



(51) МПК

C07K 14/00 (2006.01)*C08G 69/10* (2006.01)*A61K 38/00* (2006.01)*A61P 25/00* (2006.01)*A61P 37/06* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007112956/04, 09.09.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.09.2005(30) Конвенционный приоритет:
09.09.2004 US 60/608,843

(43) Дата публикации заявки: 20.10.2008

(45) Опубликовано: 10.05.2010 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2198900 C2, 20.02.2003. RU 2161489
C2, 10.01.2001. WO 96/32119 A1, 17.10.1996. US
2004/091956 A1, 13.05.2004.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 09.04.2007(86) Заявка РСТ:
US 2005/032395 (09.09.2005)(87) Публикация РСТ:
WO 2006/029393 (16.03.2006)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ДОЛИТЦКИ Бен-Зион (IL)

(73) Патентообладатель(и):

ТЕВА ФАРМАСЬЮТИКАЛ ИНДАСТРИЗ,
ЛТД. (IL)(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СМЕСЕЙ ПОЛИПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ОЧИЩЕННОЙ БРОМИСТОВОДОРОДНОЙ КИСЛОТЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к
усовершенствованному способу получения
смеси трифторацетил-глутирамера ацетата, где

полученная смесь полипептидов содержит не
более чем 0,1% бромированного тирозина и
менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей
ионов металлов. 6 н. и 14 з.п. ф-лы, 1 таб.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 388 764** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C08G 69/10 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2007112956/04, 09.09.2005**

(24) Effective date for property rights:
09.09.2005

(30) Priority:
09.09.2004 US 60/608,843

(43) Application published: **20.10.2008**

(45) Date of publication: **10.05.2010 Bull. 13**

(85) Commencement of national phase: **09.04.2007**

(86) PCT application:
US 2005/032395 (09.09.2005)

(87) PCT publication:
WO 2006/029393 (16.03.2006)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):
DOLITTsKI Ben-Zion (IL)

(73) Proprietor(s):
**TEVA FARMAS'JuTIKAL INDASTRIZ, LTD.
(IL)**

(54) METHOD OF OBTAINING MIXTURE OF POLYPEPTIDES USING REFINED HYDROBROMIC ACID

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to an improved method of obtaining a mixture of trifluoroacetyl-glatiramer acetate, where the obtained mixture of polypeptides contains not more than 0.1% brominated

tyrosine and less than 1000 parts/million metal ion impurities.

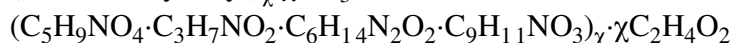
EFFECT: design of an improved method of obtaining a mixture of trifluoroacetyl-glatiramer acetate.

20 cl, 1 tbl, 5 ex

В данной заявке различные публикации, на которые ссылаются, включены в полном объеме. Тем самым описания таких публикаций полностью включены в данную заявку в качестве ссылки для того, чтобы более полно описать уровень техники, к которой относится данное изобретение.

Уровень техники изобретения

Смесь полипептидов, все из которых не имеют одинаковой последовательности аминокислот, обозначаемую как глатирамера ацетат (GA), продают под торговым наименованием Копаксон® и она содержит ацетатные соли полипептидов, содержащих L-глутаминовую кислоту, L-аланин, L-тирозин и L-лизин при средних мольных долях 0,141, 0,427, 0,095 и 0,338, соответственно. Средняя молекулярная масса Копаксона® находится в диапазоне от 4700 до 11000 дальтон («Cораконе», Physician's Desk Reference, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115). Химически глатирамером ацетата обозначают ацетат (соль) полимера L-глутаминовой кислоты с L-аланином, L-лизином и L-тирозином. Его структурная формула представляет собой:



CAS-147245-92-9

(«Cораконе», Physician's Desk Reference, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115).

Глатирамера ацетат одобрен для использования с целью уменьшения частоты рецидивов у пациентов с рецидивирующим-ремитирующим рассеянным склерозом. Рассеянный склероз классифицировали в качестве аутоиммунного заболевания. Глатирамера ацетат также показан для использования при лечении других аутоиммунных заболеваний (публикация № US 2002/0055466 A1 R. Aharoni et al.), воспалительных неаутоиммунных заболеваний (публикация № US 2005/0014694 A1 V. Wee Yong et al.; и заявка на выдачу патента США № 2002/0077278 A1, опубликованная 20 июня 2002 (Young et al.)) и для активации регенерации нерва и/или для предупреждения ингибирования вторичной дегенерации, которая может сопровождать первичное поражение нервной системы (публикация № US 2003/0004099 A1 M. Eisenbach-Schwartz et al.; и заявка на выдачу патента США № 2002/0037848 A1, опубликованная 28 марта 2002 (Eisenbach-Schwartz)). Более того, глатирамера ацетат также показан для лечения вызванных расстройством иммунитета заболеваний (например, патент США № 6514938 B1, выданный 4 февраля 2003 (Gad et al.); международная публикация PCT № WO 01/60392, опубликованная 23 августа 2001 (Gilbert et al.); и международная публикация PCT № WO 00/27417, опубликованная 19 мая 2000 (Aharoni et al.), а также заболеваний, связанных с демиелинизацией (международная публикация PCT № WO -1/97846, опубликованная 27 декабря 2001 (Moses et al.)).

Способ производства, как подробно описано в упомянутых выше патентах, охватывает взаимодействие защищенных полипептидов с 33% бромистоводородной кислотой в уксусной кислоте (патент США № 5800808, выданный 1 сентября 1998 Konfino, et al.) Такая реакция снятия защитных групп удаляет гамма-бензильную защитную группу с 5-карбоксилата остатка глутамата и расщепляет полимер на меньшие полипептиды, чтобы получить трифторацетил-полипептид (патент США № 5800808, выданный 1 сентября 1998 Konfino, et al.). Время, необходимое для получения GA соответствующей средней молекулярной массы в диапазоне 7000±2000 дальтон, зависит от температуры реакции и профиля молекулярной массы

защищенного глатирамера ацетата (патент США № 5800808, выданный 1 сентября 1998 Konfino, et al.). Снятие защитных групп происходит при температуре в диапазоне от 20 до 28°C (патент США № 5800808, выданный 1 сентября 1998 Konfino, et al.). Проверочную реакцию осуществляют для каждой части в течение различных периодов времени, чтобы определить время реакции, необходимое при данной температуре для получения трифторацетил-полипептидов соответствующего профиля молекулярной массы (патент США № 5981589, выданный 9 ноября 1999 Konfino, et al.).
Время, необходимое для реакций, находится в диапазоне, например, от 10 до 50 часов (патент США № 5800808, выданный 1 сентября 1998 Konfino, et al.). Кроме того, патенты США № 5981589, 6048898, 6054430, 6342476, 6362161 и 6620847 также относятся к композициям и способам производства смесей полипептидов, включающих в себя GA.

В данном изобретении предлагается усовершенствованный способ производства.

Сущность изобретения

В представленном изобретении предлагается способ получения смеси трифторацетил-полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и трифторацетил-лизина, где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу и где во время технологического процесса для части смеси полипептидов, каждый из которых состоит, по существу, из аланина, γ -бензилглутамата, тирозина и трифторацетил-лизина, происходит снятие защитных групп раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, усовершенствование, охватывающее использование раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, в котором раствор содержит менее чем 0,5% свободного брома.

В представленном изобретении также предлагается способ получения смеси трифторацетил-полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и трифторацетил-лизина, где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу и где во время технологического процесса для части смеси полипептидов, каждый из которых состоит, по существу, из аланина, γ -бензилглутамата, тирозина и трифторацетил-лизина, происходит снятие защитных групп раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, усовершенствование, охватывающее использование раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, в котором раствор содержит менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В представленном изобретении дополнительно предлагается способ получения смеси трифторацетил-полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и трифторацетил-лизина, где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу, охватывающий снятие защитных групп в смеси полипептидов, состоящих каждый, по существу, из аланина, γ -бензилглутамата, тирозина и трифторацетил-лизина, раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, усовершенствование, охватывающее использование раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, в котором раствор содержит менее чем 0,5% свободного брома и менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В представленном изобретении также предлагается композиция, содержащая

трифторацетильный продукт, полученный любым из способов описываемого изобретения, и носитель.

В представленном изобретении дополнительно предлагается смесь трифторацетил-полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и трифторацетил-лизина, где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу, не более чем 0,1% бромированного тирозина и менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов. В представленном изобретении также предлагается композиция, содержащая смесь трифторацетил-полипептидов и носитель.

В представленном изобретении также предлагается способ получения фармацевтической композиции, содержащей смесь полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и лизина, и где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу, который включает:

а) полимеризацию N-карбоксиангидридов тирозина, аланина, γ -бензилглутамата и N-трифторацетил-лизина для образования смеси защищенных полипептидов;

б) снятие защитных групп раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, раствор содержит менее чем 0,5% свободного брома и менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов для образования смеси трифторацетил-полипептидов;

в) взаимодействие смеси трифторацетил-полипептидов с водным пиперидином для образования раствора водной смеси полипептидов, каждый из которых состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и лизина и

д) очищение смеси полипептидов.

В представленном изобретении также предлагается способ получения глатирамера ацетата, включающий стадии:

а) полимеризации N-карбоксиангидридов тирозина, аланина, γ -бензилглутамата и N-трифторацетил-лизина для образования смеси защищенного глатирамера ацетата;

б) снятия защитных групп с защищенного глатирамера ацетата раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, раствор содержит менее чем 0,5% свободного брома и менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов для образования трифторацетил-глатирамера ацетата;

в) взаимодействия трифторацетил-глатирамера ацетата с водным пиперидином для образования раствора трифторацетил-глатирамера ацетата и

д) очищения глатирамера ацетата.

В представленном изобретении еще дополнительно предлагается способ анализа процентного соотношения бромированного тирозина в образце глатирамера ацетата, включающий стадии:

а) гидролиза глатирамера ацетата для получения гидролизата;

б) элюирования гидролизата из хроматографической колонки;

в) измерения уровня бромтирозина в гидролизате;

г) приготовления растворов образцов аминокислотных компонентов глатирамера ацетата и бромтирозина;

д) элюирования растворов образцов из колонки стадии в) и

е) вычисления процентного соотношения бромированного тирозина в глатирамера ацетате.

В представленном изобретении также предлагается способ получения

фармацевтической композиции, содержащей смесь полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из глутаминовой кислоты, аланина, тирозина и лизина, где смесь имеет предварительно определенное процентное соотношение бромированного тирозина, допустимое для включения в состав фармацевтической композиции, который охватывает получение части смеси полипептидов, имеющих неоднородные аминокислотные последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из глутаминовой кислоты, аланина, тирозина и лизина;

измерение процентного соотношения бромированного тирозина в части способом, включающим:

- а) гидролиз части для получения гидролизата;
- б) элюирование гидролизата из хроматографической колонки;
- с) измерение уровня бромтирозина в гидролизате;
- д) приготовление растворов образцов аминокислотных компонентов в части и бромтирозина;
- е) элюирование растворов образцов из колонки стадии б) и
- ф) вычисление процентного соотношения бромированного тирозина в части; и

включение части в состав фармацевтической композиции, только если процентное соотношение измеренного таким образом бромированного тирозина в ней составляет менее чем 0,3%.

Подробное описание изобретения

В представленном изобретении предлагается способ получения смеси трифторацетил-полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и трифторацетил-лизина, где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу и где во время технологического процесса для части смеси полипептидов, каждый из которых состоит, по существу, из аланина, γ -бензилглутамата, тирозина и трифторацетил-лизина, происходит снятие защитных групп раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; усовершенствование включает использование раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, в котором раствор содержит менее чем 0,5% свободного брома.

В одном осуществлении усовершенствование дополнительно охватывает использование раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, который содержит менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В представленном изобретении дополнительно предлагается способ получения смеси трифторацетил-полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и трифторацетил-лизина, где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу и где во время технологического процесса для части смеси полипептидов, каждый из которых состоит, по существу, из аланина, γ -бензилглутамата, тирозина и трифторацетил-лизина, происходит снятие защитных групп раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; усовершенствование включает использование раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, в котором раствор содержит менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В представленном изобретении также дополнительно предлагается способ получения смеси трифторацетил-полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу,

из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и трифторацетил-лизина, где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу, охватывающий снятие защитных групп в смеси полипептидов, состоящих каждый, по существу, из аланина, γ -бензилглутамата, тирозина и трифторацетил-лизина, раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, в котором раствор содержит менее чем 0,5% свободного брома и менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В одном осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 0,1% свободного брома.

В другом осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 0,05% свободного брома.

В дополнительном осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 0,01% свободного брома.

В еще одном осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 0,001% свободного брома.

В дополнительном осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте не содержит свободного брома.

В другом осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В еще одном осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 500 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В одном осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 100 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В другом осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 30 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В еще одном осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 20 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В дополнительном осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте содержит менее чем 10 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В другом осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте не содержит загрязняющих примесей ионов металлов.

В еще одном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов представляет собой трифторацетил-глутирамера ацетат («TFA-GA»).

В осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоты представляет собой раствор от 10 до 36% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте. В другом осуществлении бромистоводородная кислота в уксусной кислоте представляет собой раствор от 16 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 18 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 20 до 37% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 20 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 22 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 24 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 25 до 35% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 26 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 28 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 30 до 34% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 30 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; или от 32 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте. В дополнительном осуществлении раствор представляет собой раствор 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте. В другом осуществлении раствор представляет собой раствор 16%

бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте.

В другом осуществлении раствор предварительно обрабатывают акцептором брома для того, чтобы удалить свободный бром.

В одном осуществлении акцептор брома представляет собой фенол.

5 В дополнительном осуществлении раствор получают в неметаллическом реакторе.

В дополнительном осуществлении раствор получают в эмалированном или покрытом с внутренней стороны тефлоном реакторе.

10 В еще одном осуществлении цветность раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте составляет менее чем 2000 АРНА.

В дополнительном осуществлении цветность раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте составляет менее чем 1000 АРНА.

В другом осуществлении цветность раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте составляет менее чем 700 АРНА.

15 В еще одном осуществлении цветность раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте составляет менее чем 500 АРНА.

В представленном изобретении также предлагается трифторацетильный продукт, получаемый одним из описанных способов.

20 В представленном изобретении дополнительно предлагается композиция, содержащая трифторацетильный продукт, получаемый одним из описанных способов, и носитель.

В представленном изобретении еще дополнительно предлагается смесь трифторацетил-полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и трифторацетил-лизина, где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу, не более чем 0,1% бромированного тирозина и менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

30 В одном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 2000 до 40000 дальтон.

В другом осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 4000 до 18000 дальтон.

35 В дополнительном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 4000 до 13000 дальтон.

В другом осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 13000 до 19000 дальтон.

40 В еще одном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 13500 до 18500 дальтон.

В дополнительном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов имеет среднюю молекулярную массу 7000 ± 2000 дальтон.

В еще одном дополнительном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов имеет среднюю молекулярную массу 7000 дальтон.

45 В другом осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов имеет среднюю молекулярную массу 14000 дальтон.

В еще одном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне 4700-11000 дальтон.

50 В дополнительном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов содержит менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В еще одном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов содержит менее чем 500 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В дополнительном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов содержит менее чем 100 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В другом осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов содержит менее чем 30 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В дополнительном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов содержит менее чем 20 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В другом осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов содержит менее чем 10 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

В еще одном осуществлении смесь трифторацетил-полипептидов не содержит загрязняющих примесей ионов металлов.

В представленном изобретении также предлагается композиция, содержащая смесь трифторацетил-полипептидов и носитель.

В представленном изобретении дополнительно предлагается способ получения фармацевтической композиции, состоящей из смеси полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и лизина, и где смесь имеет необходимую среднюю молекулярную массу, который включает

а) полимеризацию N-карбоксиангидридов тирозина, аланина, γ -бензилглутамата и N-трифторацетил-лизина для образования водной смеси защищенных полипептидов;

б) снятие защитных групп раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, в котором раствор содержит менее чем 0,5% свободного брома и менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов для образования водной смеси трифторацетил-полипептидов;

в) взаимодействие водной смеси трифторацетил-полипептидов с водным пиперидином для образования раствора водной смеси полипептидов, каждый из которых состоит, по существу, из аланина, глутаминовой кислоты, тирозина и лизина и

д) очищение водной смеси полипептидов.

В одном осуществлении средняя мольная доля в смеси составляет 0,129-0,159 глутаминовой кислоты; 0,392-0,462 аланина; 0,086-0,100 тирозина и 0,300-0,374 лизина. В определенном осуществлении средняя мольная доля в смеси глутаминовой кислоты составляет 0,141, аланина составляет 0,427, тирозина составляет 0,093 и лизина составляет 0,337.

В представленном изобретении также предлагается способ получения глатирамера ацетата, включающий стадии:

а) полимеризации N-карбоксиангидридов тирозина, аланина, γ -бензилглутамата и N-трифторацетил-лизина для образования защищенного глатирамера ацетата;

б) снятия защитных групп с защищенного глатирамера ацетата раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, раствор содержит менее чем 0,5% свободного брома и менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов для образования трифторацетил-глатирамера ацетата;

в) взаимодействия трифторацетил-глатирамера ацетата с водным пиперидином для образования раствора глатирамера ацетата и

д) очищения глатирамера ацетата.

В одном осуществлении продукт стадии д) дополнительно подвергают ультрафильтрации для того, чтобы удалить молекулы полипептидов с молекулярной массой менее чем 5000 дальтон.

В осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте представляет собой раствор от 10% до 36% бромистоводородной кислоты в уксусной

кислоте. В другом осуществлении бромистоводородная кислота в уксусной кислоте представляет собой раствор от 16% до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 18% до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 20% до 37% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 20% до 33%

бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 22 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 24 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 25 до 35% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 26 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 28 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 30 до 34% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте; от 30 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте или от 32 до 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте. В дополнительном осуществлении раствор представляет собой раствор 33% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте. В другом осуществлении раствор представляет собой раствор 16% бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте.

В другом осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте предварительно обрабатывают акцептором брома для того, чтобы удалить свободный бром.

В еще одном осуществлении акцептор брома представляет собой фенол.

В дополнительном осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте получают в неметаллическом реакторе.

В другом осуществлении раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте получают в эмалированном или покрытом с внутренней стороны тефлоном реакторе.

В одном осуществлении цветность раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте составляет менее чем 2000 АРНА.

В дополнительном осуществлении цветность раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте составляет менее чем 1000 АРНА.

В другом осуществлении цветность раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте составляет менее чем 700 АРНА.

В еще одном осуществлении цветность раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте составляет менее чем 500 АРНА.

В представленном изобретении дополнительно предлагается способ анализа процентного соотношения бромированного тирозина в образце глатирамера ацетата, включающий стадии:

- а) гидролиза глатирамера ацетата для получения гидролизата;
- б) элюирования гидролизата из хроматографической колонки;
- в) измерения уровня бромтирозина в гидролизате;
- г) приготовления растворов образцов аминокислотных компонентов глатирамера ацетата и бромтирозина;
- д) элюирования растворов образцов из колонки стадии в) и
- е) вычисления процентного соотношения бромированного тирозина в глатирамера ацетате.

В представленном изобретении также предлагается способ получения фармацевтической композиции, содержащей смесь полипептидов, все из которых не имеют одинаковой аминокислотной последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из глутаминовой кислоты, аланина, тирозина и лизина, где смесь имеет предварительно определенное процентное соотношение бромированного тирозина, допустимое для включения в состав фармацевтической композиции, который охватывает получение части смеси полипептидов, имеющих неодинаковые

аминокислотные последовательности, где каждый полипептид состоит, по существу, из глутаминовой кислоты, аланина, тирозина и лизина;

измерение процентного соотношения бромированного тирозина в части способом, включающим

- а) гидролиз части для получения гидролизата;
- б) элюирование гидролизата из хроматографической колонки;
- с) измерение уровня бромтирозина в гидролизате;
- д) приготовление растворов образцов аминокислотных компонентов в части и бромтирозина;
- е) элюирование растворов образцов из колонки стадии б) и
- ф) вычисление процентного соотношения бромированного тирозина в части; и включение части в состав фармацевтической композиции, только если процентное соотношение измеренного таким образом бромированного тирозина в ней менее чем 0,3%.

В одном осуществлении часть пригодна для включения в состав фармацевтической композиции, только если процентное соотношение измеренного таким образом бромированного тирозина в ней менее чем 0,2%.

В другом осуществлении часть пригодна для включения в состав фармацевтической композиции, только если процентное соотношение измеренного таким образом бромированного тирозина в ней менее чем 0,1%.

В дополнительном осуществлении смесь полипептидов представляет собой глатирамера ацетат («GA»).

ТЕРМИНЫ

Используемый в данной заявке термин «средняя молекулярная масса» обозначает молекулярную массу молекул полипептидов, присутствующих в смеси в наивысших относительных долях (то есть максимум пика), когда смесь подвергают разделению по молекулярной массе на колонке гель-проникающей ВЭЖХ. Данное значение можно получить несколькими способами, например, по времени удерживания на откалиброванной колонке или по корреляции между положением пика и положением одновременно хроматографирующихся кополимерных маркеров определенной последовательности и молекулярной массы. Можно использовать другие способы определения средней молекулярной массы, такие как светорассеяние, и они будут значительно соответствовать значению, полученному по максимуму пика.

Полипептидная смесь по данному изобретению, как иллюстрируют, представляет собой ацетатную соль синтетических полипептидов, полученных посредством химического взаимодействия четырех активированных производных аминокислот (два из них L-глутаминовая кислота и защищенный L-лизин): L-глутаминовой кислоты (L-Glu), L-аланина (L-Ala), L-тирозина (L-Tyr) и L-лизина (L-Lys) (два из них защищены, то есть 5Bz-глутаматное производное и 6N-TFA-производное лизина) в определенном соотношении. Используемый в данном документе термин «смесь» в общем смысле обозначает «смесь полипептидов по изобретению», содержащих L-глутаминовую кислоту, L-аланин, L-тирозин и L-лизин, и оба термина, как подразумевают, включают в себя остаточное загрязнение от способа промышленного производства.

Диапазон мольной доли каждого аминокислотного остатка составляет: 0,129-0,153 L-Glu, 0,392-0,462 L-Ala, 0,086-0,100 L-Tyr и 0,300-0,374 L-Lys.

Поскольку никакая реакция не проходит полностью на 100% и, хотя практически все загрязняющие примеси устранены, небольшие их количества могут оставаться. Такие примеси могут представлять собой следующие три типа:

- структурно-родственные вещества, которые представляют собой защищенные аминокислотные остатки, такие как 5-BZ-L-глутамиловые и/или N6-TFA-L-лизилловые остатки, образующиеся при неполном удалении защитных групп. В дополнение, полипептидная смесь молекул по изобретению может содержать бромированные L-тирозиловые остатки, образующиеся в процессе получения из-за наличия реагента HBr/уксусная кислота.

Молекулярные структуры идентифицированных структурно-родственных загрязняющих примесей можно получить из участвующих в их образовании мономеров, то есть исходных веществ.

Такие идентифицированные загрязняющие примеси определяют количественно (после химического преобразования) по сравнению с определенными эталонами для сравнения, которые представляют собой либо производные, либо часть самих загрязняющих примесей:

- остаточные трифторацетильные вещества (выраженные в виде фторидов)
- остаточные бензилированные глутамиловые остатки (выраженные в виде бромистого бензила)
- остаточные бромированные тирозиловые остатки (выраженные в виде бромтирозина).

- Неидентифицированные родственные вещества (определяемые ОФ-ВЭЖХ): они представляют собой полипептиды небольшого молекулярного размера того же самого происхождения, что и схожие структуры. Данные вещества, вероятно, обладают схожими коэффициентами влияния, и концентрацию (%) каждой примеси можно вычислить как % площади пика относительно площади пика полипептидной смеси по изобретению.

Характеристика загрязняющих примесей основана на их относительном хроматографическом времени удержания (RRT) относительно стандарта L-триптофана.

В описание включены остаточные растворители и неорганические загрязняющие примеси, такие как остаточный растворитель 1,4-диоксан, остаточный пиперидин и тяжелые металлы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Свободный бром

В процессе промышленного производства смесей полипептидов, таких как GA, 33% бромистоводородную кислоту в уксусной кислоте используют для снятия защитных групп защищенного GA. Например, в ходе процесса производства GA было обнаружено, что некоторые из остатков тирозина в трифторацетил-GA (TFA-GA) и в GA были бромированы. Данную загрязняющую примесь выделяли и идентифицировали, используя аналитическую процедуру, которая подробно описана в примерах. Остаток тирозина, как обнаружили, взаимодействовал с бромом для образования монобромтирозинового фрагмента, содержащего либо 2-бромтирозин, либо 3-бромтирозин.

После усиленного исследования авторы изобретения обнаружили, что бромированная примесь тирозина вводилась в GA посредством свободного брома в смеси HBr/уксусная кислота. Свободный бром присутствовал в смеси 33% HBr/уксусная кислота, приобретенной у поставщика и использованной по способу производства.

Для того чтобы уменьшить уровень свободного брома в смеси 33% HBr/уксусная кислота, предприняли меры. Например, предварительная обработка смеси

HBr/уксусная кислота акцептором брома была эффективна при удалении некоторого количества свободного брома из раствора HBr/уксусной кислоты.

Один из акцепторов брома, используемых в процессе очистки HBr, представлял собой фенол. В дополнение к фенолу можно использовать другие восстанавливающие средства, такие как гидросульфит натрия. Фенол выбрали в качестве акцептора брома, поскольку он и продукт его реакции с бромом (бромфенол) оба в высокой степени не реакционно-способны в отношении защищенных полипептидов, таких как защищенный GA, TFA-полипептидов, таких как TFA-GA, и таких полипептидов, как GA, и их легко удалить из раствора GA в ходе процесса очистки. Схожим образом, любое утилизирующее бром средство можно использовать при условии, что оно и продукт его реакции с бромом не являются реакционно-способными в отношении защищенных полипептидов, таких как защищенный GA, TFA-полипептидов, таких как TFA-GA, и таких полипептидов, как GA, и их можно с легкостью удалить в ходе процесса заключительной очистки.

Загрязняющие примеси металлов

GA находится в продаже в виде двух лекарственных форм, лиофилизированного порошка и предварительно заполненных шприцев. Шприцы, продаваемые под торговой маркой инъекция Копаксона®, в основном, содержали прозрачный раствор. Инструкции по хранению предписывали сохранять шприцы охлажденными. Однако обнаружили красное окрашивание водных растворов предварительно заполненных растворов Копаксона®. Причина появления цвета в растворах была неизвестна.

Цвет появлялся, если растворы хранили при комнатной температуре в течение от 12 до 24 часов.

Определили, что получение HBr в металлическом устройстве приводило к образованию следового количества загрязняющих примесей ионов металлов в HBr. Когда HBr позже смешивали с защищенным GA, загрязняющие примеси ионов металлов в HBr образовывали хелатные комплексы с TFA-GA и GA. Такие комплексы TFA-GA и GA/металл обеспечивали появление окрашивания.

В результате другой меры, предпринятой для того, чтобы обеспечить чистоту, например, в продукте GA, использовали неметаллический реактор для получения раствора 33% HBr/уксусная кислота. Реактор, используемый для получения раствора 33% HBr/уксусная кислота, был эмалирован для того, чтобы предотвратить образование загрязняющих примесей, которые могли бы затем влиять на чистоту, например, GA. Чтобы предотвратить контакт раствора HBr с металлом, части используемых трубок были покрыты с внутренней стороны тефлоном. Сходным образом, другие типы нереакционно-способных, устойчивых к кислоте неметаллических устройств можно использовать для того, чтобы предотвратить образование следовых количеств ионов металлов в растворе HBr/уксусная кислота. Использование неметаллического устройства для получения раствора HBr/уксусная кислота было результативно при устранении красного окрашивания GA. Когда неметаллическое устройство использовали для получения раствора HBr/уксусная кислота, результат заключался в том, что раствор, по существу, не содержал ионов металлов, и красный GA не образовывался.

В дополнение, цветность каждой части HBr/уксусная кислота измеряли для того, чтобы определить уровень загрязняющих примесей до использования ее для снятия защитных групп с защищенного GA. Обнаружено, что уровни загрязняющих примесей ионами металлов в растворе HBr можно определить визуальным анализом. Раствор HBr с цветностью ниже 2000 APHA, как показали, приводил к получению

глатирамера ацетата без красного окрашивания.

Изобретение проиллюстрировано в качестве неограничивающих примеров следующими ниже примерами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

ПРИМЕР 1 - ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БРОМА В РАСТВОРЕ HBr/УКСУСНАЯ КИСЛОТА НА СОДЕРЖАНИЕ БРОМИРОВАННОГО ТИРОЗИНА В TFA-GA И В GA

Для того чтобы определить воздействие свободного брома в растворе бромистоводородная кислота/уксусная кислота на уровни доли загрязняющих примесей бромированного тирозина в TFA-GA и GA, бромистоводородную кислоту в уксусной кислоте загрязняли различными количествами брома. В эксперименте HBr, который предварительно не обрабатывали акцептором брома, использовали в способе промышленного производства. Добавляли различные уровни загрязняющих примесей брома (измеренные в виде процентного соотношения в растворе HBr/уксусная кислота). Уровень доли загрязняющей примеси бромированного тирозина в TFA-GA и GA измеряли гидролизом TFA-GA и GA до их аминокислотных компонентов, и затем используя ВЭЖХ для того, чтобы определить количество бромтирозина относительно TFA-GA и GA.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ

Приготовление стандартных растворов

Стандартные растворы, содержащие 2 мкг/мл бромтирозина, приготавливали, используя дистиллированную воду. Маточный раствор стандарта аминокислот приготавливали, используя перечисленные ниже аминокислоты:

L-Glu	Приблизительно 100 мг
L-Ala	Приблизительно 130 мг
L-Tyr	Приблизительно 75 мг
L-Lys HCl	Приблизительно 200 мг

Аминокислоты растворяли в воде. Добавляли несколько капель 5н. NaOH и воду добавляли до конечного объема 25 мл.

Гидролиз

10 мг глатирамера ацетата и 10 мг TFA-GA каждый независимо взвешивали в пробирках для гидролиза объемом 5 мл. Пробирку с отрицательным контролем приготавливали, добавляя 0,5 мл маточного раствора стандарта аминокислот в пробирку для гидролиза объемом 5 мл. 0,5 мл воды и 0,5 мл концентрированной HCl, содержащей 1% фенол, добавляли в каждую из пробирок. Пробирки нагревали до 110°C в течение 24 часов в атмосфере N₂. Образцы затем охлаждали до комнатной температуры. Каждый из гидролизатов переносили в мерную колбу объемом 5 мл и заполняли до указанного объема дистиллированной водой.

Хроматография

Стандарт бромтирозина и каждый из гидролизатов независимо элюировали с колонки ВЭЖХ, используя смесь растворителей для элюирования ацетонитрил:вода: уксусная кислота в соотношении 4:95:1. Колонку оборудовали УФ-детектором и системой регистрации данных. Стандарты аминокислот используют в качестве отрицательного контроля для того, чтобы определить, какой пик в гидролизате глатирамера ацетата, соответствует бромтироzinу.

Анализ данных

Процентное соотношение доли бромированного тирозина в каждом образце TFA-

GA и ГА вычисляли, как приведено ниже:

P = чистота стандарта бромтирозина (в процентах)

A_s = Площадь пика стандарта бромтирозина

A_p = Площадь пика бромтирозина в каждом образце

C_s = Концентрация стандарта бромтирозина (мкг/мл)

C_p = Концентрация глатирамера ацетата (или TFA-GA)

$$\% \text{ Бромированного тирозина} = P \cdot \frac{A_p}{A_s} \cdot \frac{C_s}{C_p}$$

В таблице 1 показано влияние свободного брома на уровни доли бромированного тирозина в TFA-глатирамера ацетате и в глатирамера ацетате

Таблица 1 Влияние свободного брома на уровень доли бромированного тирозина		
Бром (%)	Бромированный тирозин (%)	
	TFA-глатирамер	Глатирамера ацетат
Не добавляли бром	0,1	0,2
0,5	0,7	1,2
1	1,2	2,2
5	4	Нет данных

Результаты

Из описанного выше примера можно увидеть, что загрязнение HBr бромом приводит к более высоким уровням доли бромированного тирозина в TFA-GA и в ГА относительно стандартной реакции, в которой не добавляли бром. Когда не добавляли брома, то, поскольку HBr не обрабатывали акцептором брома, некоторое количество свободного брома все еще имелось в наличии, и загрязнение GA и TFA-GA долей бромированного тирозина все еще было выражено.

Для того чтобы получить ГА с загрязняющей примесью долей бромированного тирозина при уровне менее чем 0,2%, уровень свободного брома в HBr необходимо снижать добавлением акцептора брома.

ПРИМЕР 2 - ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРА 33% HBr В УКСУСНОЙ КИСЛОТЕ

Эмалированный реактор ополаскивают уксусной кислотой, затем осушают. 1013 кг уксусной кислоты добавляют в реактор. Уксусную кислоту сохраняют при температуре 10-20°C. 522 кг газа HBr вводят в реактор, перемешивая раствор. После того, как введен газ, раствор перемешивают в течение дополнительных 30 минут. Раствор проверяют для того, чтобы определить, составляет ли содержание HBr 33%.

ПРИМЕР 3 - ОЧИЩЕНИЕ РАСТВОРА HBr/УКСУСНАЯ КИСЛОТА, ИСПОЛЬЗУЯ ФЕНОЛ В КАЧЕСТВЕ АКЦЕПТОРА БРОМА

Раствор 33% HBr в уксусной кислоте выливали в эмалированный реактор. Фенол взвешивали и добавляли к раствору HBr в весовом соотношении 1 к 100. Затем раствор перемешивали в течение от 12 до 24 часов. Затем очищенный раствор HBr добавляли к защищенному глатирамера ацетату. Реакция HBr с защищенным ГА приводит к образованию TFA-GA. TFA-GA взаимодействует с пиперидином для получения ГА.

ПРИМЕР 4 - УРОВНИ БРОМИРОВАННОГО ТИРОЗИНА В РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ

Уровень доли бромированного тирозина в различных частях глатирамера ацетата измеряли, используя способ, описанный в примере 1.

Способ получения	Номер части GA	Концентрация доли бромированного тирозина
------------------	----------------	---

Старый способ	A	0,15
	B	0,19
	C	0,14
	D	0,15
	E	0,32
Новый способ	X	Неподдающийся обнаружению
	Y	Неподдающийся обнаружению
	Z	Неподдающийся обнаружению

Результаты

НВг, полученный с использованием нового способа, как описано в примере 2, и обработанный фенолом, как описано в примере 3, не содержал свободного брома и загрязняющих примесей металлов. Поэтому глатирамера ацетат, который получили, по существу, не содержал доли бромированного тирозина.

НВг, который приобретали у поставщиков (старый способ), содержал загрязняющие примеси, и поэтому глатирамера ацетат, полученный с его использованием, также содержал загрязняющие примеси доли бромированного тирозина, даже при том, что фенол использовали в качестве акцептора тирозина.

ПРИМЕР 5 - ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦВЕТНОСТИ

Цветность раствора НВг/уксусная кислота определяли, используя стандартные визуальные способы определения цветности.

Индекс цветности согласно Американской ассоциации общественного здоровья (АРНА) представляет собой простой номер степени пожелтения, где каждая единица АРНА основана на разведении 500 ч/млн маточного раствора платина-кобальт (PtCo) (HunterLab, АРНА Background, Applications Note, Insight on Color November 16-30, 1996, Vol. 8, No. 16., доступны на сайте <http://www.hunterlab.com/appnotes/anll96br2.pdf>). Показатель АРНА определяют посредством визуального сравнения раствора со стандартами PtCo, которые содержат контролируемое количество платины-хлористоводородного калия и хлорида кобальта. Каждая единица номера эквивалентна 1 мг платины на литр раствора (ч/млн). Стандарты и соответствующие показатели обозначены согласно их показателю ч/млн, то есть стандарт АРНА №20 содержит 20 ч/млн платины (American Chemical Society, General Directions and Procedures: Measurement of Physical Properties, доступен на сайте <http://pubs.acs.org/reagentdemo/secb002.html>.), дистиллированная вода имеет величину АРНА 0 и маточный раствор имеет величину АРНА 500 ч/млн (HunterLab, АРНА Background, Applications Note, Insight on Color November 16-30, 1996, Vol. 8, No. 16., доступны на сайте <http://www.hunterlab.com/appnotes/anll96br2.pdf>). Измерение АРНА можно осуществить при помощи различных устройств, хорошо известных в данной области.

Получали стандарт цветности АРНА «500» и стандарт цветности АРНА «1000». Стандарт цветности АРНА «500» получали, растворяя 1,246 г платины-хлористоводородного калия, K_2PtCl_6 (эквивалентного 50 мг металлической платины) и 1,00 г кристаллического хлорида кобальта, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (эквивалентного приблизительно 250 мг металлического кобальта) в дистиллированной воде с использованием 100 мл концентрированной HCl и разбавляли дистиллированной водой до 1000 мл.

Стандарт цветности АРНА «1000» получали, растворяя 2,492 г платины-хлористоводородного калия K_2PtCl_6 и 2,00 г кристаллического хлорида кобальта $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ в дистиллированной воде с использованием 200 мл концентрированной HCl и разбавляли дистиллированной водой до 1000 мл.

Следующие ниже части получали, используя неметаллическое устройство, как описано выше. Данные образцы визуально проверяли на цветность относительно стандартов цветности, визуально рассматривая цилиндры Несслера объемом 100 мл вертикально на белом фоне.

Номер части	Цветность (АРНА)
M	<500
N	<500
P	700
Q	350
R	<500

Цветность данных частей НВг/уксусная кислота указывает на то, что они, по существу, не содержат брома и загрязняющих примесей ионов металлов. Поскольку цветность составляла менее чем 2000 АРНА, данные части, как считали, по существу, не содержат загрязняющие примеси ионов металлов.

Формула изобретения

1. Способ получения смеси трифторацетил-глатирамера ацетата, где во время технологического процесса для части смеси полипептидов, каждая из которых состоит, по существу, из аланина, γ -бензилглутамата, тирозина и трифторацетиллизина, происходит снятие защитных групп раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, включающий стадию предварительной обработки раствора бромистоводородной кислоты акцептором брома для удаления свободного брома.

2. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и глатирамер ацетат, включающий

а) полимеризацию N-карбоксиангидридов тирозина, аланина, γ -бензилглутамата и трифторацетиллизина для образования смеси защищенных полипептидов;

б) снятие защитных групп раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, в котором раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте предварительно обрабатывают акцептором брома для того, чтобы удалить свободный бром с образованием смеси трифторацетил-полипептидов;

в) взаимодействие трифторацетил-глатирамера ацетата с водным пиперидином для образования раствора водного трифторацетил-глатирамера ацетата и

д) очистку глатирамера ацетата.

3. Способ по п.2, дополнительно включающий стадию d) ультрафильтрации для удаления полипептидов с молекулярной массой менее 5000 Да.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте представляет собой раствор 10-36%-ной бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте.

5. Способ по п.4, в котором раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте представляет собой раствор 33%-ной бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте.

6. Способ по любому из пп.1, 2, 3 или 5, в котором акцептор брома представляет собой фенол.

7. Способ по любому из пп.1, 2, 3 или 5, в котором цветность раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте составляет менее чем 2000 АРНА до менее чем 500.

8. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и глатирамер ацетат, где глатирамер ацетат имеет

предварительно определенное процентное соотношение бромированного тирозина, допустимое для включения в состав фармацевтической композиции, который включает получение части глатирамера ацетата;

измерение процентного соотношения бромированного тирозина в части способом, включающим

- a) гидролиз части для получения гидролизата;
- b) элюирование гидролизата из хроматографической колонки;
- c) измерение уровня бромтирозина в гидролизате;
- d) приготовление растворов образцов аминокислотных компонентов части и бромтирозина;
- e) элюирование растворов образцов из колонки стадии b) и
- f) вычисление процентного соотношения бромированного тирозина в части; и включение в состав фармацевтической композиции части, только если процентное соотношение измеренного таким образом бромированного тирозина в ней менее чем 0,3%.

9. Способ по п.8, в котором часть пригодна для включения в состав фармацевтической композиции, только если процентное соотношение измеренного таким образом бромированного тирозина в ней менее чем 0,2%.

10. Способ по п.9, в котором часть пригодна для включения в состав фармацевтической композиции, только если процентное соотношение измеренного таким образом бромированного тирозина в ней менее чем 0,1%.

11. Трифторацетил-глатирамер ацетат, имеющий не более чем 0,1% бромированного тирозина и менее чем 1000 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов.

12. Трифторацетил-глатирамер ацетат по п.11, имеющий необходимую среднюю молекулярную массу от 2000 до 40000 Да, или от 4000 до 19000 Да, или 7000 ± 2 Да, или 7000 Да.

13. Трифторацетил-глатирамер ацетат по п.11, имеющий необходимую среднюю молекулярную массу от 4700 до 11000 Да.

14. Трифторацетил-глатирамер ацетат по любому из пп.11-13, в котором смесь содержит менее чем 500 ч/млн загрязняющих примесей ионов металлов или свободна от металлических примесей.

15. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и глатирамер ацетат, включающий

- a) полимеризацию N-карбоксиангидридов тирозина, аланина, γ -бензилглутамата и трифторацетиллизина для образования защищенного глатирамер ацетата;
- b) снятие защитных групп раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте для образования трифторацетил глатирамер ацетата;
- c) взаимодействие трифторацетил глатирамера ацетата с водным пиперидином для образования раствора водного глатирамера ацетата и

a) очистку смеси глатирамера ацетата, включающий предварительную обработку раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте с акцептором брома перед использованием раствора на стадии b) для снятия защитных групп защищенного глатирамера ацетата.

16. Способ получения глатирамера ацетата, включающий стадию снятия защитных групп защищенного глатирамера ацетата раствором бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, включающий предварительную обработку раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте с акцептором брома перед

использованием раствора для снятия защитных групп защищенного глатирамера ацетата.

17. Способ по п.15, в котором раствор представляет собой раствор 10-36%-ной бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте.

5

18. Способ по п.15, в котором раствор представляет собой раствор 33%-ной бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте.

19. Способ по п.16, в котором раствор представляет собой раствор 10-36%-ной бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте.

10

20. Способ по п.16, в котором раствор представляет собой раствор 33%-ной бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте.

15

20

25

30

35

40

45

50