica se calibra mediante el uso de un patrón de distribución de peso molecular amplio que consiste en una mezcla de polipéptidos (b) que tiene una distribución de peso molecular absoluto conocida, cuyos polipéptidos comprenden ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, en el que, en la mezcla de polipéptidos (b), el intervalo de fracción molar del ácido L-glutámico es de 0,129-0,153, el de la L-alanina es de 0,392-0,462, el de la L-tirosina es de 0,086-0,100 y el de la L-lisina es de 0,300-0,374 y en el que la mezcla de polipéptidos (b) tiene una distribución de peso molecular acumulativa, tal como se indica en la siguiente tabla:

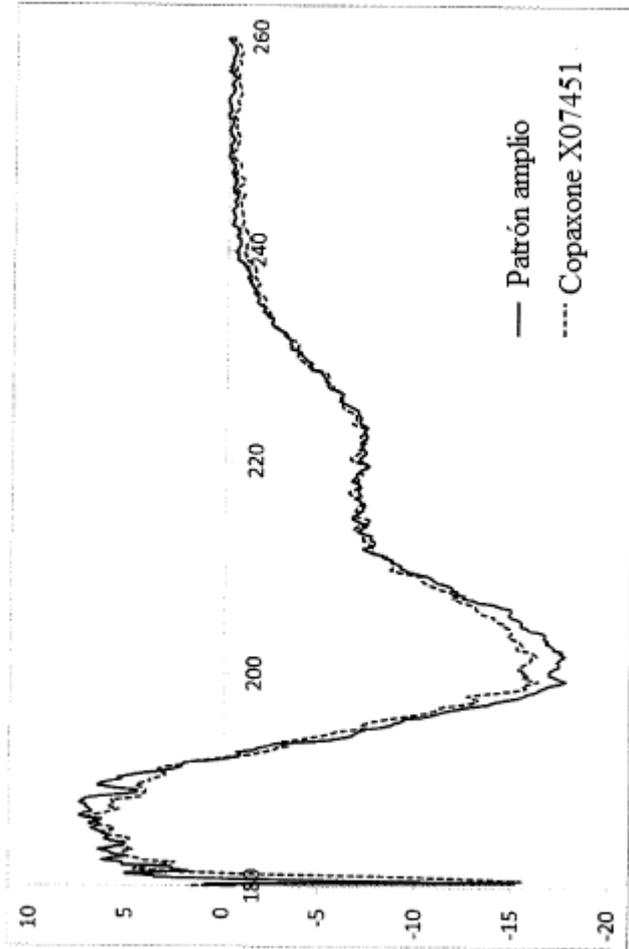
Porcentaje de área	Peso molecular
1	25.000
5	18.800
10	15.800
20	12.500
30	10.500
40	8.950
50	7.760
60	6.690
70	5.750
80	4.860
90	3.860
95	3.170
99	1.990

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la distribución de peso molecular absoluto de dicha mezcla de polipéptidos (b) comprende al menos un peso molecular seleccionado de: masa molar promedio en número, masa molar promedio en peso, masa molar promedio en Z y distribución de peso molecular acumulativa.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la distribución de peso molecular absoluto de dicha mezcla de polipéptidos (b) comprende la masa molar promedio en número, la masa molar promedio en peso y la masa molar promedio en Z.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la determinación de la distribución de peso molecular de dicha mezcla de polipéptidos (a) comprende la determinación de al menos un peso molecular seleccionado de: masa molar promedio en número, masa molar promedio en peso, masa molar promedio en Z y distribución de peso molecular acumulativa.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la determinación de la distribución de peso molecular de dicha mezcla de polipéptidos (a) comprende la determinación de la masa molar promedio en número, la masa molar promedio en peso y la masa molar promedio en Z.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha columna cromatográfica está rellena con un gel de polímero hidrófilo o un gel de sílice recubierto de hidrófilo, preferentemente dicho gel de sílice recubierto de hidrófilo es un gel de sílice enlazado a gliceropropilo.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha columna cromatográfica está equipada con un detector de concentración, preferentemente un detector de UV.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la distribución de peso molecular absoluto de la mezcla de polipéptidos (b) se determina mediante SEC-MALS.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la distribución de peso molecular absoluto de la mezcla de polipéptidos (b) se determina mediante SEC-MALS-UV o SEC-MALS-RI, preferentemente mediante SEC-MALS-UV.
10. El método de la reivindicación 1, en el que, en la mezcla de polipéptidos (b), la fracción molar del ácido L-glutámico es de aproximadamente 0,138, la de la L-alanina es de aproximadamente 0,434, la de la L-tirosina es de aproximadamente 0,096 y la de la L-lisina es de aproximadamente 0,331.

**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

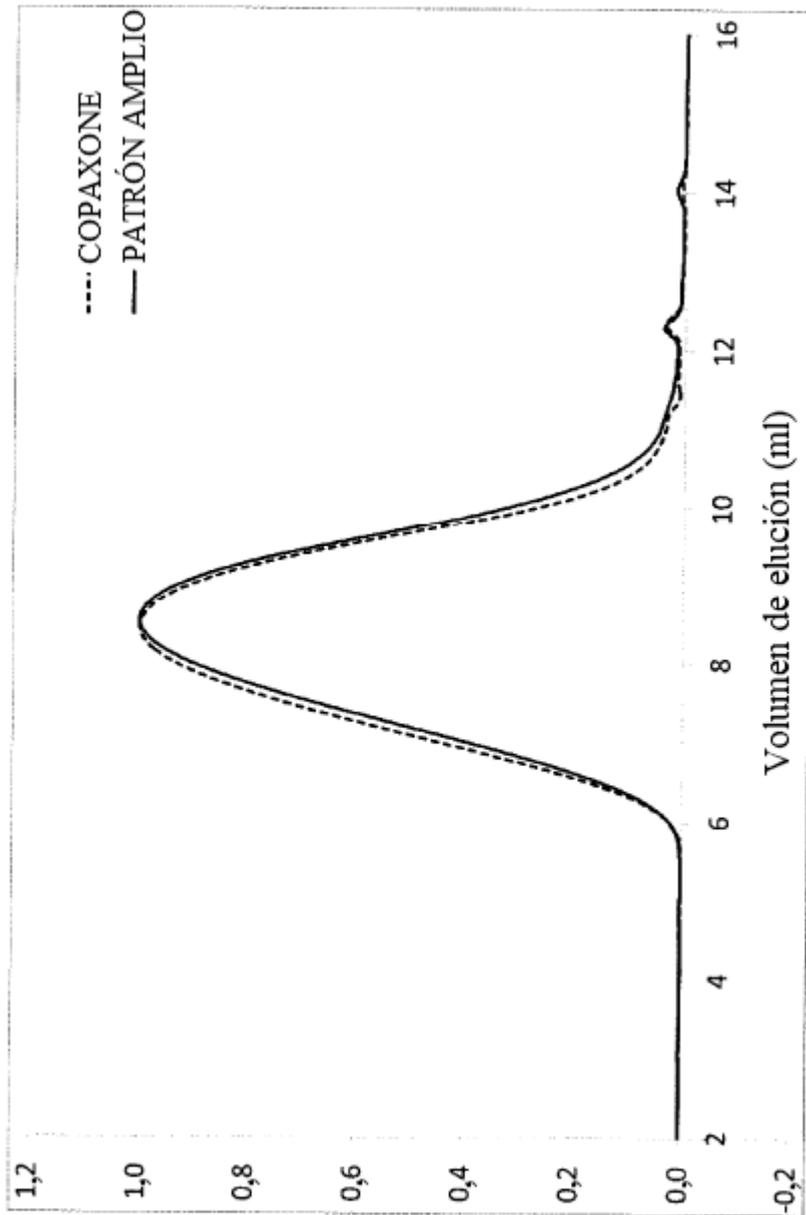
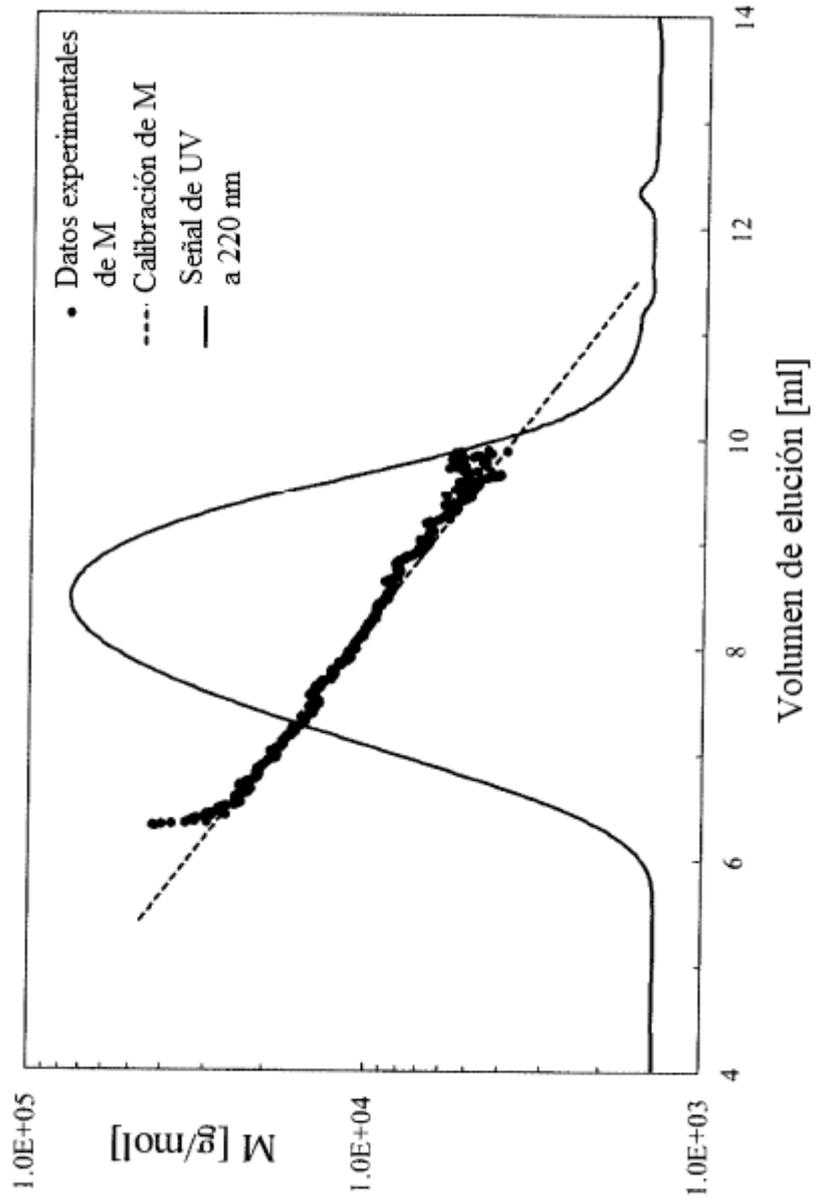
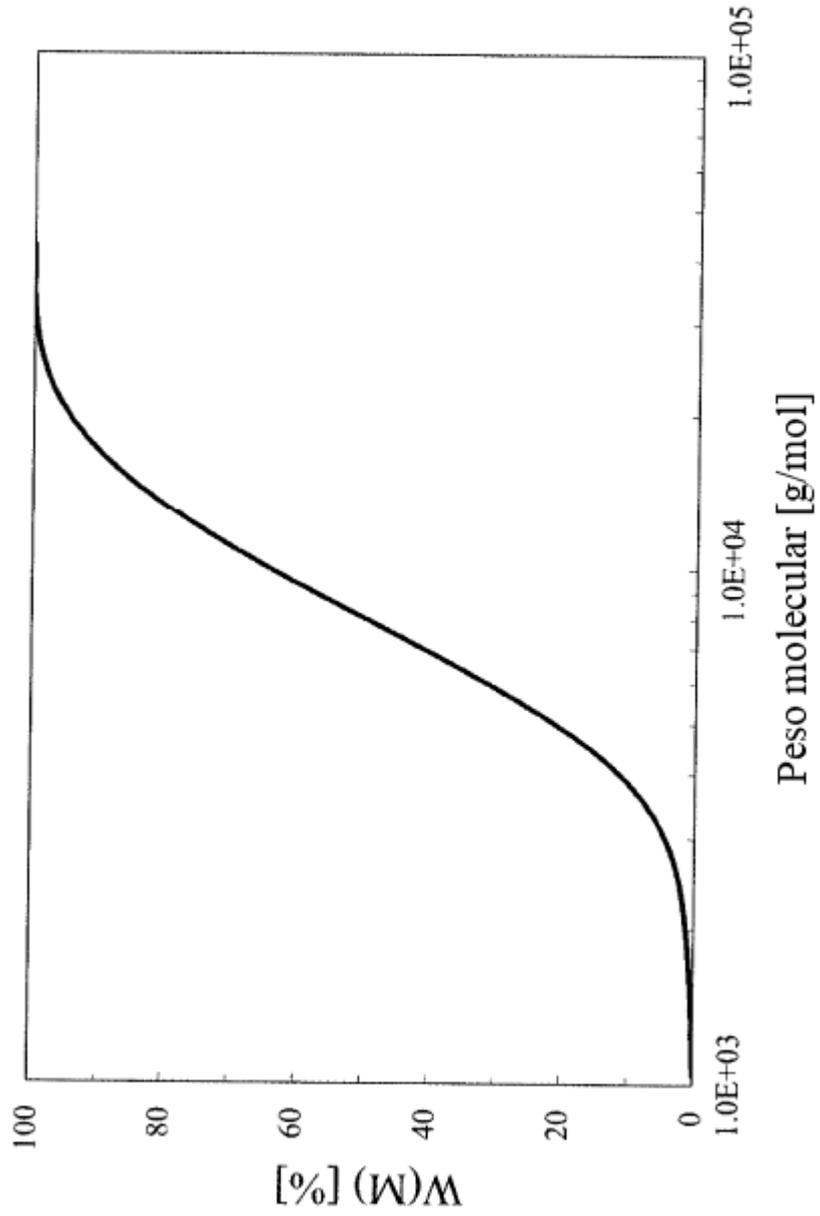


Figura 4



**Figura 5**



**Figura 6**

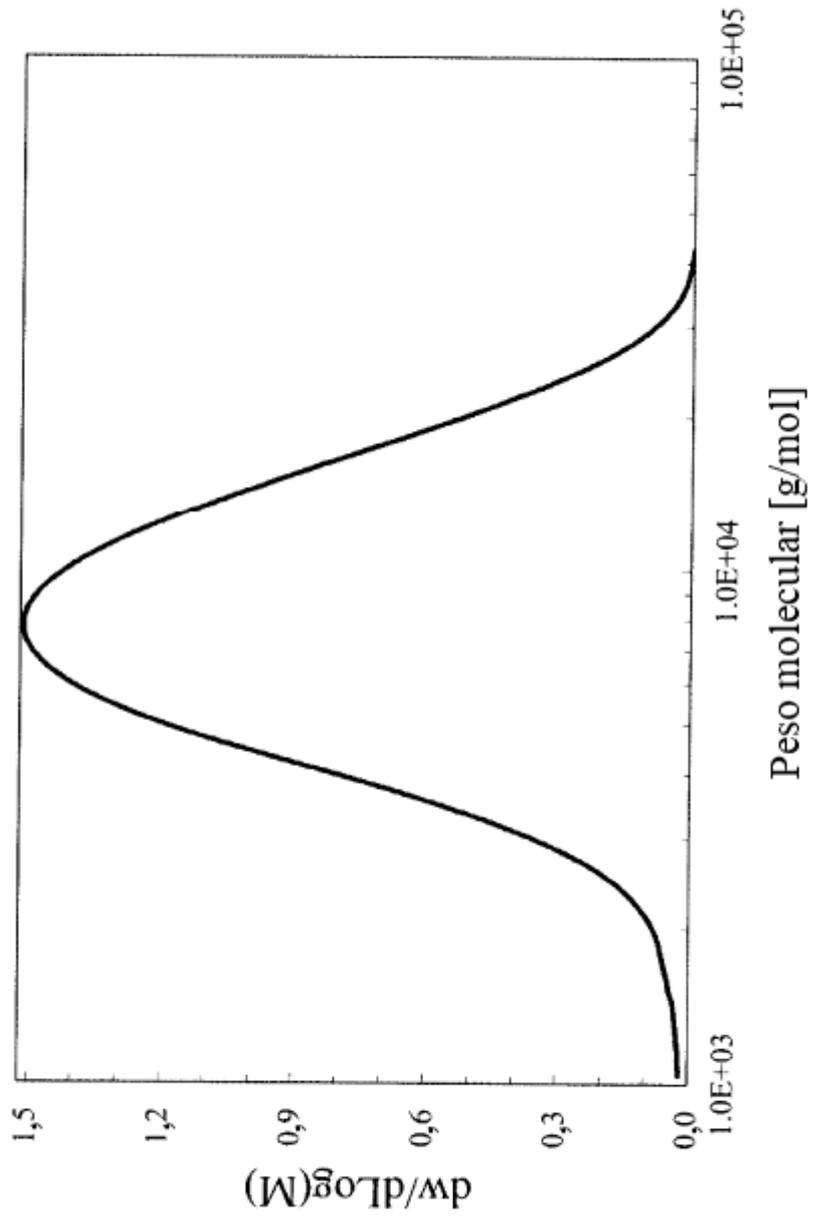


Figura 7

