

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 865**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2009 PCT/US2009/037637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009 WO09129018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2009 E 09733444 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **28.09.2022 EP 2277050**

54 Título: **Análisis de composiciones de copolímeros de aminoácidos**

30 Prioridad:

16.04.2008 US 45465 P

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

18.11.2022

73 Titular/es:

**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1125 Trenton-Harbourton Road
Titusville, New Jersey 05860, US**

72 Inventor/es:

**ZHU, XIANGPING;
SHRIVER, ZACHARY;
JIANG, YANJIE;
BAUER, CORINNE;
ANDERSON, JAMES, ERIC y
AHERN, PETER, JAMES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

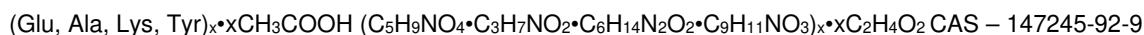
ES 2 449 865 T5

DESCRIPCIÓN

Análisis de composiciones de copolímeros de aminoácidos

Antecedentes

5 El acetato de glatiramer (conocido también como copolímero-1 y comercializado como el ingrediente activo en COPAXONE® por Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Israel) se utiliza en el tratamiento de la forma recurrente-remitente de la esclerosis múltiple (RRMS). De acuerdo con la etiqueta del producto COPAXONE®, el acetato de glatiramer (GA) está constituido por las sales acetato de polipéptidos sintéticos, que contienen cuatro aminoácidos existentes naturalmente: ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina con una fracción molar media consignada de 0,141, 0,427, 0,095, y 0,338, respectivamente. Químicamente, el acetato de glatiramer se designa como polímero de ácido L-glutámico con L-alanina, L-lisina, L-tirosina, acetato (sal). Su fórmula estructural es:



El documento WO 2006/029393 da a conocer métodos de selección, preparación y análisis de glatiramer.

15 EP 1.408.066 da a conocer un copolímero de bloques de alta pureza que es apto para ser utilizado como portador después del transporte de una medicina y un método de determinación cuantitativa para impurezas contenidas en el copolímero de bloques.

El artículo por Hartmann et al., Origins of Life, 1984, vol. 1-4, página 213-220, da a conocer una síntesis de péptidos mediada por carbodiimida en solución acuosa.

Sumario de la invención

20 La invención está basada, en la identificación y caracterización del ácido L-piroglutámico (piro-Glu) como firma estructural del acetato de glatiramer (GA). El análisis de este componente firma de GA es útil para evaluar la calidad del producto y del proceso en la fabricación de GA.

25 Se describe en esta memoria un método de selección de un lote de GA, comprendiendo el método: proporcionar un lote de GA; medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) en el lote; y seleccionar el lote si la cantidad de piro-Glu en el lote es 2000 - 7000 ppm. En este método, como en los otros métodos descritos en esta memoria, el paso de medición puede emplear cualquier método adecuado. Al medir la cantidad de piro-Glu, es posible, , medir la concentración de piroGlu en una muestra o la cantidad total de piro-Glu en la muestra. Sin embargo, una cantidad de piro-Glu se mide y cualesquiera unidades se utilizan para expresar la cantidad medida, la concentración de piro-Glu en el lote seleccionado está comprendida entre 2000 y 7000 ppm (en algunos casos entre 2500 y 6500 ppm) sobre una base de peso-seco/peso-seco.

30 Se describe también un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende: proporcionar un lote de GA, medir la cantidad de piro-Glu en el lote; y preparar una composición farmacéutica que comprende al menos una porción del lote si la cantidad de piro-Glu en el lote está dentro de un intervalo predeterminado como se define en las reivindicaciones. En este caso, asimismo, el paso de medición puede emplear cualquier método adecuado y las unidades utilizadas para expresar la cantidad medida de piro-Glu pueden ser cualesquiera unidades adecuadas (p.ej., ppm o porcentaje en moles de cadenas). Sin embargo, el piro-Glu se mide y siempre que las unidades se utilicen para expresar la cantidad medida, la concentración de piro-Glu en el lote seleccionado está comprendida entre 2000 y 7000 ppm (en algunos casos entre 2500 y 6500 ppm); sobre una base de peso-seco/peso-seco.

40 Un lote de GA puede ser la totalidad o parte del producto de un proceso de fabricación de GA (p.ej., la totalidad o una parte de una sola operación de fabricación). En algunos casos, se analiza un solo lote. En algunos casos, se analizan dos o más lotes. En algunos casos, se analizan muestras múltiples tomadas de un solo lote. La composición que contiene GA puede ser una sustancia fármaco (DS) (conocida también como un ingrediente farmacéutico activo (API)), un producto fármaco (DP), o un compuesto intermedio de proceso.

45 Se describe también un método para preparación de una composición farmacéutica que comprende acetato de glatiramer, que comprende: polimerizar N-carboxianhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico protegido con bencilo, ácido trifluoroacético (TFA) protegido con L-lisina y L-tirosina para generar un copolímero protegido; tratar el copolímero protegido hasta despolimerizar parcialmente el copolímero protegido, desproteger los grupos protegidos con bencilo y desproteger las lisinas protegidas con TFA para generar acetato de glatiramer, y purificar el acetato de glatiramer, que comprende medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) en el acetato de glatiramer purificado, comprendiendo adicionalmente: seleccionar el acetato de glatiramer purificado para uso en la preparación de una composición farmacéutica si la cantidad de piro-Glu en el acetato de glatiramer purificado está dentro de un intervalo predeterminado como se define en las reivindicaciones. La concentración de piro-Glu en el acetato de glatiramer purificado seleccionado es 2000-7000 ppm o 2500-6500 ppm.

50 Se describe también un método para preparación de una composición farmacéutica que comprende acetato de glatiramer, comprendiendo el método: polimerizar N-carboxi-anhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico protegido con

bencilo, L-lisina y L-tirosina protegidas con ácido trifluoroacético (TFA) para generar un copolímero protegido; tratar el copolímero protegido para despolimerizar parcialmente el copolímero protegido y desproteger los grupos protegidos con bencilo, desprotegiendo asimismo las lisinas protegidas con TFA para generar acetato de glatiramer; y purificar el acetato de glatiramer, que comprende medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) durante o después del paso de polimerización.

Se describe en esta memoria un método para preparar una composición farmacéutica que comprende acetato de glatiramer, comprendiendo el método: polimerizar N-carboxi-anhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico protegido con bencilo, L-lisina y L-tirosina protegidas con ácido trifluoroacético (TFA), para generar un copolímero protegido; tratar el copolímero protegido para despolimerizar parcialmente el copolímero protegido y desproteger los grupos protegidos con bencilo, desprotegiendo además las lisinas protegidas con TFA para generar acetato de glatiramer; y purificar el acetato de glatiramer, que comprende: medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) durante o después del paso de despolimerización parcial.

Los métodos mencionados anteriormente para la preparación de una composición farmacéutica comprenden adicionalmente: medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) en el acetato de glatiramer purificado; seleccionar el acetato de glatiramer purificado para uso en la preparación de una composición farmacéutica si la cantidad de piro-Glu en el acetato de glatiramer purificado está dentro de un intervalo predeterminado como se define en las reivindicaciones; y preparar una composición farmacéutica que comprende al menos una porción del acetato de glatiramer purificado seleccionado. En diversas realizaciones, la concentración de piro-Glu en el acetato de glatiramer purificado seleccionado es 2000-7000 ppm o 2500-6500 ppm.

Se describe en esta memoria un método para preparación de una composición farmacéutica que comprende acetato de glatiramer, que comprende: polimerizar N-carboxi-anhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico protegido con bencilo, L-lisina y L-tirosina protegidas con ácido trifluoroacético (TFA) para generar un copolímero protegido; tratar el copolímero protegido para despolimerizar parcialmente el copolímero protegido y desproteger los grupos protegidos con bencilo y desprotegiendo asimismo las lisinas protegidas con TFA para general acetato de glatiramer; y purificar el acetato de glatiramer, comprendiendo: medir la cantidad de alcohol bencílico durante o después del paso de despolimerización parcial, en donde la cantidad de alcohol bencílico es correlativa a la cantidad de piro-Glu.

El paso de medición de la cantidad de piro-Glu en un lote o muestra puede incluir cualquier método para medición (cualitativa o cuantitativamente) de la cantidad de piro-Glu y puede incluir pasos y procesos múltiples. Así, el paso de medición puede incluir, por ejemplo: medición directa del copolímero, fraccionamiento por tamaños del copolímero, digestión del copolímero, o escisión del copolímero. La medición puede estar basada, por ejemplo, en la cantidad total de piro-Glu o en la concentración de piro-Glu o en el porcentaje de péptidos copolímeros que incluyen un piro-Glu. La cantidad medida puede expresarse en cualesquiera unidades convenientes, p.ej., en peso, porcentaje en peso o ppm (medidas todas ellas en peso seco, es decir, peso seco total de piro-Glu en la muestra/peso seco total de la muestra), o porcentaje en moles de cadenas peptídicas. Debe tenerse en cuenta que, dado que el porcentaje en moles de cadenas y el porcentaje en peso de cadenas están relacionados por el peso molecular medio del copolímero, es posible realizar una conversión entre estos valores si se conoce, se estima o se supone el peso molecular medio. No obstante, el valor preciso del porcentaje en moles calculado de las cadenas dependerá de si el valor del peso molecular medio utilizado es un peso molecular medio numérico (Mn), peso molecular medio ponderado (Mw) o peso molecular medio pico (Mp). Si bien pueden utilizarse en los cálculos Mw, Mp o Mn, es preferible utilizar Mn. Cualquiera que sea el método que se utilice para medir piro-Glu en el lote o muestra, y cualesquiera que sean las unidades que se utilicen para expresar el piro-Glu medido en el lote o muestra, la concentración de piro-Glu en el lote seleccionado está comprendida entre 2000 y 7000 ppm ($\text{peso}_{\text{piro-Glu}}/\text{peso}_{\text{total}} \times 10^6$).

El paso de medición puede comprender proporcionar un valor (p.ej., en unidades tales como ppm, porcentaje de cadenas peptídicas) para la cantidad de piro-Glu en el lote, y comparar opcionalmente el valor con un valor de referencia (p.ej., una especificación para puesta a la venta comercial de un producto copolímero).

En el caso en que el valor de la cantidad de piro-Glu en un lote de acetato de glatiramer tenga una relación preseleccionada con el valor de referencia, el método puede incluir clasificar, seleccionar, aceptar, desechar, liberar, o retener un lote de acetato de glatiramer; reprocesar un lote por un paso de fabricación previo; procesar un lote de acetato de glatiramer en un producto fármaco, transportar el producto procedente de un lote de acetato de glatiramer, mover el lote de acetato de glatiramer a una localización nueva; o formular, etiquetar, envasar, vender, ofrecer para venta, o poner a la venta un lote de acetato de glatiramer en el comercio.

El método puede comprender: digerir una muestra de la composición con una peptidasa o proteasa (p.ej., piroglutamato-amino-peptidasa, una endopeptidasa, y tripsina), comparar los productos de digestión con un estándar de referencia de piro-Glu, y evaluar la cantidad de piro-Glu en la muestra con relación al estándar de referencia, analizando con ello una composición que comprende acetato de glatiramer. En algunos casos, los productos de digestión se separan por un proceso cromatográfico antes de comparar la digestión con un estándar de referencia de piro-Glu. Así pues, el paso de comparación puede incluir un método cromatográfico (p.ej., cromatografía líquida, particularmente HPLC) para separar los componentes y el análisis por espectrometría de masas (MS) o análisis por absorbancia UV para detectar la cantidad de diversos componentes.

En algunos casos, el paso de medición de piro-Glu en el lote comprende: digerir una muestra con una peptidasa o una proteasa; aislar el piro-Glu presente en la muestra digerida; y medir la cantidad de piro-Glu aislado. El paso de aislamiento puede comprender un método cromatográfico (p.ej., cromatografía líquida, particularmente HPLC). El paso de medición puede comprender análisis por espectrometría de masas (MS) o análisis por absorbancia UV.

- 5 El paso de medición puede comprender medir la absorbancia UV (p.ej., a 180-250 nm, 200 nm o 210 nm). El paso de aislamiento puede comprender un método cromatográfico (p.ej., cromatografía líquida, particularmente HPLC). El paso de determinación puede comprender análisis por espectrometría de masas (MS). El paso de aislamiento puede comprender HPLC y el paso de medición puede comprender análisis por absorbancia UV. El paso de aislamiento puede comprender cromatografía líquida y el paso de medición puede comprender análisis por espectrometría de masas (MS).

En algunos casos, el contenido de piro-Glu de la preparación de acetato de glatiramer está entre 2500-6500 ppm, p.ej., entre 3000-6000 ppm, p.ej., entre 3300-4400 ppm. En algunos casos, el contenido de piro-Glu del copolímero o preparación de acetato de glatiramer es menor que 7000 ppm, p.ej., menor que 6000 ppm, menor que 5000 ppm, menor que 4000 ppm, menor que 3000 ppm.

- 15 Como se utiliza en esta memoria, un "copolímero", "copolímero de aminoácidos" o "preparación de copolímero de aminoácidos" es una mezcla heterogénea de polipéptidos que comprende una pluralidad definida de aminoácidos diferentes (típicamente entre 2 y 10, p.ej., entre 3 y 6 aminoácidos diferentes). Un copolímero puede prepararse por la polimerización de aminoácidos individuales. El término "aminoácido" no está limitado a aminoácidos existentes naturalmente, sino que puede incluir derivados de aminoácidos y/o análogos de aminoácidos. Por ejemplo, en un copolímero de aminoácidos que comprende aminoácidos de tirosina, uno o más de los aminoácidos puede ser una homotirosina. Adicionalmente, se incluye dentro de esta definición un copolímero de aminoácidos que tiene uno o más enlaces no peptídicos o peptidomiméticos entre dos residuos adyacentes. Un polímero es no uniforme con respecto al peso molecular de cada especie de polipéptido contenida en la mezcla.

Breve descripción de las figuras

- 25 La Figura 1 muestra la liberación de alanina a partir de dipéptidos después de tratamiento con HBr/ácido acético. A = Ala = alanina; E = ácido glutámico; K = lisina; Y = tirosina. Todos los dipéptidos se prepararon a una concentración de 10 mM. Dos dipéptidos (A-A-NH₂ y A-Y-NH₂) estaban amidados en el término C.

La Figura 2 es una traza LC-MS que muestra un aminoácido no usual con peso residual de 111 Da ("X") en el término N de un péptido derivado de Copaxone® digerida con tripsina. Lys = lisina; Ala = alanina.

- 30 La Figura 3 muestra la estructura del ácido L-piroglutámico (piro-Glu)-acetato de glatiramer (GA).

Descripción detallada de la invención

- Además del peso molecular y la composición de aminoácidos, que se especifican en la etiqueta aprobada para el producto, la etiqueta y otra literatura disponible para Copaxone® no proporciona información detallada acerca de las características fisicoquímicas del producto. Basándose en la caracterización detallada del producto y la cinética del proceso, los autores de la invención han encontrado inesperadamente un componente de firma de GA, ácido L-piroglutámico (piro-Glu)-GA, que puede evaluarse para valorar el proceso de fabricación de GA y la calidad del producto. En particular, la evaluación del contenido de piro-Glu puede identificar diferencias en los materiales que no se observan examinando el peso molecular y la composición de aminoácidos solos. Por evaluación del contenido de piro-Glu de una muestra de un copolímero, p.ej., GA, pueden identificarse composiciones de copolímero no conformes. De acuerdo con ello, puede utilizarse el contenido de piro-Glu para evaluar la calidad del producto y el proceso para GA.

- La producción de GA implica tanto polimerización de aminoácidos como despolimerización parcial de los péptidos resultantes. Se ha encontrado ahora que la despolimerización es sumamente específica y no-estocástica y tiene lugar en una proporción desproporcionadamente alta hacia el lado N-terminal de los residuos glutamato. Indirectamente, esto da como resultado GA de piro-Glu como característica estructural de firma de GA, ocurriendo de modo sorprendente fundamentalmente como consecuencia de la despolimerización. Piro-Glu está presente en GA en una proporción de 2000-7000 ppm y puede evaluarse para identificar o evaluar GA y su método de fabricación, y/o para evaluar la calidad o idoneidad de un producto GA para uso farmacéutico.

Métodos para fabricación de acetato de glatiramer

Generalmente, el proceso para la fabricación de acetato de glatiramer incluye tres pasos:

- 50 Paso (1): polimerización de N-carboxi-anhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico protegido con bencilo, L-lisina y L-tirosina protegidas con ácido trifluoroacético (TFA) (a los que se hace referencia colectivamente como NCAs) para dar como resultado un copolímero protegido;

Paso (2): despolimerización y desprotección con bencilo del copolímero protegido utilizando ácido bromhídrico en ácido acético, y

Paso (3): desprotección de las lisinas protegidas con TFA en los copolímeros del producto seguida por purificación y secado de la sustancia fármaco aislada.

En el Paso (1) del método de fabricación, los NCAs se copolimerizan en una ratio predeterminada utilizando dietilamina como iniciador. Después del consumo de los componentes NCA, la mezcla de reacción se enfría rápidamente en agua. El polímero protegido resultante (Compuesto Intermedio -1) se aísla y se seca. En el Paso (2), el polímero protegido (Compuesto Intermedio -1) se trata con HBr anhidro al 33% en ácido acético (HBr/AcOH). Esto da como resultado la escisión del grupo protector bencilo en el ácido glutámico, así como la escisión de los enlaces peptídicos a todo lo largo del polímero, dando como resultado un producto parcialmente despolimerizado (Compuesto Intermedio -2) con un peso molecular reducido con relación al polímero Compuesto Intermedio -1 parental. Después de enfriar rápidamente la mezcla de reacción con agua fría, el polímero producido se aísla por filtración y se lava con agua. El material del Compuesto Intermedio -2 se seca antes de proceder al Paso (3). En el Paso (3), el Compuesto Intermedio -2 se trata con piperidina acuosa para eliminar el grupo trifluoroacetilo en la lisina. El copolímero resultante (Compuesto Intermedio -3) se purifica subsiguientemente utilizando diafiltración/ultrafiltración y la sal acetato resultante se seca para producir la sustancia fármaco Acetato de Glatiramer.

Métodos para la fabricación de acetato de glatiramer se han descrito en las publicaciones siguientes: Pat. U.S. Núm. 3.849.550; WO 95/031990 y US 2007/0021324.

Química de proceso del método de síntesis y caracterización estructural de GA

Al estudiar la química de polimerización/despolimerización utilizando compuestos peptídicos modelo para modelar el proceso de síntesis para la producción de GA, los inventores han encontrado que existen ciertas reglas asociadas con la química. Desarrollando una comprensión de estas reglas, es evidente que GA no es una mezcla estocástica o aleatoria de péptidos. En lugar de ello, existen ciertos atributos que se conservan de lote a lote y pueden medirse a fin de monitorizar y evaluar el proceso y la calidad de los lotes.

Específicamente, el estudio de la cinética del paso de despolimerización del proceso de fabricación de GA utilizando compuestos peptídicos modelo reveló que la despolimerización del Paso 2 ocurre a niveles desproporcionadamente altos en el lado N-terminal de los residuos glutamato. En los compuestos modelo, la única escisión apreciable se encontraba en el lado N-terminal de los residuos glutamato (Figura 1). En el proceso de fabricación de Acetato de Glatiramer, la escisión ocurre en todos los residuos, pero con un sesgo hacia el lado N-terminal de los residuos glutamato. Adicionalmente, se encontró un aminoácido modificado, identificado como ácido piro-glutámico (piro-Glu), en péptidos trípticos de muestras de Copaxone®. El análisis de partes alícuotas retiradas del paso de despolimerización en diversos momentos y procesadas posteriormente para producir GA reveló que la cantidad de piro-Glu en los términos amino aumenta a medida que aumenta el tiempo de despolimerización. Así pues, de modo sorprendente, el nivel de piro-Glu en el producto GA final es fundamentalmente una consecuencia de la cinética de despolimerización y no se explica exclusivamente por la química de polimerización. A partir de esta comprensión de la química de la síntesis de GA, y de la caracterización del producto resultante, se ha descubierto por tanto que piro-Glu es una característica estructural de firma del acetato de glatiramer. La formación de piro-Glu es resultado de: (1) parámetros concernientes a la reacción de polimerización, así como, de modo sorprendente e inesperado, (2) parámetros relacionados con la reacción de despolimerización. De acuerdo con ello, piro-Glu puede evaluarse y monitorizarse en la fabricación de GA (con inclusión de la sustancia fármaco o producto fármaco final) a fin de, p.ej., (i) identificar GA, (ii) evaluar la calidad del GA (p.ej., en un lote de GA), y/o (iii) evaluar o confirmar la calidad del proceso de fabricación de GA.

Métodos de medición de piro-Glu

Dado que piro-Glu se forma durante el proceso de fabricación de GA, su presencia y nivel proporcionan información útil en relación con la química de GA y la calidad del producto.

Se describen en esta memoria ciertos métodos para medición del contenido de piro-Glu en una composición que incluye GA. Sin embargo, debe entenderse que pueden utilizarse también otros métodos para medir piro-Glu.

Un método analítico desarrollado y descrito en esta memoria para la medición del contenido de piro-Glu está basado en la escisión enzimática de un residuo piroglutamato N-terminal utilizando piroglutamato-aminopeptidasa (p.ej., de arqueobacterias termófilas, *Pyrococcus furiosus*). La cantidad de piro-Glu en el hidrolizado enzimático resultante puede analizarse por una técnica adecuada, tal como cromatografía líquida en fase inversa, a fin de determinar las ppm o el % pp de piro-Glu en una muestra de GA. Este método no requiere conocimiento de la longitud media de cadena o el peso molecular medio del GA en la composición. De acuerdo con ello, las ppm o el % pp de piro-Glu es una expresión preferida de la cantidad de piro-Glu en un lote o una muestra de copolímero, p.ej., GA.

Pueden utilizarse diversos métodos para determinar el porcentaje de cadenas peptídicas que llevan piro-Glu en una muestra de GA. Una determinación de % en moles o porcentaje de cadenas portadoras de piro-Glu requiere una determinación del tamaño molecular medio o la longitud media de cadena. El tamaño molecular puede evaluarse, p.ej., por SEC MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser multiángulo). La longitud media de la cadena puede computarse p.ej., por marcación (p.ej., con un marcador radiactivo o fluorescente) de los términos

amino libres con una molécula que puede cuantificarse directamente. Un método analítico desarrollado y descrito en esta memoria para medición del porcentaje de cadenas peptídicas que llevan piro-Glu implica combinar la degradación cuantitativa de Edman con eliminación enzimática de piro-Glu. Un análisis de este tipo puede implicar: 1) cuantificar los aminoácidos N-terminales en una muestra de GA antes de tratamiento para eliminar piro-Glu; y 2) cuantificar los aminoácidos N-terminales en una muestra de GA después de tratamiento para eliminar piro-Glu.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Cinética de despolimerización del método de fabricación de acetato de glatiramer

Para investigar la cinética de la despolimerización, se estudió la reacción de diversos compuestos modelo dipeptídicos con HBr/AcOH. La Figura 1 muestra la liberación de alanina por dipéptidos después de tratamiento con HBr/ácido acético como se realiza en el Paso 2 del proceso de fabricación. Todos los dipéptidos se prepararon a una concentración de 10 mM. Dos dipéptidos (A-A-NH₂ y A-Y-NH₂) estaban amidados en el término C. Como se muestra en la Figura 1, la liberación de alanina se observaba únicamente para A-E (OBn), lo que indicaba que los dipéptidos con Glu(OBn) en la posición C-terminal demuestran la escisión máxima a lo largo del curso de tiempos de reacción de 24-48 horas comparados con los dipéptidos sin Glu en la posición C-terminal. Así pues, la despolimerización ocurre en una proporción apreciable únicamente en el lado N-terminal de los residuos glutamato en estos sistemas modelo. En el proceso de fabricación actual para acetato de glatiramer, ocurre escisión en todos los residuos, pero se muestra todavía un sesgo importante para el lado N-terminal de los residuos glutamato.

Ejemplo 2: Presencia de estructuras N-terminales de piro-Glu

La digestión con tripsina de Copaxone[®] seguida por análisis LC-MS identificaba péptidos esperados que contienen cada uno de los aminoácidos A, E, K e Y. Adicionalmente, se encontraban también péptidos inesperados. Se observaba un aminoácido no usual (m/z 111) con peso residual de 111 Da en el término N de varios péptidos inesperados de este tipo derivados de Copaxone[®] digerida con tripsina (marcada como "X", Figura 2). A partir del análisis LC-MS/MS se determinó que el aminoácido no usual es piro-Glu, formado por ciclación de ácido glutámico N-terminal para formar ácido piroglutámico perdiendo una molécula de agua [111 Da = 129 Da (residuo de ácido glutámico) - 18 Da (H₂O)]. La Figura 3 muestra la estructura de ácido L-piro-glutámico (piro-Glu) GA.

Ejemplo 3: Evaluación del contenido de piro-Glu basada en peso

Este ejemplo describe un método para evaluación del contenido de piro-Glu en una composición de copolímero.

Un método analítico desarrollado para ensayo del contenido de piro-glutamato está basado en la escisión enzimática de un residuo piro-glutamato N-terminal utilizando piro-glutamato-aminopeptidasa (de arqueobacterias termófilas, *Pyrococcus furiosus*). El piro-glutamato en el hidrolizado enzimático resultante se aísla por cromatografía líquida en fase inversa seguida por detección a 200 nm utilizando una curva estándar de referencia preparada con concentraciones conocidas de L-piro-glutamato. Se ensaya neurotensina (un polipéptido disponible comercialmente que tiene 100% de piro-glutamato en el término N) como control para asegurar la aceptabilidad de la digestión y la adecuación de la separación por HPLC. El análisis cromatográfico se realiza utilizando una columna HPLC Waters Atlantis C18 y una fase móvil isocrática constituida por 100% agua, ajustada a pH 2,1 con ácido fosfórico. Las muestras y los estándares se mantienen a 2-8°C. El pico correspondiente al resto piro-glutamato se eluye en un tiempo de retención de aproximadamente 12 minutos. La medida directa del contenido de piro-glutamato se realiza sobre una base de p/p, y los resultados se expresan como ppm (microgramos/gramo).

Ejemplo 4: Evaluación del contenido de piro-Glu en un porcentaje basado en cadenas peptídicas

El porcentaje de cadenas peptídicas en una muestra de GA portadora de piro-Glu puede medirse como alternativa a la medición de la cantidad de piro-Glu en una muestra de GA. El porcentaje de cadenas peptídicas que llevan piro-Glu puede determinarse por combinación de la degradación cuantitativa de Edman con eliminación enzimática de piro-Glu. Así pues, el análisis implica: 1) cuantificación de los aminoácidos N-terminales en una muestra de GA antes del tratamiento para eliminar piro-Glu; y 2) cuantificación de los aminoácidos N-terminales en una muestra de GA después de tratamiento para eliminar piro-Glu.

Se utilizó una reacción de degradación de Edman para cuantificar los aminoácidos N-terminales en una muestra de GA antes y después del tratamiento con piroglutamato-aminopeptidasa (PA) para eliminar piro-Glu. Esta reacción se realizó manualmente para evitar limitaciones cuantitativas de los secuenciadores automáticos de péptidos N-terminales. Los resultados de este análisis se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 1: Aminoácido N-terminal

| Aminoácido | nmol de aminoácido N-terminal | |
|------------|---|---|
| | Antes del tratamiento con PA (desv. std.) | Después del tratamiento con PA (desv. std.) |
| Ala | 25,1 (0,6) | 51,7 (0,5) |
| Glu | 7,8 (0,3) | 15,7 (0,1) |
| Lys | 9,0 (0,2) | 20,2 (0,8) |
| Tyr | 6,5 (0,1) | 10,5 (0,2) |
| Total | 48,4 | 98,1 |

Como se puede ver en la Tabla 1 anterior, la concentración de aminoácido N-terminal aumentaba desde 48,4 a 98,1 nmoles después del tratamiento con PA. Esto es debido a que la eliminación de piro-Glu permite la detección de péptidos que no podrían haber sido detectados previamente por la degradación Edman. El porcentaje de cadenas que llevan piro-Glu puede calcularse como sigue: % cadenas protegidas terminalmente por piroglutamato = $(P_{\text{después}} - P_{\text{antes}}) / P_{\text{después}} \times 100\%$. En este cálculo, P_{antes} y $P_{\text{después}}$ son las concentraciones de aminoácidos N-terminales con y sin tratamiento de PA, respectivamente. En este ejemplo, el 51% de las cadenas de polímero estaban protegidas terminalmente por piroglutamato.

10 Ejemplo 5: El contenido de Piro-Glu puede distinguir el acetato de glatiramer

Utilizando el método descrito en el Ejemplo 3, se comparó el contenido de piro-Glu de Copaxone® comercial con varias otras muestras de copolímero. Una muestra de acetato de glatiramer (M-GA) preparada de acuerdo con el método descrito en la Patente U.S. Núm. 3.849.550 se evaluó respecto a contenido de piro-Glu. La Tabla 2, siguiente, proporciona los resultados del análisis de cierto número de composiciones, estando conforme esta muestra con el intervalo encontrado para el contenido de piro-Glu a partir de un muestreo de lotes de Copaxone®, o entre 2500-6500 ppm.

Tabla 2: Análisis de las muestras

| Análisis de las muestras | | | |
|---|--------------------------|--|--------------------------------|
| Muestra | Peso Molecular (Mp) (Da) | Composición de Aminoácidos (fracción molar media) ² | Contenido de P-Glu (ppm) |
| Copaxone® | 5.000-9.000 ¹ | 0,141 Ácido L-glutámico 0,427 L-alanina 0,095 L-tirosina 0,338 L-lisina | 2.500 – 6.500 ppm ⁴ |
| Muestra de acetato de glatiramer (M-GA) | 8.407 (conforme) | (conforme) ³ | 4900 ppm (conforme) |
| Muestra desviada A | 6.579 (conforme) | (conforme) ³ | 8.200 ppm (falla) |
| Muestra desviada B | 4.808 (falla) | (conforme) ³ | 7.500 ppm (falla) |

¹ Intervalo de pesos moleculares especificados en la etiqueta del producto Copaxone® e información de prescripción

² Diana de la fracción molar media especificada en la etiqueta del producto Copaxone® e información de prescripción

³ Está de acuerdo con relación al intervalo de especificación basado en la diana de etiqueta más permisividad de fabricación y variabilidad de medición

⁴ El intervalo es 75%/125% de Copaxone® min/máx para 30 muestras comerciales

20 Para testar la aptitud del contenido de piro-Glu a fin de distinguir el acetato de glatiramer de los copolímeros no conformes, se testaron dos copolímeros de control. Los copolímeros de control se produjeron con desviaciones deliberadas y específicas en la temporización de la adición de NCA o en la duración del paso 2. Como se presenta en la Tabla 1, ambas muestras desviadas A y B estaban fuera del rango para contenido de piro-Glu determinado para

5 Copaxone®. La muestra A estaba dentro del rango para el peso molecular y la composición de aminoácidos de Copaxone®, mientras que la muestra B fallaba en peso molecular pero estaba conforme en la composición de aminoácidos. Este dato muestra que la evaluación del contenido de piro-Glu puede identificar diferencias en materiales y proceso no observadas por examen exclusivo del peso molecular y la composición de aminoácidos, e ilustra la aptitud de la medida de piro-Glu para identificar copolímeros no conformes. De acuerdo con ello, el contenido de piro-Glu puede utilizarse para evaluar la calidad del producto y el proceso para acetato de glatiramer.

REIVINDICACIONES

1. Un método de selección de un lote de acetato de glatiramer, comprendiendo el método:
 - proporcionar un lote de acetato de glatiramer;
 - medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) en el lote; y
 - seleccionar el lote si la cantidad de piro-Glu en el lote es 2000 – 7000 ppm, seleccionando con ello un lote de acetato de glatiramer.

2. Un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende acetato de glatiramer, comprendiendo el método:
 - proporcionar un lote de acetato de glatiramer;
 - medir la cantidad de piro-Glu en el lote;
 - seleccionar el lote para uso en la preparación de una composición farmacéutica si la cantidad de piro-Glu en el lote está dentro de un intervalo predeterminado; y
 - preparar una composición farmacéutica que comprende al menos una porción del lote seleccionado, en donde la concentración de piro-Glu en el lote seleccionado es 2000-7000 ppm.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende la medición de piro-Glu en al menos una primera y una segunda muestra del lote.

4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el paso de medición de piro-Glu en el lote comprende:
 - digerir una muestra con una peptidasa o una proteasa para generar una muestra digerida;
 - aislar el piro-Glu presente en la muestra digerida; y
 - determinar la cantidad de piro-Glu aislada.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el paso de aislamiento comprende un método cromatográfico.

6. Un método para preparar una composición farmacéutica que comprende acetato de glatiramer, que comprende:
 - polimerizar N-carboxi-anhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico protegido con bencilo, L-lisina y L-tirosina protegidas con ácido trifluoroacético (TFA) para generar un copolímero protegido;
 - tratar el copolímero protegido para despolimerizar parcialmente el copolímero protegido y desproteger los grupos protegidos con bencilo y desproteger las lisinas protegidas con TFA a fin de generar acetato de glatiramer;
 - purificar el acetato de glatiramer;
 - medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) en el acetato de glatiramer purificado, y
 - seleccionar el acetato de glatiramer purificado para uso en la preparación de una composición farmacéutica si la cantidad de piro-Glu en el acetato de glatiramer purificado es 2000-7000 ppm.

7. Un método para preparación de una composición farmacéutica que comprende acetato de glatiramer, que comprende:
 - polimerizar N-carboxi-anhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico protegido con bencilo, L-lisina y L-tirosina protegidas con ácido trifluoroacético (TFA) para generar un copolímero protegido;
 - tratar el copolímero protegido para despolimerizar parcialmente el copolímero protegido y desproteger los grupos protegidos con bencilo y desproteger las lisinas protegidas con TFA a fin de generar acetato de glatiramer;
 - purificar el acetato de glatiramer;
 - medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) durante o después del paso de polimerización;
 - medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) en el acetato de glatiramer purificado;
 - seleccionar el acetato de glatiramer purificado para uso en la preparación de una composición farmacéutica si la cantidad de piro-Glu en el acetato de glatiramer purificado es 2000-7000 ppm; y
 - preparar una composición farmacéutica que comprende al menos una porción del acetato de glatiramer purificado seleccionado.

8. Un método para preparación de una composición farmacéutica que comprende acetato de glatiramer, que comprende:
 - polimerizar N-carboxi-anhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico protegido con bencilo, L-lisina y L-tirosina protegidas con ácido trifluoroacético (TFA) para generar un copolímero protegido;
 - tratar el copolímero protegido para despolimerizar parcialmente el copolímero protegido y desproteger los grupos protegidos con bencilo y desproteger las lisinas protegidas con TFA a fin de generar acetato de glatiramer;
 - purificar el acetato de glatiramer;
 - medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) durante o después del paso de despolimerización parcial;

ES 2 449 865 T5

medir la cantidad de piro-glutamato (piro-Glu) en el acetato de glatiramer purificado;
seleccionar el acetato de glatiramer purificado para uso en la preparación de una composición farmacéutica si la cantidad de piro-Glu en el acetato de glatiramer purificado es 2000-7000 ppm; y
preparar una composición farmacéutica que comprende al menos una porción del acetato de glatiramer purificado seleccionado.

5

FIGURA 1

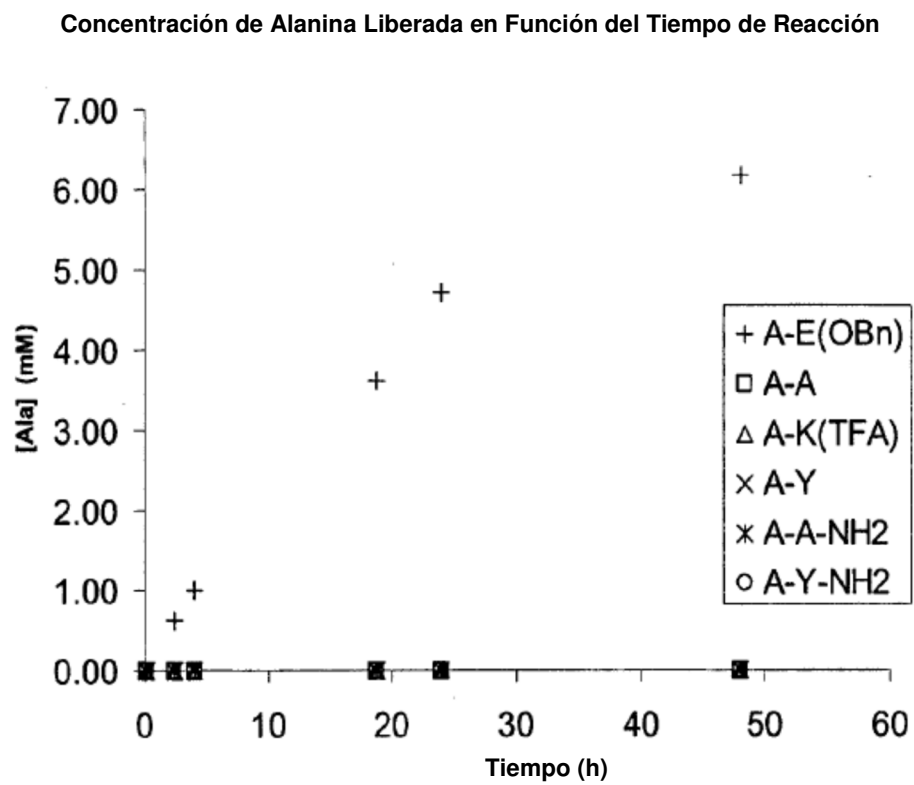


FIGURA 2

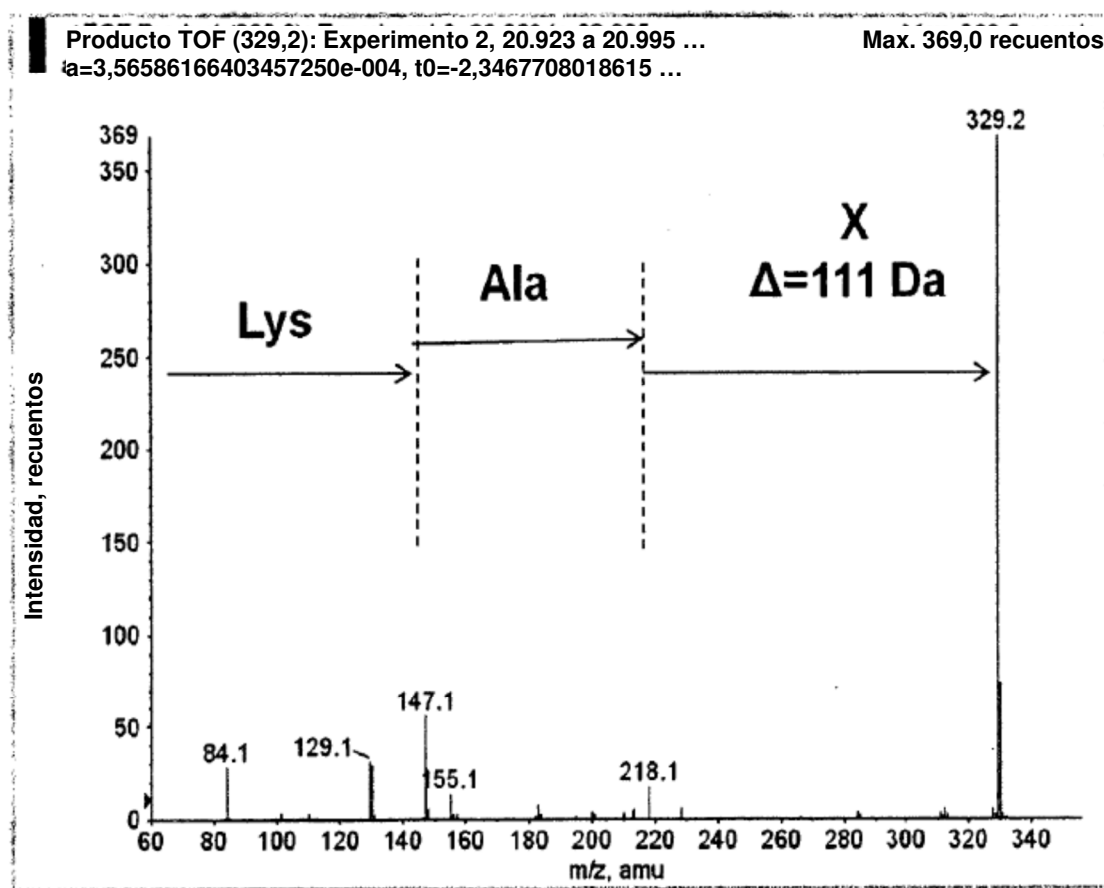


FIGURA 3

