



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0515033-7 B1**



**(22) Data do Depósito: 09/09/2005**

**(45) Data de Concessão: 25/05/2021**

**(54) Título:** PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA MISTURA DE POLIPEPTÍDEOS DE TRIFLUOROACETILA, MISTURA DE POLIPEPTÍDEOS DE TRIFLUOROACETILA, E, PROCESSOS PARA A OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E PARA A PRODUÇÃO DE ACETATO DE GLATIRÂMERO

**(51) Int.Cl.:** C07K 14/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 09/09/2004 US 60/608,843.

**(73) Titular(es):** TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD..

**(72) Inventor(es):** BEN-ZION DOLITZKY.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2005032395 de 09/09/2005

**(87) Publicação PCT:** WO 2006/029393 de 16/03/2006

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 08/03/2007

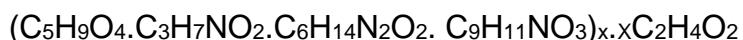
**(57) Resumo:** PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA MISTURA DE POLIPEPTÍDEOS DE TRIFLUOROACETILA, PRODUTO DE TRIFLUOROACETILA, COMPOSIÇÃO, MISTURA DE POLIPEPTÍDEOS DE TRIFLUOROACETILA, E, PROCESSOS PARA A OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PARA A PRODUÇÃO DE ACETATO DE GLATIRÂMERO E PARA A ANÁLISE DA PERCENTAGEM DE TIROSINA BROMADA EM UMA AMOSTRA DE ACETATO DE GLATIRÂMERO. A invenção em questão fornece um processo aperfeiçoado para a obtenção de uma mistura de polipeptídeos que têm seqüências de aminoácido não uniformes, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e lisina, em que a mistura de polipeptídeos resultante compreende menos do que 0,3 % de tirosina bromada e menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

**"PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA MISTURA DE POLIPEPTÍDEOS DE TRIFLUOROACETILA, MISTURA DE POLIPEPTÍDEOS DE TRIFLUOROACETILA, E, PROCESSOS PARA A OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E PARA A PRODUÇÃO DE ACETATO DE GLATIRÂMERO"**

**[0001]** Em todo este pedido de patente várias publicações são citadas por suas referências completas. As divulgações destas publicações em suas totalidades são aqui incorporadas como referência neste pedido de patente para descrever mais completamente o estado da técnica ao qual pertence esta invenção.

#### Fundamento da Invenção

**[0002]** Uma mistura de polipeptídeos que não tenham a mesma seqüência de aminoácido citada como acetato de glatirâmero (GA) é comercializada sob o nome comercial Copaxone ® e compreende os sais acetatos de polipeptídeos que contêm ácido L-glutâmico, L-alanina, L-tirosina e L-lisina em frações molares médias de 0,141, 0,427, 0,095 e 0,338, respectivamente. O peso molecular médio de Copaxone ® está entre 4.700 e 11.000 daltons. ("Copaxone", Physician's Desk Reference, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115.) Quimicamente, o designado como acetato de glatirâmero polímero do ácido L-glutâmico com L-alanina, L-lisina, L-tirosina, acetato (sal). A sua fórmula estrutural é



**[0003]** CAS- 147245-92-9

**[0004]** ("Copaxone", Physician's Desk Reference, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115.)

**[0005]** O acetato de glatirâmero é aprovado para a redução da freqüência de recaída em pacientes com recaída-remissão de esclerose múltipla. A esclerose múltipla foi classificada como uma doença autoimune. O acetato de glatirâmero também foi divulgado para uso no tratamento de outras doenças autoimunes (Publicação Nº. US 2002/0055466 A1 de R. Aharoni e outros), doenças inflamatórias não autoimunes (Publicação Nº. US 2005/0014694 A1 de V. Wee Yong e outros e Pedido de Patente US Nº. 2002/0077278 A1, publicado em 20 de junho de 2002

(Young e outros)) e para promover a regeneração dos nervos e/ou para prevenir ou inibir a degeneração secundária que pode seguir os danos ao sistema nervoso principal (Publicação Nº. US 2003/0004099 A1 de M. Eisenbach-Schwartz e outros e Pedido de Patente Nº. 2002/0037848 A1, publicado em 28 de março de 2002 (Eisenbach-Schwartz)). Além disso, o acetato de glatirâmero foi divulgado como um tratamento para doenças imunes mediadas (por exemplo, a Patente U.S. Nº. 6.514.938 B1, concedida em 4 de fevereiro de 2003 (Gad e outros)); PCT Publicação Internacional Nº. WO 01/60392, publicada em 23 de agosto, 2001 (Gilbert e outros) e PCT International Publicação Nº. WO 00/27417, publicado em 19 de maio de 2000 (Aharoni e outros) assim como doenças associadas com desmielinização (PCT Publicação Internacional Nº. WO -1/97846, publicado em 27 de dezembro de 2001 (Moses e outros)).

**[0006]** O processo de fabricação como detalhado nas patentes acima envolve a reação de polipeptídeos protegidos com 33 % de ácido bromídrico em ácido acético. (Patente U.S. Nº. 5.800.808, concedida em 1º. de setembro de 1998 a Konfino e outros). Esta reação de desproteção remove o grupo protetor gama benzila do 5-carboxilato do resíduo de glutamato e cliva o polímero a polipeptídeos menores para formar um polipeptídeo de trifluoroacetila. (Patente U.S. Nº. 5.800.808, concedida em 1º. de setembro de 1998 a Konfino e outros). O tempo necessário para se obter o GA do peso molecular apropriado de entre 7.000 + 2.000 daltons depende da temperatura da reação e do perfil de peso molecular do acetato de glatirâmero protegido. (Patente U.S. Nº. 5.800.808, concedida em 1º de setembro de 1998 a Konfino e outros). A desproteção ocorre a uma temperatura entre 20 °C e 28 °C (Patente U.S. Nº. 5.800.808, concedida em 1º de setembro de 1998 a Konfino e outros). É realizado um teste de reação em cada batelada a diferentes períodos de tempo para determinar o período de tempo da reação necessário a uma dada temperatura para se conseguir polipeptídeos de trifluoroaceitla de um perfil de peso molecular apropriado (Patente U.S. Nº. 5.981.589, concedida em 9 de novembro de 1999 a Konfino e outros). O período de tempo necessário para a reação está na faixa, por exemplo, entre 10 e 50 horas. (Patente U.S. Nº. 5.800.808, concedida em 1º de setembro de 1998 a Konfino

e outros). Além disso, as Patentes U.S. N°s 5.981.589, 6.048.898, 6.054.430, 6.342.476, 6.362.161 e 6.620.847 também se referem a composições e a processos para a fabricação de mistura de polipeptídeos, inclusive GA.

**[0007]** Esta invenção fornece um processo de fabricação aperfeiçoado.

#### Sumário da invenção

**[0008]** A invenção em questão fornece um processo para a obtenção de uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila que nem todos têm a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetil lisina, em que a mistura tem um peso molecular médio desejado e em que durante o processo uma batelada de uma mistura de polipeptídeos, cada um dos quais consiste essencialmente de alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila, tirosina e trifluoroacetil lisina é desprotegida com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, o melhoramento que compreende o uso de uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 0,5 % de bromo livre.

**[0009]** A invenção em questão também fornece um processo para a obtenção de uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila que nem todos têm a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetil lisina, em que a mistura tem um peso molecular médio desejado e em que durante o processo uma batelada de uma mistura de polipeptídeos, cada um dos quais consiste essencialmente de alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila, tirosina e trifluoroacetil lisina é desprotegida com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, o melhoramento que compreende o uso de uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0010]** A invenção em questão fornece ainda o processo de produção de uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila que nem todos têm a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetil lisina em que a mistura tem um peso molecular médio desejado que compreende a desproteção de uma mistura de polipeptídeos

cada um consistindo essencialmente de alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila, tirosina e trifluoroacetil lisina com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 0,5 % de bromo livre e menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0011]** A invenção em questão também fornece uma composição que compreende o produto trifluoroacetila produzido por qualquer um dos processos da invenção em questão.

**[0012]** A invenção em questão fornece ainda uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila que nem todos têm a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetil lisina em que a mistura tem um peso molecular médio desejado, não maior do que 0,1 % de tirosina bromada e menor do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal. A invenção em questão também fornece uma composição que compreende a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila e um veículo.

**[0013]** A invenção em questão também fornece um processo para a obtenção de uma composição farmacêutica que contém uma mistura de polipeptídeos, nem todos tendo a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e lisina e em que a mistura tem um peso molecular médio desejado, que compreende

- a) a polimerização de N-carboxianidridos de tirosina, alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila e N-trifluoroacetil lisina para formar uma mistura de polipeptídeos protegidos;
- b) a desproteção dos polipeptídeos protegidos com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, a solução compreende menos do que 0,5 % de bromo livre e menos do que 1000 ppm impurezas de íon de metal, para formar uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila;
- c) a reação da mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila com piperidina aquosa para formar uma solução de mistura aquosa de polipeptídeos, cada um dos quais consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e lisina e

d) purificação da mistura de polipeptídeos.

**[0014]** A invenção em questão também fornece o processo de produção de acetato de glatirâmero que compreende as etapas de:

- a) polimerização de N-carboxianidridos de tirosina, alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila e N-trifluoroacetil lisina para formar o acetato de glatirâmero protegido;
- b) desproteção do acetato de glatirâmero protegido com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, a solução que compreende menos do que 0,5 % de bromo livre e menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal, para formar o acetato de trifluoroacetil glatirâmero;
- c) reação do acetato de trifluoroacetil glatirâmero com piperidina aquosa para formar uma solução de acetato de glatirâmero e
- d) purificação do acetato de glatirâmero.

**[0015]** A invenção em questão fornece também ainda um processo de análise da percentagem de tirosina bromada em uma amostra de acetato de glatirâmero que compreende as etapas de:

- a) hidrolise do acetato de glatirâmero para se obter um hidrolisado;
- b) eluição do hidrolisado através de uma coluna cromatográfica;
- c) medida do nível de bromotirosina no hidrolisado;
- d) preparação de soluções de amostra dos componentes de aminoácido de acetato de glatirâmero e de bromotirosina;
- e) eluição das soluções de amostra através da coluna da etapa b) e
- f) cálculo da percentagem de tirosina bromada no acetato de glatirâmero.

**[0016]** A invenção em questão também fornece um processo para a preparação de uma composição farmacêutica que contém uma mistura de polipeptídeos que não tenham a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de ácido glutâmico, alanina, tirosina e lisina, em que a mistura tem uma percentagem predeterminada de tirosina bromada aceitável para inclusão em uma composição farmacêutica, que compreende a obtenção de uma batelada de uma mistura de polipeptídeos que tenham seqüências de aminoácido não uniformes, em

que cada polipeptídeo consiste essencialmente de ácido glutâmico, alanina, tirosina e lisina; medindo a percentagem de tirosina bromada da batelada por um processo que compreende

- a) hidrólise da batelada para obter um hidrolisado;
- b) eluição do hidrolisado através de uma coluna cromatográfica;
- c) medida do nível de bromotirosina no hidrolisado;
- d) preparação de soluções da amostra dos componentes de aminoácido da batelada e da bromotirosina;
- e) eluição das soluções da amostra através da coluna da etapa b) e
- f) cálculo da percentagem de tirosina bromada na batelada e

**[0017]** incluindo na composição farmacêutica uma batelada somente se a sua percentagem de tirosina bromada assim medida for menor do que 0,3 %.

#### Descrição Detalhada da Invenção

**[0018]** A invenção em questão fornece um processo para a obtenção de uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila que nem todos têm a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetil lisina, em que a mistura tem um peso molecular médio desejado e em que durante o processo uma batelada de uma mistura de polipeptídeos, cada um dos quais consiste essencialmente de alanina, glutamato de gama-benzila, tirosina trifluoroacetil lisina é desprotegido com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, o melhoramento que compreende o uso de uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 0,5 % de bromo livre.

**[0019]** Em uma modalidade, o melhoramento que compreende o uso de uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0020]** A invenção em questão também fornece um processo para a obtenção de uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila que nem todos tenham a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetil lisina, em que a mistura tem um peso

molecular médio desejado e em que durante o processo uma batelada de uma mistura de polipeptídeos, cada um dos quais consiste essencialmente de alanina, trifluoroacetil lisina é desprotegido com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, o melhoramento que compreende o uso de uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0021]** A invenção em questão também fornece ainda um processo para a produção de uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila que nem todos têm a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetil lisina, em que a mistura em que a mistura tem um peso molecular médio desejado e em que durante o processo uma batelada de uma mistura de polipeptídeos, cada um dos quais consiste essencialmente de alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila, tirosina e trifluoroacetil lisina é desprotegido com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, o melhoramento que compreende o uso de uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0022]** A invenção em questão também fornece ainda um processo para a produção de uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila que nem todos têm a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetil lisina, em que a mistura em que a mistura tem um peso molecular médio desejado que compreende desproteger uma mistura de polipeptídeos cada um consistindo essencialmente de alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila, tirosina e trifluoroacetil lisina com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 0,5 % de bromo livre e menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0023]** Em uma modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético compreende menos do que 0,1 % de bromo livre.

**[0024]** Em uma outra modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético compreende menos do que 0,05 % de bromo livre.

**[0025]** Em uma outra modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético

compreende menos do que 0,01% de bromo livre.

**[0026]** Em uma outra modalidade ainda, a solução de ácido bromídrico em ácido acético comprehende menos do que 0,001% de bromo livre.

**[0027]** Em uma outra modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético é isenta de bromo livre.

**[0028]** Em uma outra modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético comprehende menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0029]** Em uma outra modalidade ainda, a solução de ácido bromídrico em ácido acético comprehende menos do que 500 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0030]** Em uma modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético comprehende menos do que 100 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0031]** Em uma modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético comprehende menos do que 30 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0032]** Em uma outra modalidade ainda, a solução de ácido bromídrico em ácido acético comprehende menos do que 20 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0033]** Em uma outra modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético comprehende menos do que 10 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0034]** Em uma outra modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético é isenta de impurezas de íon de metal.

**[0035]** Em uma outra modalidade ainda, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila é o acetato de trifluoroacetil glatirâmero ("TFA GA").

**[0036]** Em uma modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético é de desde 10 % até 36 % de ácido bromídrico em ácido acético. Em uma outra modalidade, o ácido bromídrico em ácido acético é de desde 16 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 18 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 20 % até 37 % de ácido bromídrico em ácido acético; 20 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 22 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 24 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 25 % até 35 % de ácido bromídrico em ácido acético; 26 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 28 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 30 % até 34 % de ácido bromídrico em ácido acético; 30

% até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético ou 32 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético. Em uma outra modalidade, a solução é de 16 % de ácido bromídrico em ácido acético.

[0037] Em uma outra modalidade, a solução é pré-tratada com um agente de remoção de bromo para remover o bromo livre.

[0038] Em uma modalidade, o agente de remoção de bromo é o fenol.

[0039] Em uma outra modalidade, a solução é produzida em um reator não metálico.

[0040] Em uma outra modalidade, a solução é preparada em um reator com revestimento interno de vidro ou com um revestimento interno de Teflon.

[0041] Em uma outra modalidade ainda, a cor da solução de ácido bromídrico em ácido acético é menor do que 2000 APHA.

[0042] Em uma outra modalidade, a cor da solução de ácido bromídrico em ácido acético é menor do que 1000 APHA.

[0043] Em uma outra modalidade, a cor da solução de ácido bromídrico em ácido acético é menor do que 700 APHA.

[0044] Em uma outra modalidade ainda, a cor da solução de ácido bromídrico em ácido acético é menor do que 500 APHA.

[0045] A invenção em questão também fornece um produto de trifluoroacetila produzido por qualquer um dos processos divulgados.

[0046] A invenção em questão fornece ainda uma composição que compreende o produto de trifluoroacetila produzido por qualquer um dos processos divulgados e um veículo.

[0047] A invenção em questão também fornece ainda uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila que nem todos têm a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetil lisina, em que a mistura tem um peso molecular médio desejado, não maior do que 0,1 % de tirosina bromada e menor do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

[0048] Em uma modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila tem um

peso molecular médio de desde 2000 daltons até 40.000 daltons.

[0049] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila tem um peso molecular médio de desde 4000 daltons até 18.000 daltons.

[0050] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila tem um peso molecular médio de desde 4000 daltons até 13.000 daltons.

[0051] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila tem um peso molecular médio de desde 13.000 daltons até 19.000 daltons.

[0052] Em uma outra modalidade ainda, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila tem um peso molecular médio de desde 13.500 daltons até 18.500 daltons.

[0053] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila tem um peso molecular médio de desde 7.000 até + 2.000 daltons.

[0054] Em uma outra modalidade ainda, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila tem um peso molecular médio de 7.000 daltons.

[0055] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila tem um peso molecular médio de 14.000 daltons.

[0056] Em uma outra modalidade ainda, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila tem um peso molecular médio de desde 4.700 – 11.000 daltons.

[0057] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila comprehende menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal.

[0058] Em uma outra modalidade ainda, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila comprehende menos do que 500 ppm de impurezas de íon de metal.

[0059] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila comprehende menos do que 100 ppm de impurezas de íon de metal.

[0060] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila comprehende menos do que 30 ppm de impurezas de íon de metal.

[0061] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila comprehende menos do que 20 ppm de impurezas de íon de metal.

[0062] Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila comprehende menos do que 10 ppm de impurezas de íon de metal.

**[0063]** Em uma outra modalidade ainda, a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila é isenta de impurezas de íon de metal.

**[0064]** A invenção em questão também fornece uma composição que compreende a mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila e um veículo.

**[0065]** A invenção em questão também fornece um processo para a obtenção de uma composição farmacêutica que contém uma mistura de polipeptídeos, nem todos tendo a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e lisina, em que a mistura tem um peso molecular médio desejado, que compreende

- a) a polimerização de N-carboxianidridos de tirosina, alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila e N-trifluoroacetil lisina para formar uma mistura aquosa de polipeptídeos protegidos;
- b) a desproteção dos polipeptídeos protegidos com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal, para formar uma mistura aquosa de polipeptídeos de trifluoroacetila.
- c) a reação de uma mistura aquosa de polipeptídeos de trifluoroacetila com piperidina aquosa para formar uma solução de mistura aquosa de polipeptídeos, cada um dos quais consiste essencialmente de alanina, ácido glutâmico, tirosina e lisina e
- d) purificação da mistura aquosa de polipeptídeos.

**[0066]** Em uma modalidade, a fração molar média na mistura é ácido glutâmico 0,129 - 0,159; alanina 0,392 - 0,462; tirosina 0,086 - 0,100 e lisina 0,300 - 0,374. Em uma modalidade específica, a fração molar média na mistura de ácido glutâmico é 0,141, de alanina é 0,427, de tirosina é 0,093 e de lisina é 0,337.

**[0067]** A invenção em questão também fornece um processo de produção de acetato de glatirâmero que compreende as etapas de:

- a) polimerização de N-carboxianidridos de tirosina, alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila e N-trifluoroacetil lisina para formar o acetato de glatirâmero protegido;

- b) desproteção do acetato de glatirâmero protegido com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, a solução compreende menos do que 0,5 % de bromo livre e menos do que 1000 ppm de impurezas de íon de metal, para formar o acetato de trifluoroacetil glatirâmero;
- c) reação do acetato de trifluoroacetil glatirâmero com piperidina aquosa para formar uma solução de acetato de glatirâmero e
- d) purificação do acetato de trifluoroacetil glatirâmero.

**[0068]** Em uma modalidade, o produto da etapa d) ainda é sujeito a ultrafiltração para remover espécies de polipeptídeo com peso molecular menor do que 5000 daltons.

**[0069]** Em uma modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético é de desde 10 % até 36 % de ácido bromídrico em ácido acético em ácido acético. Em uma outra modalidade, o ácido bromídrico em ácido acético é de desde 16 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético em ácido acético; 18 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 20 % até 37 % de ácido bromídrico em ácido acético; 20 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 22 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 24 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 25 % até 35 % de ácido bromídrico em ácido acético; 26 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 28 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético; 30 % até 34 % de ácido bromídrico em ácido acético; 30 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético ou 32 % até 33 % de ácido bromídrico em ácido acético. Em uma outra modalidade, a solução é de 33 % de ácido bromídrico em ácido acético. Em uma outra modalidade, a solução é de 16 % de ácido bromídrico em ácido acético.

**[0070]** Em uma outra modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético é pré-tratada com um agente de remoção de bromo para remover bromo livre.

**[0071]** Em uma outra modalidade ainda, o agente de remoção de bromo é fenol.

**[0072]** Em uma outra modalidade, a solução de ácido bromídrico em ácido acético é produzida em um reator não metálico.

**[0073]** Em uma outra modalidade, a solução é preparada em um reator com revestimento interno de vidro ou com um revestimento interno de Teflon.

[0074] Em uma outra modalidade, a cor da solução de ácido bromídrico em ácido acético é menor do que 2000 APHA.

[0075] Em uma outra modalidade, a cor da solução de ácido bromídrico em ácido acético é menor do que 1000 APHA.

[0076] Em uma outra modalidade ainda, a cor da solução de ácido bromídrico em ácido acético é menor do que 700 APHA.

[0077] Em uma outra modalidade ainda, a cor da solução de ácido bromídrico em ácido acético é menor do que 500 APHA.

[0078] A invenção em questão também fornece um processo de analisar a percentagem de tirosina bromada em uma amostra de acetato de glatirâmero que compreende as etapas de:

- a) hidrólise do acetato de glatirâmero para obter um hidrolisado;
- b) eluição do hidrolisado através de uma coluna cromatográfica;
- c) medida do nível de bromotirosina no hidrolisado;
- d) preparação de soluções de amostra dos componentes de aminoácido de acetato de glatirâmero e de bromotirosina;
- e) eluição das soluções de amostra através da coluna da etapa b) e
- f) cálculo da percentagem de tirosina bromada no acetato de glatirâmero.

[0079] A invenção em questão também fornece um processo para a preparação de uma composição farmacêutica que contém uma mistura de polipeptídeos, nem todos tendo a mesma seqüência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de ácido glutâmico, alanina, tirosina e lisina, em que a mistura tem uma percentagem predeterminada de tirosina bromada aceitável para inclusão em uma composição farmacêutica, que compreende a obtenção de uma batelada de uma mistura de polipeptídeos que têm seqüências não uniformes de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste essencialmente de ácido glutâmico, alanina, tirosina e lisina; medida da percentagem de tirosina bromada da batelada por um processo que compreende

- a) hidrólise da batelada para obter um hidrolisado;
- b) eluição do hidrolisado através de uma coluna cromatográfica;

- c) medida do nível de bromotirosina no hidrolisado;
- d) preparação de soluções de amostra dos componentes de aminoácido de acetato de glatirâmero e da bromotirosina;
- e) eluição das soluções de amostra através da coluna da etapa b) e
- f) cálculo da percentagem de tirosina bromada na batelada e

**[0080]** inclusão na composição farmacêutica de uma batelada somente se a sua percentagem de tirosina bromada assim medida for menor do que 0,3 %.

**[0081]** Em uma modalidade, a batelada é aceitável para inclusão na composição farmacêutica somente se a sua percentagem de tirosina bromada assim medida for menor do que 0,2 %.

**[0082]** Em uma outra modalidade, a batelada é aceitável para inclusão na composição farmacêutica somente se a sua percentagem de tirosina bromada assim medida for menor do que 0,1 %.

**[0083]** Em uma outra modalidade, a mistura de polipeptídeos é o acetato de glatirâmero ("GA").

#### TERMOS

**[0084]** O termo "peso molecular médio" como usado neste pedido de patente significa o peso molecular da espécie de polipeptídeos presentes na mistura na mais alta proporção relativa (isto é, pico máximo) quando a mistura for sujeita à separação por peso molecular em uma coluna de permeação em gel HPLC. Este valor pode ser obtido de diversas maneiras, por exemplo, pelo tempo de retenção em uma coluna calibrada ou de uma correlação entre localização do pico e localização do marcadores de copolímero co-cromatografados de seqüência e peso molecular definidos. Outros métodos para a determinação de um peso molecular médio tais como difusão de luz podem ser empregados e irão corresponder substancialmente ao valor obtido partindo do pico máximo.

**[0085]** Uma mistura de polipeptídeo de acordo com esta invenção como exemplificado é o sal acetato de polipeptídeos sintéticos preparados por reação química de quatro derivados de aminoácido ativados (dois deles L-Ácido glutâmico e L-lisina protegidos): Ácido L-glutâmico (L-Glu), L-alanina (L-Ala), L-tirosina (L-Tyr) e

L-lisina (L-Lys) (dois deles protegidos isto é, derivado de 5Bz-Glutamato e derivado de 6N-TFA-Lisina) em uma razão especificada. O termo “mistura” como usado neste documento geralmente se refere à mistura de polipeptídeos da invenção “que compreende Ácido L-glutâmico, L-alanina, L-tirosina e L-lisina e entende-se que ambos os termos incluem impurezas residuais provenientes do processo de fabricação.

**[0086]** A faixa de fração molar de cada resíduo de aminoácido é:

**[0087]** L-Glu 0,129 - 0,153, L-A1a 0,392 - 0,462, L-Tyr 0,086 - 0,100 e L-Lys 0,300 - 0,374.

**[0088]** Sendo que nenhuma reação chega a se completar 100 % e embora praticamente todas as impurezas foram eliminadas, pequenas quantidades pode permanecer. Tais impurezas podem ser dos três tipos seguintes:

- Substâncias relacionadas à estrutura, que são resíduos de aminoácido protegidos tais como resíduos de 5-BZ-L-glutamila e/ou resíduos de N6-TFA-L-Lisila, que se originam da remoção incompleta dos grupos protetores. Além disso, a mistura de polipeptídeo das moléculas da invenção pode conter resíduos de L-tirosila bromados, formados durante a produção em consequência da presença de bromo livre no reagente HBr / ácido acético.

**[0089]** As estruturas moleculares das impurezas identificadas relacionadas à estrutura podem ser derivadas dos monômeros participantes isto é, do materiais de partida.

**[0090]** Estas impurezas identificadas são avaliadas quantitativamente (depois da conversão química) por comparação com Padrões de Referência específicos, que são derivados ou parte das próprias impurezas:

- Compostos de trifluoroacetil a residuais (expressos como fluoreto)
- Resíduos de glutamina benzilados residuais (expressos como brometo de benzila)
- Resíduos de tirosila bromados residuais (expressos como bromotirosina)
- Substâncias relacionadas não identificadas (determinadas por RP-

HPLC): estas são polipeptídeos de pequeno tamanho molecular da mesma origem com estruturas similares. Estas substâncias provavelmente têm fatores de resposta similares e a concentração (%) de cada impureza pode ser calculada como % da área do pico em relação à mistura de polipeptídeo da área do pico da invenção.

**[0091]** A caracterização das impurezas é baseada no seu tempo de retenção cromatográfico relativo (RRT) ao padrão de L-Triptófano.

- Solventes residuais e impurezas inorgânicas recobertas no relatório descritivo tal como solvente residual 1,4 dioxana, piperidina residual e metais pesados.

## DISCUSSÃO

### Bromo Livre

**[0092]** No processo de fabricação para mistura de polipeptídeos, tal como GA, é usado ácido bromídrico em ácido acético a 33 % para desproteger o GA protegido. Por exemplo, durante o desenvolvimento do processo de produção para o GA foi verificado que alguns dos resíduos de tirosina em trifluoroacetil GA (TFA GA) e no GA foram bromados. Esta impureza foi isolada e identificada usando-se um procedimento analítico que é descrito em detalhe nos exemplos. Foi verificado que o resíduo de tirosina reage com bromo para formar um grupamento de mono-bromotirosina que compreende a 2-bromotirosina ou a 3-bromotirosina.

**[0093]** Depois de muita investigação os inventores verificaram que a impureza de tirosina bromada foi introduzida no GA através de bromo livre em HBr/ácido acético. O bromo livre estava presente em 33 % de HBr/ácido acético adquirido de um fornecedor e usado no processo de produção.

**[0094]** Foram tomadas medidas para diminuir o nível de bromo livre em 33 % de HBr/ácido acético. Por exemplo, o pré-tratamento de HBr/ácido acético com um agente de remoção de bromo foi eficaz na remoção de parte do bromo livre da solução de HBr/ácido acético.

**[0095]** Um dos agentes de remoção de bromo usado no processo de purificação do HBr foi o fenol. Além do fenol, podem ser usados outros agentes redutores tal como

o sulfito de sódio. O fenol foi escolhido como um agente de remoção de bromo porque ele e o seu produto da reação com bromo (bromofenóis) são ambos essencialmente não reativos com polipeptídeos protegidos, tais como GA protegido, polipeptídeos de TFA, tais como TFA GA e polipeptídeos tal como GA eles são fáceis de remover da solução de GA durante o processo de purificação. Similarmente, qualquer agente de remoção de bromo pode ser usado contanto que ele e o seu produto da reação com bromo não sejam reativos com os polipeptídeos protegidos, tais como GA protegido, polipeptídeos de TFA, tais como TFA GA e polipeptídeos tal como GA e pode ser facilmente removido durante a purificação o processo de purificação final

#### Impurezas de Metal

**[0096]** O GA é comercializado em duas formas de dosagem farmacêuticas, pó liofilizado e seringas pré-carregadas. As seringas, comercializadas sob o nome comercial Injeção de Copaxone ®, geralmente continha solução transparente. As instruções para armazenagem foram manter a seringa refrigerada. No entanto, foi detectada a cor vermelha em soluções aquosas de Copaxone ® pré-carregadas. A fonte da cor na solução era desconhecida.

**[0097]** A cor surgiu quando as soluções foram mantidas à temperatura ambiente durante 12 a 24 horas.

**[0098]** Foi determinado que a produção de HBr na aparelhagem de metal levou a traços de impurezas de íon metálico no HBr. Quando o HBr foi posteriormente misturado com GA protegido, as impurezas de íon metálico no HBr foram queladas por TFA GA e GA. Estes complexos de TFA GA e de GA/metal contribuíram para a coloração.

**[0099]** Como resultado, uma outra medida considerada para garantir a pureza, por exemplo, no produto GA, foi o uso de um reator não metálico para a produção de solução 33 % de HBr. O reator usado para a produção de solução de HBr/ácido acético era forrado internamente com vidro para evitar a formação de impurezas que pudessem posteriormente afetar a pureza, por exemplo, do GA. Para evitar o contato da solução de HBr com metal, partes da tubulação usada estavam revestidas internamente com Teflon. Similarmente, outros tipos de aparelhagem sem ser de

metal, não reativa, resistente a ácido podem ser usados para evitar a formação de traços de íons de metal na solução de HBr/ácido acético. O uso de uma aparelhagem sem ser de metal para a produção de solução de HBr/ácido acético foi bem sucedida na eliminação da cor vermelha proveniente do GA. Quando a aparelhagem sem ser de metal foi usada para a produção de solução de HBr/ácido acético, o resultado foi que a solução era essencialmente isenta de íons de metal íons e o GA vermelho não se formou.

**[0100]** Além disso, a cor de cada batelada de HBr/ácido acético é medida para determinar o nível de impurezas antes de ser usada para desproteger o GA protegido. Foi verificado que níveis de impureza de íon de metal em solução de HBr podiam ser determinados por análise visual. Foi demonstrado que a solução de HBr com uma cor abaixo de 2000 APHA produz acetato de glatirâmero sem cor vermelha.

**[0101]** A invenção será exemplificadas porém não limitada pelos exemplos a seguir.

#### DETALHES EXPERIMENTAIS

##### EXEMPLO 1- INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÃO DE BROMO EM HBR/ÁCIDO ACÉTICO SOBRE GRUPAMENTO DE TIROSINA BROMADA EM TFA GA E EM GA

**[0102]** Para determinar o efeito de bromo livre em ácido bromídrico / ácido acético sobre o nível de impureza de grupamento tirosina bromado em TFA-GA e GA, o ácido bromídrico em ácido acético foi contaminado com várias quantidades de bromo. No experimento, o HBr que não foi pré-tratado com agente de remoção de bromo foi usado no processo de fabricação. Vários níveis de impureza de bromo (medida como percentagem de solução de HBr/ácido acético) foram adicionados. O nível de impureza de grupamento tirosina bromada em TFA GA e em GA foi medido por hidrólise de TFA GA e GA aos seus componentes de aminoácido e então usando-se HPLC para determinar a quantidade de bromotirosina em relação ao TFA GA e GA.

#### PROCEDIMENTO

##### Preparação de soluções padronizadas

**[0103]** Foram preparadas soluções padronizadas contendo 2 µg / mL de bromotirosina usando-se água destilada. A solução estoque padrão de aminoácido foi

preparada usando-se os aminoácidos a seguir:

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

**[0104]** Os aminoácidos foram dissolvidos em água. Algumas gotas de NaOH 5 N foram adicionadas e a água foi adicionada até um volume final de 25 mL.

#### Hidrólise

**[0105]** 10 mg de acetato de glatirâmero e 10 mg de TFA GA foram cada uma independentemente pesados em pequenos frascos para hidrólise de 5 mL. Foi preparado um pequeno frasco de controle negativo por adição de 0,5 mL da solução de estoque padrão de aminoácido a um pequeno frasco para hidrólise de 5 mL. 0,5 mL de água e 0,5 mL de HCl concentrado contendo 1 % de fenol foram adicionados a cada um dos pequenos frascos. Os pequenos frascos foram aquecidos até 110 °C durante 24 horas, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. As amostras foram então resfriadas até a temperatura ambiente. Cada um dos hidrolisados foi transferido para frascos volumétricos de 5 mL e cheios até volume com água destilada.

#### Cromatografia

**[0106]** O padrão de bromotirosina e cada um dos hidrolisados foram independentemente eluídos através de uma coluna de HPLC que usa um eluente de acetonitrila: água: ácido acético em uma razão de 4: 95: 1. A coluna foi equipada com um detector de UV e sistema de gravação de dados. O padrão de aminoácido é usado como um controle negativo para determinar qual o pico no hidrolisado de acetato de glatirâmero correspondia à bromotirosina.

#### Análise de Dados

**[0107]** A percentagem de grupamento de tirosina bromada em cada amostra de TFA GA e de GA foi calculada como a seguir:

**[0108]** P – pureza de padrão de bromotirosina (em percentagem)

**[0109]** As = Área do pico padrão de bromotirosina

[0110] Ap = Área de pico de bromotirosina em cada amostra

[0111] Cs = Concentração de padrão de bromotirosina ( $\mu\text{g/mL}$ )

[0112] Cp = Concentração de acetato de glatirâmero (ou de TFA GA)

$$[0113] \% \text{ de tirosina bromada} = p * \frac{Ap}{As} * \frac{Cs}{Cp}$$

[0114] A Tabela 1 apresenta o efeito de bromo livre sobre o nível de grupamento de tirosina bromada em TFA Acetato de glatirâmero e em Acetato de glatirâmero

Tabela 1. Efeito de Bromo Livre Sobre o Nível de Grupamento Tirosina Bromada

Bromo (%)	Tirosina Bromada (%)	
	TFA Glatirâmero	Acetato de glatirâmero
Sem bromo adicionado	0,1	0,2
0,5	0,7	1,2
1	1,2	2,2
5	4	Sem Dados

## Resultados

[0115] Pelo exemplo acima pode ser observado que a contaminação de HBr com bromo leva a níveis mais altos de grupamento tirosina bromada em TFA GA e em GA, em relação à reação padronizada em que não foi adicionado bromo. Quando não foi adicionado bromo, como o HBr não foi tratado com um agente de remoção de bromo, algum bromo livre ainda era disponível e a contaminação do grupamento tirosina bromada de GA e TFA GA ainda era evidente.

[0116] Para produzir o GA com impureza de grupamento tirosina bromada a um nível menor do que 0,2 %, o nível de bromo livre em HBr deve ser diminuído pela adição de um agente de remoção de bromo.

## EXEMPLO 2 – PRODUÇÃO DE HBR A 33 % EM SOLUÇÃO EM ÁCIDO ACÉTICO

[0117] O reator revestido internamente de vidro é enxaguado com ácido acético, então esvaziado. 1013 kg de ácido acético são adicionados ao reator. O ácido acético é mantido a uma temperatura de 10 – 20 °C. 522 kg de HBr gasoso são introduzidos no reator enquanto se mistura a solução. Depois que foi introduzido o gás, a solução é misturada durante uns 30 minutos adicionais. A solução é testada para determinar se o teor de HBr é de 33 %.

### EXEMPLO 3 – PURIFICAÇÃO DE SOLUÇÃO DE HBr / ÁCIDO ACÉTICO QUE USA FENOL COMO UM AGENTE DE REMOÇÃO DE BROMO

**[0118]** Uma solução de HBr a 33 % em ácido acético foi despejada em reator revestido internamente de vidro. O fenol foi pesado e adicionado à solução de HBr em uma razão em peso de 1 para 100. A solução é então agitada durante 12 a 24 horas. A solução de HBr purificada é então adicionada a acetato de glatirâmero protegido. A reação do HBr com GA protegido forma TFA GA. O TFA GA é reagido com piperidina para formar o GA.

### EXEMPLO 4 – NÍVEIS DE TIROSINA BROMADA EM VÁRIAS BATELADAS

**[0119]** O nível de grupamento tirosina bromada em várias bateladas de acetato de glatirâmero foi medido usando-se o método descrito no exemplo 1.

Método de Produção	Número da Batelada de GA	Concentração do grupamento tirosina bromada
MÉTODO ANTIGO	A	0,15
	B	0,19
	C	0,14
	D	0,15
	E	0,32
MÉTODO NOVO	X	Não pode ser detectada
	Y	Não pode ser detectada
	Z	Não pode ser detectada

### Resultados

**[0120]** O HBr produzido utilizando-se o novo método, como descrito no exemplo 2 e tratado com fenol como no exemplo 3, estava isento de bromo e de impurezas metálicas. Portanto o acetato de glatirâmero que foi produzido era substancialmente isento de grupamento tirosina bromada.

**[0121]** O HBr que foi adquirido de fornecedores externos (método antigo) tinha impurezas e portanto o acetato de glatirâmero produzido com a utilização do mesmo também tinha impurezas de grupamento tirosina bromada, até mesmo se tivesse sido usado fenol como um agente de remoção de tirosina.

### EXEMPLO 5- DETERMINAÇÃO DA COR

**[0122]** A cor da solução de HBr / ácido acético foi determinada usando-se técnicas

de determinação da cor com padrão visual.

**[0123]** O índice de cor da American Public Health Association (APHA) é um índice de cor amarela de número simples em que cada unidade de APHA está baseada em uma diluição da solução de estoque de 500 ppm de platina-cobalto (PtCo) (HunterLab, APHA Background, Applications Note, Insight on Color 16 – 30 de novembro de 1996, Vol. 8, Nº. 16. disponível em [http://www.hunterlab.com/appnotes/an11\\_96br2.pdf](http://www.hunterlab.com/appnotes/an11_96br2.pdf).) A medida APHA é determinada por comparação visual ou pela solução com padrões de PtCo que continha quantidades controladas de cloroplatinato de potássio e cloreto cobaltoso. Cada unidade de número é o equivalente de 1 mg de platina por litro de solução (ppm). Os padrões e as medidas correspondentes são designados de acordo com a sua medida de ppm, isto é, o padrão de APHA de Nº. 20 contém 20 ppm de platina. American Chemical Society, General Directions and Procedures: Measurement of Physical Properties disponível em [http://pubs.acs.org/reagent\\_demo/sec\\_b002.html](http://pubs.acs.org/reagent_demo/sec_b002.html).), água destilada tem um valor de APHA de 0 e a solução de estoque tem um valor de APHA de 500 ppm. (HunterLab, APHA Background, Applications Not, Insight on Color,. 16 – 30 de novembro de 1996, Vol. 8, Nº. 16. disponível a [http://www.hunterlab.com/appnotes/an11\\_96br2.pdf](http://www.hunterlab.com/appnotes/an11_96br2.pdf).) A medida APHA pode ser realizada por vários instrumentos bem conhecidos na técnica.

**[0124]** Foram preparados padrão de cor APHA "500" e padrão de cor APHA "1000". O padrão de cor APHA "500" foi preparado por dissolução de 1,246 g de Cloroplatinato de Potássio,  $K_2PtCl_6$  (equivalente a aproximadamente 50 mg de Platina metálica) e 1,00 de cloreto Cobaltoso cristalizado,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (equivalente a aproximadamente 250 mg de Cobalto metálico) em água destilada com 100 ml de HCl concentrado e foi diluído até 1000 mL com água destilada.

**[0125]** O padrão de cor APHA "1000" foi preparado por dissolução de 2,492 g de Cloroplatinato de Potássio,  $K_2PtCl_6$  e 2,00 g de cloreto Cobaltoso cristalizado,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  em água destilada com 200 ml de HCl concentrado e foi diluído até 1000 mL com água destilada.

**[0126]** As bateladas a seguir foram produzidas utilizando-se aparelhagem sem ser de metal como descrito anteriormente. Estas amostras foram testadas em cor

visualmente em relação aos padrões de cor por observação de tubos de 100mL de Nessler verticalmente contra um fundo branco.

Número da Batelada	Cor (APHA)
M	<500
N	<500
P	700
Q	350
R	<300

**[0127]** A cor destas bateladas de HBr/ácido acético indicou que elas eram essencialmente isentas de bromo e de impurezas de íon de metal. Sendo que a cor é menor do que 2000 APHA, estas bateladas foram consideradas essencialmente isentas de impurezas de íon de metal.

### REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a obtenção de uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila, nem todos tendo a mesma sequência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste em alanina, ácido glutâmico, tirosina e trifluoroacetyl lisina, em que a mistura tem um peso molecular médio desejado de 5.000 a 9.000 daltons e em que, durante o processo, uma batelada de uma mistura de polipeptídeos, cada um dos quais consiste em alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila, tirosina e trifluoroacetyl lisina é desprotegido com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, e em que o processo compreende uma etapa de pré-tratamento da solução de ácido bromídrico com fenol para remover o bromo livre, o processo sendo **caracterizado** pelo fato de que compreende:

o uso de uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução compreende menos do que 0,1 % de bromo livre e/ou menos do que 1.000 ppm de impurezas de íons de metal, em que a solução de ácido bromídrico em ácido acético compreendendo menos do que 0,1 % de bromo livre é obtida na etapa de pré-tratamento.

2. Processo para a obtenção de uma composição farmacêutica que contém uma mistura de polipeptídeos, nem todos tendo a mesma sequência de aminoácido, em que cada polipeptídeo consiste em alanina, ácido glutâmico, tirosina e lisina, e em que a mistura tem um peso molecular médio desejado de 5.000 a 9.000 daltons, o processo sendo **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) a polimerização de N-carboxianidridos de tirosina, alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila e N-trifluoroacetyl lisina para formar uma mistura de polipeptídeos protegidos;

b) a desproteção dos polipeptídeos protegidos com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, cuja solução foi pré-tratada com fenol para

remover o bromo livre, para formar uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila;

c) a reação de uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila com piperidina aquosa para formar uma solução de mistura aquosa de polipeptídeos, cada um dos quais consiste em alanina, ácido glutâmico, tirosina e lisina; e

d) a purificação da mistura de polipeptídeos, em que a solução de ácido bromídrico apresenta menos do que 0,1 % de bromo livre e menos do que 1.000 ppm de impurezas de íons de metal.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que na mistura a fração molar de alanina é 0,427, de ácido glutâmico é 0,141, de lisina é 0,337 e de tirosina é 0,093.

4. Processo de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **caracterizado** pelo fato de que adicionalmente compreende sujeitar o produto da etapa d) à ultrafiltração para remover espécies de polipeptídeo com peso molecular menor do que 5.000 daltons.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, **caracterizado** pelo fato de que a mistura de polipeptídeos é acetato de glatirâmero (GA).

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que a solução de ácido bromídrico em ácido acético é de 10 % a 36 % de ácido bromídrico em ácido acético.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a solução de ácido bromídrico em ácido acético é de 33 % de ácido bromídrico em ácido acético.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que a cor da solução de ácido bromídrico em ácido acético é menor do que 2.000 APHA a menor do que 500 APHA.

9. Processo para a preparação de uma composição farmacêutica que contém uma mistura de polipeptídeos, nem todos tendo a mesma sequência de aminoácido, onde cada polipeptídeo consiste em ácido glutâmico, alanina, tirosina e lisina, em que a mistura tem uma percentagem predeterminada de tirosina bromada menor do que 0,3% para a inclusão em uma composição farmacêutica, o processo sendo **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a obtenção de uma batelada de uma mistura de polipeptídeos que tenham sequências de aminoácido não uniformes, em que cada polipeptídeo consiste em ácido glutâmico, alanina, tirosina e lisina;

medição da percentagem de tirosina bromada da batelada por um processo que compreende:

- a) hidrólise da batelada para obter um hidrolisado;
  - b) eluição do hidrolisado através de uma coluna cromatográfica;
  - c) medida do nível de bromotirosina no hidrolisado;
  - d) preparação de soluções de amostra dos componentes de aminoácido da batelada e da bromotirosina;
  - e) eluição das soluções de amostra através da coluna da etapa b); e
  - f) cálculo da percentagem de tirosina bromada na batelada; e
- inclusão na composição farmacêutica de uma batelada somente se a sua percentagem de tirosina bromada assim medida for menor do que 0,3 %.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a batelada é aceitável para a inclusão na composição farmacêutica somente se a sua percentagem de tirosina bromada assim medida for menor do que 0,2 %.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a batelada é aceitável para a inclusão na composição farmacêutica somente se a sua percentagem de tirosina bromada assim medida for menor do que 0,1 %.

%.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a mistura de polipeptídeos é GA.

13. Processo para a obtenção de uma composição farmacêutica que contém uma mistura de polipeptídeos, nem todos tendo a mesma sequência de aminoácido, onde cada polipeptídeo consiste em alanina, ácido glutâmico, tirosina e lisina, e em que a mistura tem um peso molecular médio desejado de 5.000 a 9.000 daltons, em que o processo compreende:

a) a polimerização de N-carboxianidridos de tirosina, alanina, glutamato de  $\gamma$ -benzila e N-trifluoroacetil lisina para formar uma mistura de polipeptídeos protegidos;

b) a desproteção dos polipeptídeos com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, para formar uma mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila,

c) a reação da mistura de polipeptídeos de trifluoroacetila com piperidina aquosa para formar uma solução de mistura aquosa de polipeptídeos, cada um dos quais consiste em alanina, ácido glutâmico, tirosina e lisina; e

d) a purificação da mistura de polipeptídeos,

em que o processo compreende:

pré-tratar a solução de ácido bromídrico em ácido acético com fenol antes do uso da solução na etapa b) para a desproteção dos polipeptídeos protegidos,

o processo sendo **caracterizado** pelo fato de que a solução de ácido bromídrico apresenta menos do que 0,1 % de bromo livre, após a etapa de pré-tratamento, e menos do que 1.000 ppm de impurezas de íons de metal.

14. Processo para a produção de acetato de glatirâmero compreendendo uma etapa de desproteção dos polipeptídeos protegidos com uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, em que o processo compreende:

pré-tratar a solução de ácido bromídrico em ácido acético com fenol antes

do uso da solução para a desproteção dos polipeptídeos protegidos, o processo sendo **caracterizado** pelo fato de que a solução de ácido bromídrico apresenta menos do que 0,1 % de bromo livre, após a etapa de pré-tratamento, e menos do que 1.000 ppm de impurezas de íons de metal.

15. Processo de acordo com a reivindicação 13 ou 14, **caracterizado** pelo fato de que a solução de ácido bromídrico em ácido acético é de 10% até 36% de ácido bromídrico em ácido acético.

16. Processo de acordo com a reivindicação 13 ou 14, **caracterizado** pelo fato de que a solução de ácido bromídrico em ácido acético é de 33% de ácido bromídrico em ácido acético.