



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101166754 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 23

(21) 申请号 200580033851. 5

(22) 申请日 2005. 09. 09

(30) 优先权数据

60/608, 843 2004. 09. 09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2007. 04. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2005/032395 2005. 09. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02006/029393 EN 2006. 03. 16

(73) 专利权人 特瓦制药工业有限公司

地址 以色列佩塔科-蒂科瓦

(72) 发明人 本-蔡恩·多利特兹凯

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C07K 1/00 (2006. 01)

C07K 1/14 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1152874 A, 1997. 06. 25, 说明书第 1-2 页, 实施例 3-4.

US 20040091956 A1, 2004. 05. 13, 全文.

W0 96/32119 A1, 1996. 10. 17, 说明书 3-4 页, 9 页第 3 段, 11 页 11-23 行.

审查员 李影

权利要求书3页 说明书12页

(54) 发明名称

使用纯化的氢溴酸制备多肽混合物的方法

(57) 摘要

本发明提供获得具有不均一氨基酸序列的多肽的混合物的改善的方法, 其中每种多肽基本上由丙氨酸, 谷氨酸, 酪氨酸和赖氨酸组成, 其中所述得到的多肽的混合物包含少于 0. 3% 的溴化的酪氨酸和少于 1000ppm 的金属离子杂质。

1. 获得不是都具有相同氨基酸序列的三氟乙酰基多肽的混合物的方法,其中每种多肽由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成,其中所述混合物具有需要的平均分子量并且其中在所述方法中,每种由丙氨酸, γ -苄基谷氨酸,酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成的多肽的混合物的批次用氢溴酸的乙酸溶液进行去保护,其改进包括使用氢溴酸的乙酸溶液,所述溶液包含少于0.5%的游离溴。

2. 一种获得药物组合物的方法,所述药物组合物包含不是都具有相同氨基酸序列的多肽的混合物,其中每种多肽都由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和赖氨酸组成,并且其中所述混合物具有需要的平均分子量,所述方法包括:

a) 聚合酪氨酸、丙氨酸、 γ -苄基谷氨酸和N-三氟乙酰基赖氨酸的N-羧酸酐以形成被保护的多肽的混合物;

b) 用包含少于0.5%的游离溴和少于1000ppm金属离子杂质的氢溴酸的乙酸溶液对所述被保护的多肽进行去保护,以形成三氟乙酰基多肽的混合物;

c) 使所述三氟乙酰基多肽的混合物与水性哌啶反应以形成多肽的水性混合物的溶液,其中每种所述多肽都由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和赖氨酸组成;

和

d) 纯化所述多肽的混合物。

3. 权利要求2的方法,其还包括使步骤d)的产物进行超滤从而去除具有少于5000道尔顿分子量的多肽种类。

4. 权利要求1的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液是在乙酸中的10%-36%的氢溴酸(w/w)。

5. 权利要求4的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液是在乙酸中的33%的氢溴酸(w/w)。

6. 权利要求2的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液是在乙酸中的10%-36%的氢溴酸(w/w)。

7. 权利要求6的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液是在乙酸中的33%的氢溴酸(w/w)。

8. 权利要求3的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液是在乙酸中的10%-36%的氢溴酸(w/w)。

9. 权利要求8的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液是在乙酸中的33%氢溴酸(w/w)。

10. 权利要求1-9中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液用苯酚预处理。

11. 权利要求1-9中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于2000APHA。

12. 权利要求11的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于1000APHA。

13. 权利要求12的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于700APHA。

14. 权利要求13的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于500APHA。

15. 一种制备药物组合物的方法,所述药物组合物包含不是都具有相同氨基酸序列的多肽的混合物,其中每种多肽都由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和赖氨酸组成,其中所述混合物具有预定比例的可接受被包含在药物组合物中的溴化的酪氨酸,所述方法包括

获得具有不一致的氨基酸序列的多肽的混合物的批次,其中每种多肽由谷氨酸,丙氨酸,酪氨酸和赖氨酸组成;

通过下列方法测量所述批次中的溴化酪氨酸的百分比,所述方法包括:

a) 水解所述批次以获得水解产物;

- b) 通过色谱柱洗脱所述水解产物；
- c) 测量在所述水解产物中的溴酪氨酸的水平；
- d) 制备溴酪氨酸和所述批次的氨基酸成分的标准样品溶液；
- e) 通过步骤 b) 的柱洗脱所述标准样品溶液；

和

- f) 计算在所述批次中的溴化酪氨酸的百分比；

和仅在所述药物组合物中包括这样的批次，其中这样测量的溴化的酪氨酸的百分比少于 0.3 重量 %。

16. 权利要求 15 的方法，其中可接受被包含在所述药物组合物中的批次仅仅是其中这样测量的溴化的酪氨酸的百分比少于 0.2 重量 % 的批次。

17. 权利要求 16 的方法，其中可接受被包含在所述药物组合物中的批次仅仅是其中这样测量的溴化的酪氨酸的百分比少于 0.1 重量 % 的批次。

18. 一种包含三氟乙酰基醋酸格拉默和载体的组合物，其中所述三氟乙酰基醋酸格拉默具有需要的平均分子量，不多于 0.1 重量 % 的溴化的酪氨酸和少于 1000ppm 的金属离子杂质。

19. 一种包含醋酸格拉默的药物组合物，其中所述醋酸格拉默具有需要的平均分子量，不多于 0.1 重量 % 的溴化的酪氨酸，和少于 1000ppm 的金属离子杂质。

20. 权利要求 18-19 中任一项的组合物，其中所述三氟乙酰基醋酸格拉默或所述醋酸格拉默具有 4,700-11,000 道尔顿的平均分子量。

21. 权利要求 18 的组合物，其中所述三氟乙酰基醋酸格拉默具有少于 500ppm 的金属离子杂质。

22. 权利要求 18 的组合物，其中所述三氟乙酰基醋酸格拉默具有少于 100ppm 的金属离子杂质。

23. 权利要求 18 的组合物，其中所述三氟乙酰基醋酸格拉默具有少于 30ppm 的金属离子杂质。

24. 权利要求 18 的组合物，其中所述三氟乙酰基醋酸格拉默具有少于 20ppm 的金属离子杂质。

25. 权利要求 18 的组合物，其中所述三氟乙酰基醋酸格拉默具有少于 10ppm 的金属离子杂质。

26. 权利要求 18 的组合物，其中所述三氟乙酰基醋酸格拉默无金属离子杂质。

27. 一种生产三氟乙酰基醋酸格拉默的混合物的方法，其中所述混合物具有需要的平均分子量，所述方法包括用氢溴酸的乙酸溶液对每种由丙氨酸， γ -苄基谷氨酸，酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成的多肽的混合物进行去保护，所述溶液包含少于 0.5% 的游离溴和少于 1000ppm 的金属离子杂质。

28. 一种制备醋酸格拉默的方法，其包括下列步骤：

a) 聚合酪氨酸、丙氨酸、 γ -苄基谷氨酸和 N-三氟乙酰基赖氨酸的 N-羧酸酐以形成被保护的醋酸格拉默；

b) 用氢溴酸的乙酸溶液来对被保护的醋酸格拉默进行去保护，所述溶液包含少于 0.5% 的游离溴和少于 1000ppm 的金属离子杂质，以形成三氟乙酰基醋酸格拉默；

- c) 使三氟乙酰基醋酸格拉默与水性哌啶反应来形成醋酸格拉默的溶液 ;和
- d) 纯化所述醋酸格拉默。

29. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液包含少于 500ppm 的金属离子杂质。

30. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液包含少于 100ppm 的金属离子杂质。

31. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液包含少于 30ppm 的金属离子杂质。

32. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液包含少于 20ppm 的金属离子杂质。

33. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液包含少于 10ppm 的金属离子杂质。

34. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液无金属离子杂质。

35. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 2000APHA。

36. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 1000APHA。

37. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 700APHA。

38. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 500APHA。

39. 权利要求 27-28 中任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液在非金属反应器中产生。

40. 权利要求 27-28 任一项的方法,其中所述氢溴酸的乙酸溶液在玻璃衬里或聚四氟乙烯衬里的反应器中制备。

使用纯化的氢溴酸制备多肽混合物的方法

[0001] 贯穿本申请,将各种出版物充分引用作为参考。这些出版物的公开内容全部特此结合于本申请作为参考以更充分地描述与本发明相关的现有技术。

[0002] 发明背景

[0003] 被称作醋酸格拉默 (Glatiramer acetate) (GA) 的、不是都具有相同氨基酸序列的多肽混合物在商标名 Copaxone® 下进行市售,其包括这样的多肽的醋酸盐,所述多肽分别以 0.141,0.427,0.095 和 0.338 的平均摩尔级分包含 L- 谷氨酸, L- 丙氨酸, L- 酪氨酸, 和 L- 赖氨酸。Copaxone® 的平均分子量为 4,700-11,000 道尔顿 (" Copaxone ", 内科医师必读, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115.)。在化学上,醋酸格拉默被称为含有 L- 丙氨酸, L- 赖氨酸, L- 酪氨酸的 L- 谷氨酸聚合物,醋酸盐 (盐)。它的结构式是:

[0004] $(\text{Glu, Ala, Lys, Tyr})_x \cdot \text{XCH}_3\text{COOH}$

[0005] $(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3)_x \cdot \text{XC}_2\text{H}_4\text{O}_2$

[0006] CAS-147245-92-9

[0007] (" Copaxone ", 内科医师必读, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115.)。

[0008] 醋酸格拉默被批准用于在患有间歇复发型多发性硬化的患者中减少复发的频率。多发性硬化被归类为自体免疫性疾病。还已经公开了将醋酸格拉默用于治疗其它自体免疫疾病 (R. Aharoni 等的公开号 US2002/0055466 A1), 炎性非自体免疫疾病 (V. Wee Yong 等的公开号 US2005/0014694 A1; 和公开于 2002 年 6 月 20 日的美国专利申请号 2002/0077278 A1, (Young 等)), 并且用于促进神经再生和 / 或防止或抑制继发性, 所述继发性可以接着原发性神经系统损伤发生 (M. Eisenbach-Schwartz 等的公开号 US 2003/0004099 A1; 和公开于 2002 年 3 月 28 日的美国专利申请号 2002/0037848 (Eisenbach-Schwartz))。此外, 公开了将醋酸格拉默用于治疗免疫介导疾病 (例如, 授权于 2003 年 2 月 4 日的美国专利号 6,514,938 B1, (Gad 等)); 公布于 2001 年 8 月 23 日的 PCT 国际公开号 WO 01/60392, (Gilbert 等); 和公布于 2000 年 5 月 19 日的 PCT 国际公开号 WO 00/27417, (Aharoni 等) 以及与脱髓鞘作用相关的疾病 (公布于 2001 年 12 月 27 日的 PCT 国际公开号 WO-1/97846, (Moses 等))。

[0009] 在上述专利中详细描述的制作方法包括使被保护的多肽与在乙酸中的 33% 氢溴酸反应 (1998 年 9 月 1 日授权于 Konfino, 等的美国专利号 5,800,808)。这种去保护反应将 γ 苄基保护基从谷氨酸残基的 5- 羧酸酯上去除, 并且将所述聚合物裂解为更小的多肽以形成三氟乙酰基多肽 (1998 年 9 月 1 日授权于 Konfino, 等的美国专利号 5,800,808)。获得介于 7,000 $\pm$ 2,000 道尔顿的正确平均分子量的 GA 所需要的时间取决于反应温度和被保护的醋酸格拉默的分子量模式 (1998 年 9 月 1 日授权于 Konfino, 等的美国专利号 5,800,808)。去保护发生在介于 20°C 和 28°C 之间的温度 (1998 年 9 月 1 日授权于 Konfino, 等的美国专利号 5,800,808)。测试反应在不同的时间阶段在每个批次上进行, 以确定在给定温度上获得正确分子量模式的三氟乙酰基多肽所需要的反应时间 (1999 年 11 月 9 日授

权于 Konfino, 等的美国专利号 5, 981, 589)。反应所需要的时间的量的范围, 例如介于 10 和 50 小时之间 (1998 年 9 月 1 日授权于 Konfino, 等的美国专利号 5, 800, 808)。此外, 美国专利号 5, 981, 589, 6, 048, 898, 6, 054, 430, 6, 342, 476, 6, 362, 161, 和 6, 620, 847 还涉及用于制备多肽的混合物, 包括 GA 的组合物和方法。

[0010] 本发明提供改善的制备方法。

[0011] 发明简述

[0012] 本发明提供获得不是都具有相同氨基酸序列的三氟乙酰基多肽的混合物的方法, 其中每种多肽基本上由丙氨酸, 谷氨酸, 酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成, 其中所述混合物具有需要的平均分子量并且其中在所述过程中, 每种基本上由丙氨酸, γ -苄基谷氨酸, 酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成的多肽的混合物的批次用氢溴酸的乙酸溶液进行去保护, 所述改善包括使用氢溴酸的乙酸溶液, 所述溶液包含少于 0.5% 的游离溴。

[0013] 本发明还提供获得不是都具有相同氨基酸序列的三氟乙酰基多肽的混合物的方法, 其中每种多肽基本上由丙氨酸, 谷氨酸, 酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成, 其中所述混合物具有需要的平均分子量并且其中在所述过程中, 每种基本上由丙氨酸, γ -苄基谷氨酸, 酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成的多肽的混合物的批次都用氢溴酸的乙酸溶液进行去保护, 所述改善包括使用氢溴酸的乙酸溶液, 所述溶液包含少于 1000ppm 的金属离子杂质。

[0014] 本发明还提供制备不是都具有相同氨基酸序列的三氟乙酰基多肽的混合物的方法, 其中每种多肽基本上都由丙氨酸, 谷氨酸, 酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成, 其中所述混合物具有需要的平均分子量, 所述方法包括用氢溴酸的乙酸溶液对每种基本上由丙氨酸, γ -苄基谷氨酸, 酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成的多肽的混合物进行去保护, 所述溶液包含少于 0.5% 的游离溴和少于 1000ppm 的金属离子杂质。

[0015] 本发明还提供包含通过本发明方法的任一种产生的三氟乙酰基产物和载体的组合物。

[0016] 本发明还提供不是都具有相同氨基酸序列的三氟乙酰基多肽的混合物, 其中每种多肽基本上都由丙氨酸, 谷氨酸, 酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成, 其中所述混合物具有需要的平均分子量, 不超过 0.1% 的溴化处理过的酪氨酸和少于 1000ppm 的金属离子杂质。本发明还提供包含三氟乙酰基多肽的混合物和载体的组合物。

[0017] 本发明还提供获得药物组合物的方法, 所述药物组合物包含不是都具有相同氨基酸序列的多肽的混合物, 其中每种多肽基本上都由丙氨酸, 谷氨酸, 酪氨酸和赖氨酸组成, 并且其中所述混合物具有需要的平均分子量, 所述方法包括

[0018] a) 聚合酪氨酸、丙氨酸、 γ -苄基谷氨酸和 N-三氟乙酰基赖氨酸的 N-羧酸酐以形成被保护的多肽的混合物;

[0019] b) 用氢溴酸的乙酸溶液来对被保护的多肽进行去保护, 所述溶液包含少于 0.5% 的游离溴和少于 1000ppm 的金属离子杂质, 以形成三氟乙酰基多肽的混合物;

[0020] c) 使三氟乙酰基多肽的混合物与水性哌啶反应来形成多肽的水性混合物的溶液, 其每种都基本上由丙氨酸, 谷氨酸, 酪氨酸和赖氨酸组成; 和

[0021] d) 纯化多肽的混合物。

[0022] 本发明还提供产生醋酸格拉默的方法, 所述方法包括下列步骤:

[0023] a) 聚合酪氨酸、丙氨酸、 γ -苄基谷氨酸和 N-三氟乙酰基赖氨酸的 N-羧酸酐以形

成被保护的醋酸格拉默；

[0024] b) 用氢溴酸的乙酸溶液来对被保护的醋酸格拉默进行去保护,所述溶液包含少于 0.5% 的游离溴和少于 1000ppm 的金属离子杂质,以形成三氟乙酰基醋酸格拉默；

[0025] c) 使三氟乙酰基醋酸格拉默与水性哌啶反应来形成醋酸格拉默的溶液；和

[0026] d) 纯化醋酸格拉默。

[0027] 本发明还提供分析在醋酸格拉默的样品中溴化的酪氨酸的百分比的方法,所述方法包括下列步骤：

[0028] a) 水解醋酸格拉默以获得水解产物；

[0029] b) 通过色谱柱洗脱水解产物；

[0030] c) 测量水解产物中的溴酪氨酸水平；

[0031] d) 制备溴酪氨酸和醋酸格拉默的氨基酸成分的样品溶液；

[0032] e) 通过步骤 b) 的柱洗脱样品溶液；和

[0033] f) 计算在醋酸格拉默中的溴化酪氨酸的百分比。

[0034] 本发明还提供制备药物组合物的方法,所述药物组合物包含不是都具有相同的氨基酸序列的多肽的混合物,其中每种多肽基本上由谷氨酸,丙氨酸,酪氨酸和赖氨酸组成,其中所述混合物具有预定比例的可接受被包含在药物组合物中的溴化的酪氨酸,所述方法包括获得具有不一致的氨基酸序列的多肽的混合物的批次,其中每种多肽基本上由谷氨酸,丙氨酸,酪氨酸和赖氨酸组成；测量通过下列方法获得的批次中的溴化酪氨酸的百分比,所述方法包括：

[0035] a) 水解所述批次以获得水解产物；

[0036] b) 通过色谱柱洗脱水解产物；

[0037] c) 测量在水解产物中的溴酪氨酸的水平；

[0038] d) 制备溴酪氨酸和所述批次的氨基酸成分的样品溶液；

[0039] e) 通过步骤 b) 的柱洗脱样品溶液；

[0040] 和

[0041] f) 计算在所述批次中的溴化酪氨酸的百分比；

[0042] 和仅在所述药物组合物中包括这样的批次,其中这样测量的溴化的酪氨酸的百分比少于 0.3%。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明提供获得并不都具有相同氨基酸序列的三氟乙酰基多肽的混合物的方法,其中每种多肽基本上由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成,其中所述混合物具有需要的平均分子量并且其中在所述过程中,每种基本上由丙氨酸,γ-苄基谷氨酸,酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成的多肽的混合物的批次用氢溴酸的乙酸溶液进行去保护,所述改善包括使用氢溴酸的乙酸溶液,所述溶液包括少于 0.5% 的游离溴。

[0045] 在一个实施方案中,所述改善还包括使用氢溴酸的乙酸溶液,其包括少于 1000ppm 的金属离子杂质。

[0046] 本发明还提供获得不是都具有相同氨基酸序列的三氟乙酰基多肽的混合物的方法,其中每种多肽基本上由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成,其中所述混合物具有需要的平均分子量并且其中在所述过程中,每种基本上由丙氨酸,γ-苄基谷氨

酸,酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成的多肽的混合物的批次用氢溴酸的乙酸溶液进行去保护,所述改善包括使用氢溴酸的乙酸溶液,所述溶液包括少于 1000ppm 的金属离子杂质。

[0047] 本发明还提供产生不是都具有相同氨基酸序列的三氟乙酰基多肽的混合物的方法,其中每种多肽基本上由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成,其中所述混合物具有需要的平均分子量,所述方法包括对每种基本上由丙氨酸, γ -苄基谷氨酸,酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成的多肽的混合物用氢溴酸的乙酸溶液进行去保护,所述溶液包括少于 0.5% 的游离溴和少于 1000ppm 的金属离子杂质。

[0048] 在一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 0.1% 的游离溴。

[0049] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 0.05% 的游离溴。

[0050] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 0.01% 的游离溴。

[0051] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 0.001% 的游离溴。

[0052] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液无游离溴。

[0053] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 1000ppm 的金属离子杂质。

[0054] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 500ppm 的金属离子杂质。

[0055] 在一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 100ppm 的金属离子杂质。

[0056] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 30ppm 的金属离子杂质。

[0057] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 20ppm 的金属离子杂质。

[0058] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液包括少于 10ppm 的金属离子杂质。

[0059] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液无金属离子杂质。

[0060] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物是三氟乙酰基醋酸格拉默("TFA GA")。

[0061] 在一个实施方案中,在乙酸溶液中的氢溴酸从在乙酸中的 10% 到 36% 氢溴酸。在另一个实施方案中,在乙酸中的氢溴酸从在乙酸中的 16% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 18% 到 33% 氢溴酸;在乙酸中的 20% 到 37% 的氢溴酸;在乙酸中的 20% 到 33% 氢溴酸;在乙酸中的 22% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 24% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 25% 到 35% 的氢溴酸;在乙酸中的 26% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 28% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 30% 到 34% 的氢溴酸;在乙酸中的 30% 到 33% 的氢溴酸;或在乙酸中的 32% 到 33% 的氢溴酸。在另一个实施方案中,所述溶液是在乙酸中的 33% 的氢溴酸。在另一个实施方案中,所述溶液是在乙酸中的 16% 氢溴酸。

[0062] 在另一个实施方案中,用溴清除剂对所述溶液进行预处理从而去除游离溴。

[0063] 在一个实施方案中,所述溴清除剂是苯酚。

[0064] 在另一个实施方案中,所述溶液在非金属反应器中产生。

[0065] 在另一个实施方案中,所述溶液在玻璃衬里(lined)或 Teflon 衬里的反应器中制备。

[0066] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 2000APHA。

[0067] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 1000APHA。

[0068] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 700APHA。

[0069] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 500APHA。

[0070] 本发明还提供通过公开的方法的任一种产生的三氟乙酰基产物。

[0071] 本发明还提供包含通过公开的方法的任一种产生的三氟乙酰基产物和载体的组合物。

[0072] 本发明还提供不是都具有相同氨基酸序列的三氟乙酰基多肽的混合物,其中每种多肽基本上都由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和三氟乙酰基赖氨酸组成,其中所述混合物具有需要的平均分子量,不多于 0.1% 的溴化的酪氨酸并且少于 1000ppm 的金属离子杂质。

[0073] 在一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物具有 2000 道尔顿到 40,000 道尔顿的平均分子量。

[0074] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物具有 4000 道尔顿到 18,000 道尔顿的平均分子量。

[0075] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物具有 4000 道尔顿到 13,000 道尔顿的平均分子量。

[0076] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物具有 13,000 道尔顿到 19,000 道尔顿的平均分子量。

[0077] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物具有 13,500 道尔顿到 18,500 道尔顿的平均分子量。

[0078] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物具有 $7,000 \pm 2,000$ 道尔顿的平均分子量。

[0079] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物具有 7,000 道尔顿的平均分子量。

[0080] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物具有 14,000 道尔顿的平均分子量。

[0081] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物具有 4,700-11,000 道尔顿的平均分子量。

[0082] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物包含少于 1000ppm 的金属离子杂质。

[0083] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物包含少于 500ppm 的金属离子杂质。

[0084] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物包含少于 100ppm 的金属离子杂质。

[0085] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物包含少于 30ppm 的金属离子杂质。

[0086] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物包含少于 20ppm 的金属离子杂质。

[0087] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物包含少于 10ppm 的金属离子杂质。

[0088] 在另一个实施方案中,三氟乙酰基多肽的混合物无金属离子杂质。

[0089] 本发明还提供包含三氟乙酰基多肽的混合物和载体的组合物。

[0090] 本发明还提供获得药物组合物的方法,所述药物组合物包含不是都具有相同的氨基酸序列的多肽的混合物,其中每种多肽基本上都由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和赖氨酸组

成,并且其中所述混合物具有需要的平均分子量,所述方法包括

[0091] a) 聚合酪氨酸、丙氨酸、 γ -苄基谷氨酸和 N-三氟乙酰基赖氨酸的 N-羧酸酐以形成被保护的多肽的水性混合物;

[0092] b) 用氢溴酸的乙酸溶液对被保护的多肽进行去保护,所述溶液包含少于 0.5% 的游离溴和少于 1000ppm 的金属离子杂质,以形成三氟乙酰基多肽的水性混合物;

[0093] c) 使三氟乙酰基多肽的水性混合物与水性哌啶反应以形成多肽的水性混合物的溶液,其中每种都基本上由丙氨酸,谷氨酸,酪氨酸和赖氨酸组成;和

[0094] d) 纯化多肽的水性混合物。

[0095] 在一个实施方案中,在混合物中的平均摩尔级分是谷氨酸 0.129-0.159;丙氨酸 0.392-0.462;酪氨酸 0.086-0.100;和赖氨酸 0.300-0.374。在具体的实施方案中,在混合物中的平均摩尔级分是谷氨酸 0.141,丙氨酸 0.427,酪氨酸 0.093,和赖氨酸 0.337。

[0096] 本发明还提供产生醋酸格拉默的方法,所述方法包括下列步骤:

[0097] a) 聚合酪氨酸、丙氨酸、 γ -苄基谷氨酸和 N-三氟乙酰基赖氨酸的 N-羧酸酐以形成被保护的醋酸格拉默;

[0098] b) 用氢溴酸的乙酸溶液来对被保护的醋酸格拉默进行去保护,所述溶液包含少于 0.5% 的游离溴和少于 1000ppm 的金属离子杂质,以形成三氟乙酰基醋酸格拉默;

[0099] c) 使三氟乙酰基醋酸格拉默与水性哌啶反应来形成醋酸格拉默的溶液;和

[0100] d) 纯化所述醋酸格拉默。

[0101] 在一个实施方案中,还对步骤 d) 的产物进行超滤以去除分子量少于 5000 道尔顿的多肽种类。

[0102] 在一个实施方案中,在乙酸溶液中的氢溴酸从在乙酸中的 10% 到 36% 氢溴酸。在另一个实施方案中,在乙酸中的氢溴酸从在乙酸中的 16% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 18% 到 33% 氢溴酸;在乙酸中的 20% 到 37% 的氢溴酸;在乙酸中的 20% 到 33% 氢溴酸;在乙酸中的 22% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 24% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 25% 到 35% 的氢溴酸;在乙酸中的 26% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 28% 到 33% 的氢溴酸;在乙酸中的 30% 到 34% 的氢溴酸;在乙酸中的 30% 到 33% 的氢溴酸;或在乙酸中的 32% 到 33% 的氢溴酸。在另一个实施方案中,所述溶液是在乙酸中的 33% 的氢溴酸。在另一个实施方案中,所述溶液是在乙酸中的 16% 的氢溴酸。

[0103] 在另一个实施方案中,用溴清除剂对氢溴酸的乙酸溶液进行预处理从而去除游离溴。

[0104] 在另一个实施方案中,所述溴清除剂是苯酚。

[0105] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液在非金属反应器中产生。

[0106] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液在玻璃衬里或 Teflon 衬里的反应器中制备。

[0107] 在一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 2000APHA。

[0108] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 1000APHA。

[0109] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 700APHA。

[0110] 在另一个实施方案中,氢溴酸的乙酸溶液的颜色少于 500APHA。

[0111] 本发明还提供分析在醋酸格拉默的样品中溴化的酪氨酸的百分比的方法,所述方

法包括下列步骤：

- [0112] a) 水解醋酸格拉默以获得水解产物；
- [0113] b) 通过色谱柱洗脱水解产物；
- [0114] c) 测量水解产物中的溴酪氨酸的水平；
- [0115] d) 制备溴酪氨酸和醋酸格拉默的氨基酸成分的样品溶液；
- [0116] e) 通过步骤 b) 的柱洗脱样品溶液；和
- [0117] f) 计算在醋酸格拉默中的溴化酪氨酸的百分比。

[0118] 本发明还提供制备药物组合物的方法，所述药物组合物包含不是都具有相同的氨基酸序列的多肽的混合物，其中每种多肽基本上由谷氨酸，丙氨酸，酪氨酸和赖氨酸组成，其中所述混合物具有预定比例的可接受被包含在药物组合物中的溴化的酪氨酸，所述方法包括获得具有不一致的氨基酸序列的多肽的混合物的批次，其中每种多肽基本上由谷氨酸，丙氨酸，酪氨酸和赖氨酸组成；测量通过下列方法获得的批次中的溴化酪氨酸的百分比，所述方法包括：

- [0119] a) 水解所述批次以获得水解产物；
- [0120] b) 通过色谱柱洗脱水解产物；
- [0121] c) 测量在水解产物中的溴酪氨酸的水平；
- [0122] d) 制备溴酪氨酸和所述批次的氨基酸成分的样品溶液；
- [0123] e) 通过步骤 b) 的柱洗脱样品溶液；
- [0124] 和
- [0125] f) 计算在所述批次中的溴化酪氨酸的百分比；

[0126] 和仅在所述药物组合物中包括这样的批次，其中这样测量的溴化的酪氨酸的百分比少于 0.3%。

[0127] 在一个实施方案中，可接受被包含在药物组合物中的批次仅仅是其中这样测量的溴化的酪氨酸的百分比少于 0.2% 的批次。

[0128] 在一个实施方案中，可接受被包含在药物组合物中的批次仅仅是其中这样测量的溴化的酪氨酸的百分比少于 0.1% 的批次。

[0129] 在另一个实施方案中，多肽的混合物是醋酸格拉默（"GA"）。

[0130] 术语

[0131] 用在本申请中的术语“平均分子量”意味着当所述混合物在 HPLC 凝胶渗透柱上进行按照分子量的分离时，在混合物中以最高的相对比例（即峰的最大值）存在的多肽种类的分子量。该值可以通过数种方式来获得，例如通过在校准的柱上的停留时间；或通过在校准的柱上的定位和确定序列和分子量的共同用色谱法分析的共聚物标志物的定位之间的相关性。可以使用确定平均分子量的其它方法诸如通过光散射，所述方法将基本上对应于通过峰最大值获得的值。

[0132] 例示的按照本发明的多肽混合物是这样的合成多肽的醋酸盐，所述合成多肽通过使四种活化的氨基酸衍生物（它们中的两种 L-谷氨酸和 L-赖氨酸被保护）：L-谷氨酸（L-Glu），L-丙氨酸（L-Ala），L-酪氨酸（L-Tyr）和 L-赖氨酸（L-Lys）（它们中的两种被保护，即 5Bz-谷氨酸衍生物和 6N-TFA-赖氨酸衍生物）以具体比率进行化学反应进行制备。用在本文中的术语“混合物”通常指包括 L-谷氨酸，L-丙氨酸，L-酪氨酸，和 L-赖氨酸的

“本发明的多肽的混合物”，并且两个术语都意味着包括来自制备过程的残余杂质。

[0133] 每种氨基酸残基的摩尔级分范围是：L-Glu 0.129-0.153, L-Ala 0.392-0.462, L-Tyr 0.086-0.100 和 L-Lys 0.300-0.374。

[0134] 因为没有反应是 100% 完成的，并且尽管实际上所有的杂质都被去除，但是仍有少量残余。这些杂质可以是下列三种类型：

[0135] - 结构相关的物质，其是被保护的氨基酸残基诸如 5-BZ-L- 谷氨酰残基和 / 或 N6-TFA-L- 赖氨酰残基，它们源自保护基的不彻底的去除。此外，本发明的多肽混合物分子可以包含溴化的 L- 酪氨酰残基，它们在制备过程中由于在 HBr/ 乙酸试剂中存在游离溴而形成。

[0136] 被鉴定的结构相关的杂质的分子结构可以来自参与的单体，即原材料。

[0137] 这些被鉴定的杂质通过与具体的参考标准进行比较而定量（在化学转化后），其是杂质本身的部分或衍生物：

[0138] - 残余的三氟乙酰基化合物（表示为氟化物）

[0139] - 残余的苄基化的谷氨酰残基（表示为苄基溴化物）

[0140] - 残余的溴化的酪氨酰残基（表示为溴酪氨酸）

[0141] 未鉴定的相关物质（通过 RP-HPLC 确定）：这些是具有类似结构的相同起源的小分子大小的多肽。这些物质可能具有类似的反应因素并且每种杂质的浓度（%）可以被计算为相对于本发明的多肽混合物的峰面积的 % 的峰面积。

[0142] 所述杂质的特征基于它们相对于 L- 色氨酸标准的它们的相对色谱保留时间（RRT）。

[0143] 在本说明书中涵盖的残余溶剂和无机杂质诸如残余溶剂 1,4 二噁烷，残余的哌啶和重金属。

[0144] 讨论

[0145] 游离溴

[0146] 在对于多肽的混合物，诸如 GA 的制备过程中，将在乙酸中的 33% 氢溴酸用于对被保护的 GA 进行去保护。例如，在开发 GA 的制备方法中，发现在三氟乙酰基 GA (TFA GA) 和在 GA 中的一些酪氨酸残基被溴化。使用在实施例 1 中详细描述的分析方法来分离和鉴定这种杂质。发现所述酪氨酸残基与溴反应以形成包括 2- 溴酪氨酸或 3- 溴酪氨酸的单 - 溴酪氨酸部分。

[0147] 在经过许多研究后，发明人发现溴化的酪氨酸杂质，通过在 HBr/ 乙酸中的游离溴被引入 GA 中。游离溴存在于购自生产商的 33% 的 HBr/ 乙酸中并用在制备过程中。

[0148] 采取措施以减少在 33% HBr/ 乙酸中的游离溴水平。例如，用溴清除剂对 HBr/ 乙酸进行预先处理在从 HBr/ 乙酸溶液中去除一些游离溴是有效的。

[0149] 用在 HBr 纯化方法中的溴清除剂其中之一是苯酚。除了苯酚之外，可以使用其它的还原剂诸如亚硫酸氢钠。选择苯酚作为溴清除剂是因为其和其与溴的反应产物（溴苯酚）基本上都是不与被保护的多肽，诸如被保护的 GA, TFA 多肽，诸如 TFA GA 和多肽诸如 GA 反应的，并且它们易于在纯化方法中从 GA 的溶液中去除。类似地，可以使用任何溴清除剂，条件是其和其与溴的反应产物不与被保护的多肽诸如被保护的 GA, TFA 多肽，诸如 TFA GA 和多肽，诸如 GA 反应，并且其易于在最终的纯化过程中进行去除。

[0150] 金属杂质

[0151] GA 以两种药物剂型,冻干的粉末和预灌装的注射器进行市售。在商标名 Copaxone®注射剂下出售的注射器通常包含澄清的溶液。储存操作规程将保持所述注射器冷却。然而,在 Copaxone®预灌装的溶液的水溶液中检测到红色。溶液中颜色的来源未知。

[0152] 当所述溶液在室温保持 12-24 小时,颜色出现。

[0153] 在金属装置中制备 HBr 会导致 HBr 中有微量金属离子杂质存在是确定的。当 HBr 后来混合以被保护的 GA 时,在 HBr 中的金属离子杂质被 TFA GA 和 GA 所螯合。这些 TFA GA 和 GA/ 金属复合物有利于着色。

[0154] 结果,为了确保例如 GA 的产物中的纯度所采取的另一种措施是使用非金属反应器来制备 33% HBr/ 乙酸溶液。用于制备 HBr/ 乙酸溶液的反应器是玻璃衬里的从而防止后来影响例如 GA 的纯度的杂质的形成。为了防止 HBr 溶液与金属接触,所用的管道系统的部分是 Teflon- 衬里的。类似地,可以将其它类型的非反应性的,抗酸的非金属装置用于防止在 HBr/ 乙酸溶液中形成微量的金属离子。使用非金属的装置来产生 HBr/ 乙酸溶液在从 GA 中消除红色是成功的。当将非金属装置用于制备 HBr/ 乙酸溶液时,结果是所述溶液基本上不含金属离子并且没有形成红色的 GA。

[0155] 此外,测量 HBr/ 乙酸的每个批次的颜色以在用于对被保护的 GA 进行去保护之前确定杂质的水平。发现在 HBr 溶液中的金属离子杂质水平可以通过视觉分析进行确定。显示颜色低于 2000 APHA 的 HBr 溶液产生不带红色的醋酸格拉默。

[0156] 本发明将通过下面的实施例进行例示,但不受限于所述实施例。

[0157] 实验细节

[0158] 实施例 1- 在 HBR/ 乙酸中的溴浓度对在 TFA GA 和在 GA 中的溴化的酪氨酸部分的影响

[0159] 为了确定在氢溴酸 / 乙酸中的游离溴对在 TFA-GA 和 GA 中的溴化的酪氨酸部分杂质的水平的影响,用不同量的溴来污染在乙酸中的氢溴酸。在所述实验中,将没有用溴清除剂进行预处理的 HBr 用在生产过程中。加入各种水平的溴的杂质 (测量为 HBr/ 乙酸溶液的百分比)。通过将 TFA GA 和 GA 水解为其氨基酸成分并接着使用 HPLC 以确定相对于 TFA GA 和 GA 的溴酪氨酸的量来测量在 TFA GA 和在 GA 中的溴化的酪氨酸部分杂质的水平。

[0160] 方法

[0161] 制备标准溶液

[0162] 使用蒸馏水来制备包含 2 μ g/mL 溴酪氨酸的标准溶液。使用下列氨基酸来制备氨基酸标准储液 :

[0163]

L-Glu	约 100mg
L-Ala	约 130mg
L-Tyr	约 75mg
L-Lys HCl	约 200mg

[0164] 将氨基酸溶解在水中。加入数滴 5NNaOH 并加入水到 25mL 的终体积。

[0165] 水解

[0166] 将 10mg 的醋酸格拉默和 10mg 的 TFA GA 每种独立地称入 5mL 的水解小瓶中。通过将 0.5mL 的氨基酸标准储液加入 5mL 的水解小瓶中来制备阴性对照小瓶。将 0.5mL 的水和包含 1% 的苯酚的 0.5mL 的浓缩的 HCl 加入每个小瓶中。在氮气气氛下,将所述小瓶加热到 110℃ 达 24 小时。接着,将所述样品冷却到室温。将每种水解产物转移到 5mL 的容量瓶中并用蒸馏水填充到体积。

[0167] 色谱法

[0168] 使用 4 : 95 : 1 比率的乙腈 : 水 : 乙酸洗脱剂将溴酪氨酸标准和每种水解产物独立地通过 HPLC 柱进行洗脱。用 UV 检测器和数据记录系统装备所述柱。使用氨基酸标准作为阴性对照来确定在醋酸格拉默水解产物中的那个峰对应于溴酪氨酸。

[0169] 数据分析

[0170] 如下计算在每种 TFA GA 和 GA 样品中的溴化酪氨酸部分的百分比 :

[0171] $P = \text{溴酪氨酸标准的纯度 (以百分比形式表示)}$

[0172] $A_s = \text{溴酪氨酸标准峰的面积}$

[0173] $A_p = \text{在每种样品中的溴酪氨酸峰的面积}$

[0174] $C_s = \text{溴酪氨酸标准的浓度 (}\mu\text{g/mL)}$

[0175] $C_p = \text{醋酸格拉默 (或 TFA GA) 的浓度}$

[0176]

$$\% \text{ 溴化的酪氨酸} = p * \frac{A_p * C_s}{A_s * C_p}$$

[0177] 表 1 显示游离溴对在 TFA 醋酸格拉默和在醋酸格拉默中的溴化酪氨酸部分的水平的影响。

[0178] 表 1. 游离溴对溴化的酪氨酸部分的水平的影响

[0179]

溴(%)	溴化的酪氨酸(%)	
	TFA 格拉默	醋酸格拉默
未加入溴	0.1	0.2
0.5	0.7	1.2
1	1.2	2.2
5	4	无数据

[0180] 结果

[0181] 通过上述实施例,可以观察到相对于其中没有添加溴的标准反应,用溴来污染 HBr 导致在 TFA GA 和在 GA 中的溴化的酪氨酸部分的更高水平。当没有添加溴时,由于 HBr 没有用溴清除剂进行处理,一些游离溴仍旧是可获得的,并且 GA 和 TFA GA 的溴化的酪氨酸部分的污染仍然是明显的。

[0182] 为了产生其中溴化的酪氨酸部分杂质的水平少于 0.2% 的 GA, 在 HBr 中的游离溴的水平必须通过添加溴清除剂来降低。

[0183] 实施例 2-33% HBr 在乙酸中的溶液的产生

[0184] 用乙酸漂洗玻璃衬里的反应器, 接着将其倒空。将 1013kg 的乙酸加入反应器中。将乙酸维持在 10-20°C 的温度上。将 522kg 的 HBr 气体引入反应器中, 同时混合溶液。在气体被引入后, 将溶液再混合 30 分钟。测试所述溶液以确定 HBr 的含量是否是 33%。

[0185] 实施例 3- 使用苯酚作为溴清除剂来纯化 HBr/ 乙酸溶液

[0186] 将在乙酸中的 33% HBr 溶液倾入玻璃衬里的反应器中。对苯酚进行称重并将其以 1 比 100 的重量比率加入 HBr 溶液。接着, 将所述溶液搅拌 12-24 小时。接着, 将纯化的 HBr 溶液加入被保护的醋酸格拉默。HBr 与被保护的 GA 反应形成 TFA GA。所述 TFA GA 与哌啶反应来形成 GA。

[0187] 实施例 4- 在各种批次中的溴化的酪氨酸的水平

[0188] 使用在实施例 1 中所述的方法测量在各种批次的醋酸格拉默中的溴化的酪氨酸部分的水平。

[0189]

制备方法	GA 的批次号	溴化的酪氨酸部分的浓度
旧方法	A	0.15
	B	0.19
	C	0.14
	D	0.15
	E	0.32
新方法	X	不可检测到
	Y	不可检测到
	Z	不可检测到

[0190] 结果

[0191] 使用如在实施例 2 中所述的新方法产生并用如在实施例 3 中的苯酚处理的 HBr 不含溴和金属杂质。因此, 产生的醋酸格拉默基本上不含溴化的酪氨酸部分。

[0192] 购自外部生产商的 HBr (旧方法) 具有杂质, 并且因此即便是将苯酚用作酪氨酸清除剂, 使用其产生的醋酸格拉默也具有溴化的酪氨酸部分杂质。

[0193] 实施例 5- 颜色测定

[0194] 使用标准的目视颜色测定技术来测定 HBr/ 乙酸溶液的颜色。

[0195] 美国公众卫生协会 (APHA) 色度指数是单数黄度指数, 其中每个 APHA 单位基于 500ppm 的铂 - 钴 (PtCo) 的储液的稀释。(HunterLab, APHABackground, Application Note, Insight on Color November 16-30, 1996, Vol. 8, No. 16. 可在 <http://www.hunterlab>.

com/appnotes/an11_96br2.pdf. 上获得)。通过目视比较所述溶液与 PtCo 标准来确定 APHA 的测量,所述 PtCo 标准包含受控量的氯铂酸钾和氯化钴。每个数量单位等价于每升溶液 1mg 的铂 (ppm)。标准和相应的测量按照它们的 ppm 测量指定,即 20 号 APHA 标准包含 20ppm 的铂。可在 http://pubs.acs.org/reagent_demo/sec_b002.html 上获得的 American Chemical Society, General Directions and Procedures: Measurement of Physical Properties available at), 蒸馏水的 APHA 值为 0, 储液的 APHA 值为 500ppm (HunterLab, APHA Background, Applications Not, Insight on Color, November 16-30, 1996, Vol. 8, No. 16. 可在 http://www.hunterlab.com/appnotes/an11_96br2.pdf.) 获得。可以通过本领域熟知的各种仪器进行 APHA 测量。

[0196] 制备 APHA 色度标准 " 500 " 和 APHA 色度标准 " 1000 "。通过将 1.246g 氯铂酸钾, K_2PtCl_6 (等价于 50mg 金属铂) 和 1.00g 的结晶的氯化钴, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (等价于约 250mg 金属钴) 与 100ml 的浓缩 HCl 溶解于蒸馏水中并将其用蒸馏水稀释到 1000mL 来制备 APHA 色度标准 " 500 "。

[0197] 通过将 2.492g 氯铂酸钾, K_2PtCl_6 和 2.00g 的结晶的氯化钴, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 与 200ml 的浓缩 HCl 溶解于蒸馏水中并将其用蒸馏水稀释到 1000mL 来制备 APHA 色度标准 " 1000 "。

[0198] 使用如前所述的非金属装置产生下列批次。通过垂直针对白色背景, 观察 100mL 的奈斯勒比色管来对这些样品进行针对色度标准的视觉颜色测试。

[0199]

批次号	色度 (APHA)
M	< 500
N	< 500
P	700
Q	350
R	< 300

[0200] HBr/ 乙酸的这些批次的颜色显示它们基本上不含溴和金属离子杂质。因为颜色少于 2000 APHA, 认为这些批次基本上不含金属离子杂质。