



No. 11-081451-00000-0000

Fecha: 2011-06-29 17:10:18
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 35

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO “UN PROCESO PARA PURIFICAR UNA
MEZCLA DE POLÍMEROS”.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 14/00

71. SOLICITANTE SYNTHON B.V.

DOMICILIO NIJMEGEN, PAÍSES BAJOS.

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 29 JUN 2011

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-081451-00000-0000

Fecha: 2011-06-29 17:10:18
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 35

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **SYNTHON B.V.**

Dirección: Microweg 22, NL-6545 CM
Nijmegen, Países Bajos.

Nacionalidad o Domicilio: Nijmegen, Países
Bajos.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **LUTEN, Jordy.**

Dirección: Willem van Leusdenlaan 43, NL-3603 ER Maarssen.

Nacionalidad o Domicilio: Países Bajos.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/009272

Fecha: 24/12/09

Publicación Internacional No. WO 2010/072418 A1

Fecha: 01/07/10

⑥

Título (54)

"UN PROCESO PARA PURIFICAR UNA MEZCLA DE POLÍMEROS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/00

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

24/12/08

61/140, 751

⑨

Comprobante de Pago No. 11-0054406

Fecha: 07-06-2011

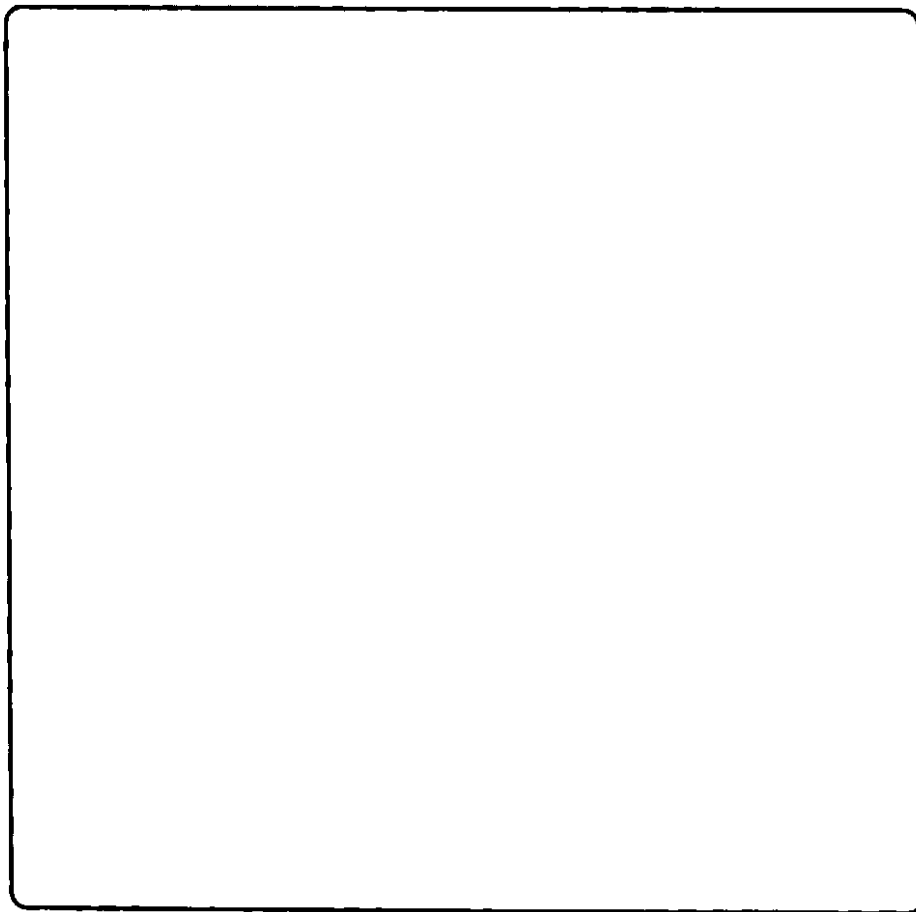
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional, publicación y opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0054406

Bogotá D.C., Junio 07 de 2011 - 12:25:41

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	414999830	07/06/2011	26.454.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON:***QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-081451- -00000-0000

Fecha: 2011-06-29 17:10:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 35

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Junio 7 de 2011 - 12:25:52

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 29-06-11 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/140,751 24-12-08 US	(51) Int Cl: C07K 14/00 (71) Solicitante(s): SYNTHON B.V. (72) Inventor(es): LUTEN, Jordy. (74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 24-07-11 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 24-12-09 No. de solicitud: PCT/EP2009/009272	(87) Publicación internacional Fecha: 01-07-10 No. publicación: WO 2010/072418 A1
(54) Título: "UN PROCESO PARA PURIFICAR UNA MEZCLA DE POLÍMEROS"	

Resumen - Reivindicación(es):

Sector: Proceso de purificación de polímeros por ultrafiltración usando una solución ácida.

Resumen.-

Un proceso para purificar péptidos de copolímero tales como polipéptidos COP-1 mediante ultrafiltración puede ser mejorado tratando la solución de polipéptido con un ácido antes o durante las etapas iniciales de la ultrafiltración. Se conduce la adición de ácido y/o formación de sales de adición de ácido del polipéptido antes de la ultrafiltración que permite la ultrafiltración más rápida. Así mismo, la adición de ácido en el proceso de ultrafiltración pero antes que ocurra la precipitación del polipéptido u obstrucción también puede mejorar la eficiencia/conveniencia del paso de ultrafiltración.

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
SUPERINTENDENCIA		DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES	
		TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION ____		PCT ☒	MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____
(21) No. de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 29-06-11	
(51) Clasificación Internacional: C07K 14/00			
(71) Solicitante(s): SYNTHON B.V.			
(72) Inventor(es): LUTEN, Jordy.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/140,751	(32) Fecha 24-12-08	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 24-07-11		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 01-07-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 24-12-09		No. publicación: WO 2010/072418 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2009/009272			
(54) Título: UN PROCESO PARA PURIFICAR UNA MEZCLA DE POLÍMEROS.			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐		
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 29-06-11		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm		
(51) Clasificación Internacional: C07K 14/00				
(71) Solicitante(s): SYNTHON B.V.				
(72) Inventor(es): LUTEN, Jordy.				
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE				
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	
	61/140,751	24-12-08	US	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 24-07-11		(87) Publicación internacional:		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 01-07-10		
Fecha de presentación de la solicitud: 24-12-09		No. Publicación: WO 2010/072418 A1		
No. de solicitud: PCT/EP2009/009272				
(54) Título: UN PROCESO PARA PURIFICAR UNA MEZCLA DE POLIMEROS.				
(57) Resumen - Reivindicación(es):				
Sector: Proceso de purificación de polímeros por ultrafiltración usando una solución ácida.				
Resumen.-				
Un proceso para purificar péptidos de copolímero tales como polipéptidos COP-1 mediante ultrafiltración puede ser mejorado tratando la solución de polipéptido con un ácido antes o durante las etapas iniciales de la ultrafiltración. Se conduce la adición de ácido y/o formación de sales de adición de ácido del polipéptido antes de la ultrafiltración que permite la ultrafiltración más rápida. Así mismo, la adición de ácido en el proceso de ultrafiltración pero antes que ocurra la precipitación del polipéptido u obstrucción también puede mejorar la eficiencia/conveniencia del paso de ultrafiltración.				

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PF-142/PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2009/009272	International filing date (day/month/year) 24/12/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 24/12/2008
Applicant SYNTHON BV		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/009272

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/00 C07K1/34 C08G69/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C08G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 907 755 A (MARGRAFF RODOLPHE ET AL) 23 September 1975 (1975-09-23)	1-2
Y	whole doc; in particular example 8	3-16
Y	US 2006/122113 A1 (PINCHASI IRIT [IL] ET AL) 8 June 2006 (2006-06-08)	3-16
	whole doc, in particular [0309] on p. 22	
A	US 3 849 550 A (TEITELBAUM D ET AL) 19 November 1974 (1974-11-19)	1-16
	the whole document	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 2010

Date of mailing of the international search report

29/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lüdemann, Susanna

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/009272

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3907755	A	23-09-1975	BE 798994 A1	05-11-1973
			CA 994759 A1	10-08-1976
			DE 2322310 A1	22-11-1973
			FR 2182667 A1	14-12-1973
			GB 1402397 A	06-08-1975
			IL 42178 A	30-06-1976
			JP 49048785 A	11-05-1974
			NL 7305784 A	06-11-1973
			SE 401189 B	24-04-1978
			SU 474137 A3	14-06-1975
US 2006122113	A1	08-06-2006	US 2007054857 A1	08-03-2007
US 3849550	A	19-11-1974	CA 1006508 A1	08-03-1977
			CH 570167 A5	15-12-1975
			DE 2217817 A1	16-11-1972
			FR 2133926 A5	01-12-1972
			GB 1393435 A	07-05-1975
			IL 36670 A	10-09-1974
			JP 57010132 B	25-02-1982

- (51) International Patent Classification:
C07K 14/00 (2006.01) C08G 69/10 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2009/009272
- (22) International Filing Date:
24 December 2009 (24.12.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/140,751 24 December 2008 (24.12.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SYN-
THON BV [NL/NL]; Microweg 22, NL-6545 CM Ni-
jmegen (NL).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): LUTEN, Jordy [NL/
NL]; Willem van Leusdenlaan 43, NL-3603 ER Maarssen
(NL).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

- AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report (Art. 21(3))

WO 2010/072418 A1

(54) Title: A PROCESS FOR PURIFYING A POLYMER MIXTURE

(57) Abstract: A process for purifying copolymer peptides such as COP-I polypeptides by ultrafiltration can be improved by treating the polypeptide solution with an acid before or during the early stages of the ultrafiltration. Adding the acid and/or forming acid addition salts of the polypeptide before ultrafiltration is conducted permits for faster ultrafiltration. Likewise, adding the acid in the ultrafiltration process but before polypeptide precipitation or clogging occurs can also improve the efficiency / convenience of the ultrafiltration step.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2009/009272

International filing date (day/month/year)
24.12.2009

Priority date (day/month/year)
24.12.2008

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K14/00 C07K1/34 C08G69/10

Applicant
SYNTHON BV

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Lüdemann, Susanna

Telephone No. +49 89 2399-7842



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/009272

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/009272

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>3-16</u>
	No: Claims	<u>1-2</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-16</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-16</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1 Reference is made to the following documents:
 - D1 US 3 907 755 A (MARGRAFF RODOLPHE ET AL) 23 September 1975 (1975-09-23)
 - D2 US 2006/122113 A1 (PINCHASI IRIT [IL] ET AL) 8 June 2006 (2006-06-08)
 - D3 US 3 849 550 A (TEITELBAUM D ET AL) 19 November 1974 (1974-11-19)
- 2 D1 discloses a process of ultrafiltration comprising combining a reaction mixture having a pH of 10 or higher (see example 8, col. 6, line 5, pH of 9.8 when rounded equals 10) and containing a variety of copolymer peptides which collectively have more basic amino acids than acidic acids (see col. 6, line 16-17), with an aqueous acid solution to form a modified reaction mixture (co. 6, lines 10-11) and subjecting said modified reaction mixture to ultrafiltration (col. 6, lines 13-15).
- 3 D2 discloses the production of copolymer 1 and the acidification with glacial acetic acid (see [0309] on p. 22), before resuming the ultrafiltration/dilution cycles. A pH of 10 or higher is explicitly not mentioned. However, the person skilled in the art is aware that the higher the ratio of basic amino acids the higher the reaction pH (see also the poly-lysines in D1).
- 4 The present application does not meet the criteria of Article 33(2) PCT, because the subject-matter of claims 1 and 2 is not novel over D1.
- 5 Dependent claims 3-16 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any of the claim to which they refer, meet the requirements of the PCT with respect to novelty or inventive step, since the further features are either state of the art or do not appear to produce any particular technical effect.
- 6 In view of the teaching of D1 and D2, also the comparative example of the underlying application does not seem to involve an inventive step over D3.

UN PROCESO PARA PURIFICAR UNA MEZCLA DE POLÍMEROS

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Un proceso para purificar péptidos de copolímero tales como polipéptidos COP-1 mediante ultrafiltración puede ser mejorado tratando la solución de polipéptido con un ácido antes o durante las etapas iniciales de la ultrafiltración. Se conduce la adición de ácido y/o formación de sales de adición de ácido del polipéptido antes de la ultrafiltración que permite la ultrafiltración más rápida. Así mismo, la adición de ácido en el proceso de ultrafiltración pero antes que ocurra la precipitación del polipéptido u obstrucción también puede mejorar la eficiencia/conveniencia del paso de ultrafiltración.

SECTOR: Proceso de purificación de polímeros por ultrafiltración usando una solución ácida.

UN PROCESO PARA PURIFICAR UNA MEZCLA DE POLÍMEROS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a métodos para purificar copolímeros de polipéptido, especialmente polipéptidos COP-1.

[0002] La polimerización de monómeros naturales o sintéticos es bien conocida y se describe en libros de texto iniciales tales como, por ejemplo, Química Orgánica de Morrison y Boyd, 3ª edición, 1980, capítulo 32. Los polipéptidos son una clase específica de polímeros formados por polimerización de aminoácidos.

[0003] "Los polipéptidos de copolímero" son generalmente formados mediante una co-polimerización aleatoria de aminoácidos. En tal co-polimerización, varios aminoácidos diferentes que tienen los grupos carboxi y/o amino activados se mezclan en condiciones reactivas, por medio de lo cual la formación de enlace de péptido entre los diferentes aminoácidos presentes en la mezcla de reacción es aleatoria. También es conocido en la técnica que los grupos químicos reactivos que no forman parte de la estructura del polímero, y deben permanecer inalterados después de la polimerización, deben ser protegidos mediante grupos protectores. Después que la polimerización está completa, estos grupos protectores son removidos químicamente.

[0004] Un método para formar un copolímero que contiene leucina y fenilalanina mediante polimerización aleatoria se describe en US 2.657.972.

[0005] US 3.849.550 describe un método para formar un copolímero que contiene alanina (A), ácido glutámico (E), lisina (K) y tirosina (Y) mediante polimerización aleatoria. El método utiliza grupos secundarios protectores,

seguido por dos pasos de desprotección, pero no especifica ningún paso de purificación. Se reportó que el copolímero resultante, que posteriormente ha sido conocido como copolímero-1 (COP-1) (ver, por ejemplo, US 5.800.808), tiene una relación molar de A: E: K: Y de 6:2:4.5:1.

[0006] US 5.800.808 describe métodos de obtención de COP-1 que tiene un perfil de peso molecular específico, con posterior purificación por diálisis o ultrafiltración. Se reportó que el COP-1, tiene una relación molar de A: E: K: Y de 6:2:5:1. La patente no menciona métodos de purificación de aplicación industrial.

[0007] WO 2006/083608 describe métodos para preparar COP-1 y menciona la ultrafiltración para remover los grupos protectores e impurezas de bajo peso molecular. La relación molar en el COP-1 de A: E: K: Y corresponde a ~ 4.49: ~1.48: ~3.56:1. En una realización (Ejemplo 3), la ultrafiltración se realizó a través de una membrana de 5 kilodalton para remover las impurezas de bajo peso molecular. Después de 6 ciclos de ultrafiltración, la solución fue acidificada con ácido acético hasta lograr un pH de 4.0. Se añadió agua y la solución fue ultrafiltrada hasta alcanzar un pH de 5,5. La solución fue concentrada y liofilizada por 60 horas.

[0008] US 2008/0021192 describe métodos para preparar COP-1 y posterior purificación del COP-1, por ejemplo, mediante diálisis, cromatografía, filtración, etc. Se ha reportado que el COP-1 tiene una relación molar de A: E: K: Y correspondiente a ~ 4.49: ~1.48: ~3.56:1. En una realización (esquema 5), COP-1 es purificado mediante ultrafiltración. Una mezcla de reacción que contiene COP-1 fue filtrada para remover cualquier material fino insoluble y el filtrado se pasó a través de una ultrafiltración usando una membrana de un kilodalton primero con agua circulante hasta que se observó un pH de 8 en el permeado y luego circulado con ácido acético al 0.3% en agua hasta pH de

5.5-6.0 en el retenido. La solución fue entonces liofilizada para obtener aparentemente, COP-1 como una sal de ácido acético en forma sólida.

[0009] Los métodos de purificación de COP-1 del estado de la técnica descritos anteriormente son procedimientos de varios pasos adecuados para experimentación a escala de laboratorio. Permanece una necesidad, sin embargo, de un método de ultrafiltración más fácil y/o industrialmente aplicable para purificar mezclas de reacción complejas que comprenden polipéptidos, especialmente de COP-1.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] La presente invención se basa en la observación que los procesos de ultrafiltración de la técnica previa a menudo sufren de obstrucción de la membrana de filtro y/o precipitación del polipéptido copolímero durante la ultrafiltración. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento que proveer un ácido y/o formar una sal de adición de ácido del polipéptido inicialmente en el proceso puede reducir o evitar tal obstrucción y/o problemas de precipitación, y en consecuencia se puede reducir el número de pasos de ultrafiltración y/o el tiempo requerido.

[0011] En consecuencia, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un proceso de ultrafiltración, que comprende: combinar una mezcla de reacción que tiene un pH de 10 o superior y que contiene una variedad de polipéptidos de copolímero que en conjunto tienen más aminoácidos básicos que aminoácidos ácidos, con una solución ácida acuosa para formar una mezcla de reacción modificada, y someter dicha mezcla de reacción modificada a ultrafiltración para formar una mezcla de reacción purificada. El ácido utilizado puede ser un ácido orgánico o inorgánico, y es típicamente un ácido orgánico que tiene 1 a 8 átomos de carbono, más típicamente 1 a 4 átomos de

carbono, tal como ácido acético. Los polipéptidos se forman generalmente a partir de los aminoácidos, alanina, ácido glutámico y/o ácido aspártico, lisina y/o arginina y tirosina.

[0012] En un aspecto específico, el proceso anterior puede ser utilizado para preparar COP-1 purificado. Más específicamente, el copolímero de polipéptido en dicho proceso es el polipéptido COP-1 y la ultrafiltración de dicha mezcla de reacción modificada produce sales de adición de ácido de COP-1 purificadas. Normalmente, el proceso comprende: (i) la adición de una solución ácida acuosa a una mezcla de reacción que contiene polipéptidos COP-1 desprotegidos para obtener sales de adición de ácido de COP-1 en una mezcla de reacción modificada, y (ii) ultrafiltración de dicha mezcla de reacción que contiene dichas sales de adición de ácido de COP-1 purificadas; en donde el paso (i) se realiza preferiblemente antes de someter dicha mezcla de reacción que contiene los polipéptidos COP-1 desprotegidos a cualquier ultrafiltración. El ácido puede ser orgánico o inorgánico, como se mencionó anteriormente y por lo general es ácido acético. La mezcla de reacción modificada que contiene dichas sales de ácido acético de COP-1, tiene generalmente un pH que varía desde el punto isoelectrico promedio de los polipéptidos COP-1 desprotegidos en al menos una unidad de pH. Típicamente, la mezcla de reacción que contiene dichos polipéptidos COP-1 desprotegidos tiene un pH mayor o igual a 12 antes de dicha adición del paso (i). En el caso habitual, la adición de la solución de ácido acético reduce el pH de la mezcla de reacción de su valor inicial típico de alrededor de 12-13 a 10 o menos. La concentración de dicha solución acuosa de ácido acético es típicamente 0.05 a 0.5% de ácido acético en volumen, tal como aproximadamente 0.1 a 0.3%.

[0013] Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de ácido en tal proceso de ultrafiltración. Específicamente, en un proceso para

purificar polipéptidos COP-1, que comprende someter polipéptidos COP-1 desprotegidos en una mezcla de reacción a ultrafiltración, se puede hacer una mejora que comprende un paso de adicionar un ácido, en especial ácido acético, a la mezcla de reacción alcalina o retenido antes o durante, o ambos, el proceso de ultrafiltración, pero no después que el retenido alcanza un pH de 10.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0014] La presente invención está dirigida a un proceso para purificar copolímeros de polipéptido, tales como polipéptidos COP-1 mediante la realización de ultrafiltración de la solución de polipéptidos en presencia de un ácido y/o forma de sal de adición de ácido de los polipéptidos. Se ha descubierto que la adición de ácido y/o la formación de sales de adición de ácido de los polipéptidos de copolímero en una etapa temprana de la ultrafiltración, incluyendo antes de empezar la ultrafiltración, reduce o evita la obstrucción de la membrana filtro y/o la precipitación del polipéptido de copolímero durante la ultrafiltración. Al proporcionar ácido antes que ocurra la precipitación del polipéptido de copolímero y/u obstrucción, el proceso se puede realizar de forma rápida y eficiente. Además, el número de pasos de ultrafiltración se puede reducir, por ejemplo, no hay necesidad de intercambiar repetidamente líquidos de proceso durante la ultrafiltración, y se requieren menos mediciones (por ejemplo, mediciones de pH) para determinar el punto final de purificación de la ultrafiltración.

[0015] Los polipéptidos de copolímero a ser purificados mediante la invención son una mezcla de varios polipéptidos que en conjunto tienen más aminoácidos básicos que aminoácidos ácidos. A menudo, los polipéptidos de copolímero se forman a partir de alanina, ácido glutámico y/o ácido aspártico, lisina y/o arginina y tirosina. También pueden estar presentes aminoácidos

adicionales, pero en general los polipéptidos de copolímero están limitados a estos 4 a 6 aminoácidos. Los polipéptidos de copolímero son de diferentes longitudes de cadena, secuencias, y pesos moleculares y, en conjunto, tienen un peso molecular promedio que suele estar entre 2 y 40 kilodaltons.

[0016] Una realización preferida de la presente invención se refiere a la purificación de polipéptidos de copolímero conocidos como COP-1. El término "COP-1" ("Copolímero-1") se refiere a una mezcla de polipéptidos preparados a partir de los amino ácidos alanina (A), ácido glutámico (E), lisina (K) y tirosina (Y). La relación molar de A: E: K: Y en el COP-1 ha sido reportada diversamente. Por ejemplo, el siguiente cuadro muestra las diferentes relaciones molares atribuidos como COP-1:

Fuente	Relación molar A:E:K:Y
US 3.849.550	6: 2: 4.5: 1
US 5.800.808	6: 2: 5: 1
WO 2006/083608 y	~4,49: ~1,48: ~3,56: 1
EE.UU. 2008/0021192	
NDA # 020622 para COPAXONE ®	4.5: 1.5: 3.5: 1

Para propósitos de esta solicitud, el término polipéptidos "COP-1" pretende abarcar todas estas variaciones de relaciones molares de A: E: K: Y.

[0017] La ultrafiltración, por lo general, es una técnica de purificación/separación bien conocida en la cual una solución es contactada con una membrana de ultrafiltración bajo una presión aplicada. La presión aplicada puede ser, por ejemplo, presión osmótica y presión hidrostática. La presión aplicada fuerza al solvente y pequeñas moléculas a través de la membrana, mientras que las moléculas más grandes son retenidas por la membrana, con base en el punto de corte de peso molecular de la membrana.

La solución que pasa a través de la membrana se llama el permeado. La solución que contiene las moléculas retenidas se llama el retenido. La membrana de ultrafiltración pueden retener partículas de 1 kilodalton a 1000 kilodaltons. La membrana de ultrafiltración debe ser inerte frente a la mezcla de reacción. Los criterios de selección están disponibles de los proveedores de la membrana. La membrana tiene de preferencia un corte de peso molecular de 1 a 10 kilodaltons, tal como 3 o 5 kilodaltons. Típicamente, el volumen del retenido se mantiene constante durante la ultrafiltración mediante la adición de una solución de alimentación al retenido. Esto permite un mejor control sobre el proceso de ultrafiltración y la pureza del retenido.

[0018] La ultrafiltración usada en la invención comprende típicamente pasar una mezcla de reacción que contiene polipéptidos de copolímero, tal como COP-1, a través de una membrana que tiene un corte de peso molecular, de por ejemplo, 1 a 10 kilodaltons, por medio del cual los polipéptidos de copolímero son conservados en el retenido y purificados a medida que las entidades de menor peso molecular pasan a través de la membrana. Los polipéptidos de copolímero se "purificas" en el sentido de que al menos una cierta cantidad de residuos no deseados de la mezcla de reacción es removida/separada de los polipéptidos de copolímero retenidos. La remoción de las moléculas pequeñas, tales como bases y sus sales, en el transcurso de la ultrafiltración, conduce generalmente a una reducción del pH de la mezcla de reacción o retenido inicialmente alcalino.

[0019] Un aspecto de la invención se refiere a la combinación de una mezcla de reacción que tiene un pH inicial de 10 o superior, preferiblemente de 12 o mayor, y que contiene una variedad de polipéptidos de copolímero (es decir, que en conjunto tienen más aminoácidos básicos que aminoácidos ácidos) con una solución acuosa ácida para formar una mezcla de reacción modificada. El pH de la mezcla de reacción modificada es

generalmente de 10 o menos y, a veces 8 o menos y por lo general en el rango de 4 a 8 o 5 a 7. La mezcla de reacción modificada se somete a ultrafiltración para formar una mezcla de reacción purificada. Para mayor claridad, no se requiere que la mezcla "purificada" tenga pureza casi absoluta, sino que sólo necesita ser más pura que la mezcla de reacción de partida. Es decir, al remover algunas de las moléculas pequeñas, los polipéptidos restantes son más puros y por lo tanto se consideran "purificados". La "mezcla de reacción" suele ser la resultante de la síntesis de polipéptidos, pero en general incluye cualquier líquido que contiene los polipéptidos de copolímero para los cuales se desea alguna medida de purificación. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede ser concentrada o sometida a filtración incluyendo ultrafiltración antes de realizar el paso de combinación con el ácido. Pero la mezcla de reacción tiene un pH de más de 10 en el momento del paso de combinación. La solución acuosa ácida puede basarse en ácidos orgánicos o inorgánicos. Los ácidos deben normalmente disolverse en la solución en base agua. Típicamente se usan ácidos orgánicos que tienen 1 a 8 átomos de carbono, más típicamente 1 a 4 átomos de carbono, es decir, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico o ácido butírico. Aunque aquí se refiere en singular, el término "ácido" también significa que abarca la forma plural, es decir, se puede usar uno o más ácidos en la solución. Por lo general el agua es el único solvente, aunque el uso de alcoholes inferiores u otros solventes orgánicos miscibles con agua no está prohibido para preparar la solución acuosa ácida.

[0020] Los dos pasos a menudo se realizan de forma secuencial en donde el ácido se combina con la mezcla de reacción antes de iniciar la ultrafiltración. Sin embargo, los pasos pueden llevarse a cabo de forma simultánea. Esto es decir, mientras la mezcla de reacción está pasando por ultrafiltración, una solución acuosa ácida se puede combinar con la misma para formar la mezcla de reacción modificada *in situ*. Siempre y cuando la mezcla de reacción modificada se forme antes que el pH de la mezcla de reacción, o más

bien retenido, sea de menos de 10, entonces se considera que ambos pasos se han llevado a cabo. Este paso de "combinación" y ultrafiltración simultánea puede ser llevado a cabo convenientemente si se emplea una solución acuosa ácida como una solución de alimentación en el proceso de ultrafiltración.

[0021] Debido a que un aspecto preferido de la invención se refiere a un proceso para purificar polipéptidos COP-1 mediante el uso de un ácido, la invención se describirá con más detalle con respecto a esta realización en donde el ácido es ácido acético. Se debe entender que se pueden usar otros ácidos en lugar de ácido acético, como se mencionó anteriormente. El proceso comprende agregar una solución acuosa de ácido acético a una mezcla de reacción que contiene polipéptidos COP-1 desprotegidos para obtener sales de ácido acético de COP-1 en una mezcla de reacción modificada y ultrafiltrar dicha mezcla de reacción modificada que contiene dichas sales de ácido acético de COP-1 para formar sales de ácido acético de COP-1 purificadas, en donde el ácido acético acuoso es agregado (y las sales de ácido acético de COP-1 formadas), antes de someter la mezcla de reacción que contiene los polipéptidos COP-1 desprotegidos a cualquier ultrafiltración.

[0022] El ácido acético acuoso contiene típicamente 0.05 a 0.5% de ácido acético en volumen en agua, tal como 0.1 a 0.3 % de ácido acético en volumen en agua.

[0023] La frase "mezcla de reacción que contiene polipéptidos COP-1 desprotegidos" se refiere a una solución que contiene polipéptidos COP-1 que sustancialmente o prácticamente no contienen grupos secundarios de amino protegidos por un grupo protector. Por ejemplo, cuando los polipéptidos COP-1 son preparados mediante polimerización aleatoria (por ejemplo, como se describe en US 3.849.550), después que los grupos

aminoácido secundarios son desprotegidos, la mezcla resultante es una "mezcla de reacción que contiene polipéptidos COP-1 desprotegidos". Como otro ejemplo, cuando los polipéptidos COP-1 se realizan mediante técnicas de ADN recombinante (por ejemplo, como se describe en EP 0383620) después que los polipéptidos COP-1 recombinantes han sido expresados en *E. coli* y clovados de la proteína de fusión Proteína A/rCOP-1, la mezcla resultante es una "mezcla de reacción que contiene polipéptidos COP-1 desprotegidos". Por lo tanto, el término "polipéptidos COP-1 desprotegidos" se refiere tanto polipéptidos COP-1 que fueron sometidos a pasos de protección como desprotección (tal como en polimerización aleatoria) y a polipéptidos COP-1 que no han sido sometidos a un paso de desprotección (por ejemplo, como en las técnicas de ADN recombinante).

[0024] En una forma preferida de esta realización, la mezcla de reacción modificada que contiene sales de ácido acético de COP-1 tiene un pH inferior o igual a 10 antes que las sales de ácido acético de COP-1 sean sometidas a ultrafiltración. Cuando la mezcla de reacción que contiene los polipéptidos COP-1 desprotegidos tiene un pH de más de 10, tal como un pH mayor o igual a 12, la adición de ácido acético acuoso disminuye el pH al pH deseado menor o igual a aproximadamente 10. Sin embargo no es estrictamente necesario tal pH de partida alto. Es decir, es posible que la mezcla de reacción de partida que contiene los polipéptidos COP-1 desprotegidos tenga un pH de menos de 10 antes de añadir el ácido acético acuoso. Sin embargo, la realización típica de la invención si usa una mezcla de reacción que tiene un pH de alrededor de 13 y la adición de ácido acético a la misma reduce el pH a aproximadamente 10 o menos. En algunas de estas realizaciones, el pH de la mezcla de reacción modificada antes de la ultrafiltración es inferior a 8, tal como por ejemplo un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente o incluso aproximadamente 5 a aproximadamente 7. El medio de reacción modificado resultante que tiene tal pH reducido es entonces

sometido a ultrafiltración con el fin de purificar las sales de ácido acético de COP-1.

[0025] La ultrafiltración de polipéptidos pueden sufrir de un gradiente de concentración hacia la interfaz de la membrana, conocida como polarización de la concentración. La polarización de la concentración tiene un efecto negativo sobre el flujo (de transporte de masa en la membrana). Además, la fuerza iónica del retenido afecta el flujo. Flujos son generalmente mayores a fuerza iónica baja y menores cerca del pH isoelectrico del(los) polipéptido(s) que son ultrafiltrados. La fuerza iónica alta también se traduce en alta presión osmótica que puede contribuir a un flujo menor. El punto isoelectrico de un aminoácido es el pH al cual el aminoácido está presente en su forma dipolar, totalmente ionizado, pero sin carga eléctrica neta. El punto isoelectrico de un polipéptido es el pH al cual el polipéptido no tiene carga eléctrica neta. El punto isoelectrico promedio de una mezcla de polipéptidos es el promedio de los puntos isoelectricos de los polipéptidos contenidos en la mezcla.

[0026] Los polipéptidos COP-1, en conjunto, tienen más aminoácidos básicos que aminoácidos ácidos, y el punto isoelectrico promedio para los polipéptidos COP-1 es típicamente superior a aproximadamente 7, por ejemplo, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 11, como por ejemplo aproximadamente 9 o aproximadamente 10, dependiendo de la relación real entre aminoácidos básicos y ácidos presentes en los polipéptidos COP-1, de manera colectiva. Ventajosamente, la mezcla de reacción modificada que contiene las sales de ácido acético de COP-1 tiene un pH que difiere del punto isoelectrico de los polipéptidos COP-1 desprotegidos en al menos una unidad de pH, ya que el transporte de masa en la membrana (flujo) es el más bajo al pH isoelectrico. Parece que la presencia de aniones de ácido acético en la mezcla de reacción modificada retenido previene o reduce la precipitación de

los polipéptidos a medida que la mezcla/retenido pasa a través del pH correspondiente al punto isoeléctrico u otro punto de precipitación de los polipéptidos COP-1 desprotegidos.

[0027] Típicamente se usa una solución de alimentación en la ultrafiltración. Cuando se suministra, la solución de alimentación es normalmente una solución acuosa del mismo ácido que se utiliza para ajustar el pH, por ejemplo, un ácido acético acuoso. Para mayor claridad, en otras realizaciones preferidas de la invención, la solución de alimentación se utiliza como la solución acuosa de ácido en el paso de combinación o adición. Preferiblemente, la concentración de una solución acuosa de ácido acético de alimentación es de aproximadamente 0.05 a 0.5% en volumen, tal como aproximadamente 0.1 a 0.3% en volumen. Mayores concentraciones de ácido acético pueden dar lugar a una eliminación menos efectiva de ácido acético durante los pasos de aislamiento subsiguientes (lío-filización). Opcionalmente, la solución de alimentación se puede cambiar a agua en etapas posteriores del proceso de ultrafiltración para eliminar el exceso de ácido acético, por ejemplo, una vez que el pH es inferior a 6. La concentración de ácido acético en la mezcla de reacción por lo general no supera la concentración de ácido acético en la solución de alimentación.

[0028] El volumen/tasa de adición de la solución de alimentación se ajusta típicamente para lograr una concentración de sales de ácido acético de COP-1 en el retenido de 1 a 50 gramos por litro durante la ultrafiltración, a menudo 20 a 50 gramos por litro, aunque se pueden usar concentraciones más altas. Durante la ultrafiltración, la concentración en general no debe ser superior a aproximadamente 100 gramos por litro y se deben evitar concentraciones de aproximadamente 250 gramos por litro o mayores. Estas concentraciones más altas pueden tener un efecto negativo en el flujo.

[0029] Al término del paso de ultrafiltración, el retenido (mezcla de reacción modificada) que contiene los polipéptidos COP-1 purificados (sales de ácido acético de COP-1 purificadas) tiene un pH entre 5 y 7, tal como por ejemplo aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6. Ventajosamente, la ultrafiltración se puede realizar durante 20 horas o menos, preferentemente 10 horas o menos, y más preferiblemente 5 horas o menos. La concentración de los polipéptidos COP-1 purificados en el retenido a la terminación es típicamente de aproximadamente 2 a 50 gramos por litro, por lo general 20 a 50 gramos por litro, aunque se pueden obtener concentraciones tal altas como 75 gramos por litro.

[0030] En una realización preferida, los polipéptidos COP-1 purificados tienen un peso molecular promedio de 4 a 11 kilodaltons (tal como 5 a 9 kilodaltons o 6 a 10 kilodaltons) o 7 a 12 kilodaltons. Por lo general, menos del 5% en peso de los polipéptidos COP-1 purificados tienen un peso molecular de más de 40 kilodaltons. Preferiblemente, una fracción molar de polipéptidos COP-1 que tiene un peso molecular de 2 a 20 kilodaltons en dichos polipéptidos COP-1 purificados es de al menos 0.75. El término "fracción molar" es el número de moles de una sustancia componente en una mezcla dividida entre el número total de moles en la mezcla.

[0031] Los polipéptidos COP-1 adecuados para su uso en el proceso de purificación de la presente invención se pueden hacer utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, los polipéptidos COP-1, incluyendo polipéptidos COP-1 que tienen un perfil de peso molecular específico, se hacen comúnmente por polimerización aleatoria, como se muestra en US 5,800,808 y US 2008/0021192. Sin embargo, también se conoce un método para preparar polipéptidos COP-1 usando tecnología de ADN recombinante, descrito en EP 0383620.

[0032] Por lo tanto, el proceso de purificación de la presente invención puede incluir además pasos dirigidos a preparar polipéptidos COP-1 desprotegidos mediante polimerización aleatoria. En particular, el proceso de purificación puede comprender además polimerizar una mezcla de N-carboxianhidridos de alanina, ácido glutámico protegido, lisina protegida y tirosina para formar polipéptidos COP-1 protegidos y el tratamiento de polipéptidos COP-1 protegidos, con al menos un agente de desprotección para obtener polipéptidos COP-1 desprotegidos. El ácido glutámico protegido se puede formar usando, por ejemplo, un grupo protector de bencilo o metoxi. Por otro lado, la lisina protegida se puede formar usando, por ejemplo, una imida cíclica o un grupo protector de t-butoxicarbonilo.

[0033] La distribución de peso molecular de los polipéptidos COP-1 está influenciado por varios factores, tales como la concentración del iniciador de polimerización, la temperatura de reacción y el tiempo de reacción. Después que la reacción de polimerización termina, la mezcla de polipéptidos resultante puede ser sometida, por ejemplo, a hidrólisis ácida o alcalina para obtener un peso molecular promedio menor, con una distribución de peso molecular más amplia, tales como polipéptidos COP-1 que tienen los perfiles de peso molecular descritos anteriormente. Varios otros métodos para la obtención del perfil de peso molecular deseado son conocidos en la técnica.

[0034] Agentes de desprotección adecuados para uso con los agentes protectores correspondientes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un grupo protector de bencil éster puede ser removido de un ácido glutámico protegido después de la polimerización mediante ácidos adecuados, tales como ácido bromhídrico al 33% en ácido acético, que es preferiblemente libre de bromo. Dicho paso de desprotección de ácido puede también ser usado convenientemente como un paso de despolimerización, de modo que la desprotección y la despolimerización se combinan en un solo paso. Como otro

ejemplo, los grupos protectores de trifluoroacetilo se pueden eliminar de una lisina protegida con una base orgánica, tal como piperidina. Típicamente, se usa un primer agente de desprotección para remover los grupos protectores de los residuos de ácido glutámico (tal como ácido bromhídrico al 33%), y luego se usa un segundo agente de desprotección para remover los grupos protectores de los residuos de lisina (tal como piperidina). La frase "el tratamiento de dichos polipéptidos COP-1 protegidos con al menos un agente de desprotección para obtener dichos polipéptidos COP-1 desprotegidos" incluye múltiples pasos de desprotección usando diferentes agentes de desprotección, así como un solo paso de desprotección o varios pasos de desprotección usando el mismo agente de desprotección.

[0035] Opcionalmente, los polipéptidos COP-1 purificados pueden ser aislados del retenido. Por ejemplo, el proceso de purificación de la presente invención puede comprender además la liofilización de los polipéptidos COP-1 purificados en forma de sal después de la ultrafiltración. De esta manera, se pueden obtener acetatos de polipéptido COP-1. La liofilización permite también la remoción de ácido acético en exceso usado en la ultrafiltración.

[0036] La realización preferida anterior se refiere a llevar a cabo de forma secuencial los pasos de combinar el ácido con el polipéptido seguido por ultrafiltración, opcionalmente con ácido adicional como una solución de alimentación. Pero en otra realización preferida, estos pasos pueden llevarse a cabo de manera simultánea o en superposición. La solución de ácido acético se puede combinar con la mezcla de reacción como la solución de alimentación al inicio de la ultrafiltración, o, durante la ultrafiltración. En esta realización, el ácido debe ser combinado con la mezcla de reacción, no después del punto isoeléctrico u otro punto de pH al cual ocurre la precipitación del polipéptido, es decir, añadido antes de la precipitación del polipéptido, y en general no más allá de un pH de 10. Para una mezcla de reacción de COP-1, el ácido se

combina típicamente en un pH no más allá de aproximadamente 12. Las otras condiciones aplican igualmente para esta realización, según lo expresado anteriormente.

[0037] Aunque la descripción anterior se centró principalmente en la purificación de polipéptidos COP-1 usando ácido acético y sales del mismo, la presente invención no está así limitada y los pasos y condiciones de ultrafiltración, incluyendo la solución de alimentación, etc., tal como se expresó anteriormente son generalmente aplicables a todos los aspectos de la invención. Del mismo modo, los polipéptidos COP-1 también podrían ser purificados usando otras soluciones ácidas y sus correspondientes sales de adición de ácido. Del mismo modo, además de COP-1, otros polipéptidos como se describió anteriormente en este documento pueden ser purificados de la misma manera como se describe para COP-1.

[0038] La invención se describe además con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

[0039] Ejemplo 1: Se preparó un polipéptido como se describe en US 3.849.550. La mezcla de reacción resultante, una solución de 50 ml (piperidina 1M), que contiene 1.0 gramos de polímero protegido de trifluoroacetilo, se diluyó hasta 500 mL con un ácido acético al 0.3% en volumen en agua desmineralizada. El pH de la solución resultante es de aproximadamente 10. La solución diluida se puso en el depósito de un sistema Millipore Labscale TFF, equipado con una membrana filtro Pellicon XL de 5 kDa (PLCCC 5, 50cm²). Bajo las condiciones seleccionadas (presión de entrada de 30 psi, presión de salida de 10 psi, flujo de permeado 100 mL/h), 0,3% de ácido acético en agua desmineralizada se utilizó como una solución de alimentación

para purificar el polímero. Después de 16 horas, el retenido tenía un pH de aproximadamente 5, la alimentación se detuvo, y el retenido fue ultra filtrado por 4 horas adicionales para aumentar la concentración de polipéptido en el retenido a aproximadamente 20 gramos por litro. El tiempo de corrida total fue de 20 horas.

[0040] Ejemplo 2 (ejemplo comparativo): Como un ejemplo comparativo, se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, pero la mezcla de reacción se diluyó con agua desmineralizada y se usó agua desmineralizada como solución de alimentación durante la ultrafiltración. Después de aproximadamente 2 o 3 horas se formaron agregados de polímero cuando el retenido alcanzó un pH de aproximadamente 8 o 9. Estos agregados aparecieron para bloquear el filtro, produciendo una presión de membrana aumentada de más de 4 bar, que estaba por encima de las especificaciones de seguridad indicadas por el proveedor. La solución de alimentación fue entonces cambiada inmediatamente a ácido acético al 0.3% en volumen, y la ultrafiltración se continuó hasta que el pH del retenido era de aproximadamente 5. El tiempo de corrida total aumentó de 20 a 24 horas.

[0041] Una comparación de los ejemplos muestra ventajas del procedimiento de acuerdo con la invención. Además, omitir un cambio de solución de alimentación, el tiempo de corrida total se redujo significativamente debido a que se redujo o evitó la precipitación del polipéptido. Sorprendentemente, no se observó precipitación o agregación en el Ejemplo 1, cuando el retenido pasó a través del punto isoelectrico del polipéptido. Adicionalmente, en el Ejemplo 1 el riesgo de daño de la membrana se redujo o eliminó. Esto es ventajoso porque cuando una membrana se opera fuera de los límites de presión de seguridad especificados, esta necesita ser verificada después que la corrida de ultrafiltración se haya completado. Cuando está dañada, la corrida de ultrafiltración deber ser repetida.

[0042] Cada una de las patentes, solicitudes de patente, y folletos mencionados anteriormente se incorporan al presente mediante referencia. Habiendo sido descrita la invención, será obvio que la misma puede ser variada de muchas formas y todas estas modificaciones están contempladas dentro del alcance de la invención definida mediante las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de ultrafiltración, que comprende:
combinar una mezcla de reacción que tiene un pH de 10 o superior y que contiene una variedad de polipéptidos de copolímero, que en conjunto tienen más aminoácidos básicos que aminoácidos ácidos, con una solución acuosa ácida para formar una mezcla de reacción modificada; y
someter dicha mezcla de reacción modificada a ultrafiltración para formar una mezcla de reacción purificada.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha solución acuosa ácida contiene un ácido seleccionado del grupo que consiste de ácidos orgánicos que tienen 1 a 8 átomos de carbono, preferiblemente ácido acético y ácidos inorgánicos.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dichos polipéptidos están comprendidos de alanina, ácido glutámico y/o ácido aspártico, lisina y/o arginina y tirosina.
4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 - 3, en donde dicho pH de dicha mezcla de reacción antes de dicho paso de combinación es al menos 12.
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1-4, en donde dicha solución acuosa ácida se combina como una solución de alimentación a dicha mezcla de reacción durante dicha ultrafiltración.
6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 - 5, en donde (i) la mezcla de reacción contiene polipéptidos COP-1 desprotegidos y (ii) la ultrafiltración de dicha mezcla de reacción modificada produce sales de adición de ácido de COP-1 purificadas.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho ácido en dicha solución acuosa ácida es ácido acético y dicha sales de adición de ácido de COP-1 son sales de adición de ácido acético de COP-1.
8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde dicha mezcla de reacción modificada tiene un pH que difiere del punto isoelectrico promedio de dichos polipéptidos COP-1 desprotegidos en al menos una unidad de pH.
9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 - 8, en donde dicha ultrafiltración comprende pasar dicha mezcla de reacción modificada, que contiene preferiblemente dichas sales de adición de ácido de COP-1, tales como sales de ácido acético, a través de una membrana, en donde la membrana tiene un corte de peso molecular de 1 a 10 kilodaltons.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha ultrafiltración comprende además adicionar una solución ácida acuosa de alimentación, preferiblemente una solución acuosa de ácido acético de alimentación, a dicha mezcla de reacción modificada, que contiene preferiblemente dichas sales de ácido acético de COP-1, durante dicha pasada.
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6 - 10, donde dicha ultrafiltración se realiza hasta que la mezcla de reacción modificada, que contiene preferiblemente sales de ácido acético de COP-1, tiene un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.0.
12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6 - 11, en donde dicha ultrafiltración se lleva a cabo por no más de 20 horas, y la concentración de las sales de ácido acético de COP-1 en dicha mezcla de reacción modificada

después de dicha ultrafiltración es de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 gramos por litro.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6 - 12, donde dichos polipéptidos COP-1 purificados tienen un peso molecular promedio de 4 a 11 kilodaltons.

14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6 - 13, que comprende además:

a) polimerizar una mezcla de N-carboxianhidridos de alanina, ácido glutámico protegido, lisina protegida y tirosina para formar polipéptidos COP-1 protegidos, y

b) tratar dichos polipéptidos COP-1 protegidos con al menos un agente de desprotección para obtener dichos polipéptidos COP-1 desprotegidos.

15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicho ácido glutámico protegido comprende un grupo protector de bencilo o metoxi, y dicha lisina protegida comprende un grupo protector de imida cíclica o t-butoxicarbonilo.

16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1-15, que comprende además liofilizar dicha mezcla de reacción purificada, preferiblemente dichos polipéptidos COP-1 purificados.

PATENTE DE INVENCION☐

MODELO DE UTILIDAD☐

Art 33 Decisión 486/00

☐ Indicación que solicita una patente

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)

Completa☐

Incompleta☐

PATENTE DE INVENCION PCT☒ MODELO DE UTILIDAD PCT☐

Art .33 Decisión 486/00, Circular Única

1☒

Indicación que se solicita una PCT

14☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capitulo descriptivo, reivindicatorio, resume)

☐ Dibujos de ser estos pertinentes.

2☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa☒

Incompleta☐

DISEÑO INDUSTRIAL☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que Incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa☐

Incompleta☐

ESQUEMA TRAZADO☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación grafica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa☐

Incompleta☐