

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 529**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C08G 69/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2009 E 09801174 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2382233**

54 Título: **Un proceso para purificar una mezcla de polímeros**

30 Prioridad:

24.12.2008 US 140751 P

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

28.09.2016

73 Titular/es:

**SYNTHON B.V. (100.0%)
Microweg 22
6545 CM Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:

LUTEN, JORDY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 584 529 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un proceso para purificar una mezcla de polímeros

5 **Antecedentes de la invención**

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

10 La polimerización de monómeros naturales o sintéticos es bien conocida, y se describe en libros de texto antiguos tales como, por ejemplo, Organic Chemistry de Morrison y Boyd, 3ª edición, 1980, capítulo 32. Los polipéptidos son una clase específica de los polímeros formados mediante polimerización de aminoácidos.

15 Los "polipéptidos de copolímero" se forman generalmente mediante una copolimerización aleatoria de aminoácidos. En este tipo de copolimerización, varios aminoácidos diferentes que tienen los grupos carboxi o amino activados se mezclan entre sí en condiciones de reacción, en el que la formación del enlace peptídico entre los diferentes tipos de aminoácidos presentes en la mezcla de reacción es aleatoria. También se conoce en la técnica que los grupos químicos reactivos que no forman parte de la estructura principal del polímero, y que deben permanecer inalterados después de la polimerización, se deben proteger mediante grupos protectores. Tras finalizar la polimerización, estos grupos protectores se eliminan químicamente.

20 Un método para conformar un copolímero que contiene leucina y fenilalanina mediante polimerización aleatoria se describe en el documento US 2.657.972.

25 El documento US 3.849.550 describe un método para conformar un copolímero que contiene alanina (A), ácido glutámico (E), lisina (K), y tirosina (Y) mediante polimerización aleatoria. El método utiliza grupos laterales protegidos, seguido por dos etapas de desprotección, pero no especifica ninguna etapa de purificación. El copolímero resultante, que posteriormente se ha denominado como Copolímero-1 (COP-1) (véase, por ejemplo, el documento US 5.800.808), se notificó que tenía una relación mola de A:E:K:Y de 6:2:4.5:1.

30 El documento US 5.800.808 describe métodos para obtener COP-1 que tiene un perfil de peso molecular específico, con la posterior purificación mediante diálisis o ultrafiltración. Se notificó que COP-1 tenía una relación mola de A:E:K:Y de 6:2:5:1. La patente no menciona los métodos de purificación aplicables industrialmente.

35 El documento WO 2006/083608 describe métodos para fabricar COP-1 y menciona la ultrafiltración para quitar los grupos protectores y las 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), se llevó a cabo la ultrafiltración usando una membrana de 5 kilodalton para eliminar impurezas de bajo peso molecular. Tras 6 ciclos de ultrafiltración, la solución se acidificó con ácido acético hasta conseguir un pH de 4,0. Se añadió agua, y la solución se ultrafiltró hasta conseguir un pH de 5,5. La solución se concentró y se liofilizó durante 60 horas.

40 El documento US 2008/0021192 describe métodos para fabricar COP-1 y posteriormente purificar el COP-1, tales como mediante diálisis, cromatografía, filtración, etc. Se notificó que COP-1 tenía una relación mola de A:E:K:Y correspondiente a ~4,49:~1,48:~3,56:1. En una realización (esquema 5), COP-1 se purifica usando ultrafiltración. Una mezcla de reacción que contenía el COP-1 se filtró para eliminar todo el material insoluble y el filtrado se pasó por una ultrafiltración utilizando una membrana de 1 kilodalton, haciendo circular en primer lugar agua hasta observar pH 8 en el permeato, y a continuación haciendo circular ácido acético al 0,3 % en agua hasta un pH de 5,5-6,0 en el retentato. A continuación, la solución se liofilizó para obtener aparentemente COP-1 en forma de una sal de ácido acético en forma sólida.

50 El documento WO 2006/050122 enseña un proceso en el que una mezcla de reacción que contiene un polipéptido copolimérico, cuya mezcla tiene un pH de 10 o superior, se mezcla con ácido acético de forma que disminuya el pH de dicha mezcla acuosa antes de llevar a cabo la diafiltración.

55 Los métodos de purificación del COP-1 mediante ultrafiltración de la técnica anterior anteriormente descritos son procedimientos multietapa adecuados para una experimentación a escala de laboratorio. Sigue existiendo necesidad, sin embargo, de un método de ultrafiltración más sencillo y/o más industrialmente aplicable para purificar mezclas de reacción complejas que comprenden polipéptidos, especialmente COP-1.

60 **Sumario de la invención**

65 La presente invención se basa en la observación de que los procesos de ultrafiltración de la técnica anterior frecuentemente padecen la obturación de la membrana filtrante y/o la precipitación del polipéptido copolimérico durante la ultrafiltración. La presente invención se basa parcialmente en el descubrimiento de que, si se proporciona un ácido y/o se forma una sal de adición de ácido del polipéptido en una etapa inicial del proceso, dichos problemas de obturación y/o precipitación se pueden reducir o evitar y, en correspondencia, se puede reducir el número de etapas de ultrafiltración y/o el tiempo necesario.

De acuerdo con ello, 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 varios polipéptidos copoliméricos que colectivamente 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, en la que dicha solución acuosa ácida se combina con una solución de alimentación de dicha mezcla de reacción durante dicha ultrafiltración. El ácido utilizado puede ser un ácido orgánico o inorgánico y normalmente es un ácido orgánico que tiene de 1 a 8 átomos de carbono, más normalmente de 1 a 4 átomos de carbono, tal como ácido acético. Los polipéptidos generalmente se forman a partir de los aminoácidos alanina; ácido glutámico y/o ácido aspártico; lisina y/o arginina; y tirosina.

En un aspecto específico, el proceso anterior se puede usar para fabricar COP-1 purificado. Más específicamente, el polipéptido copolimérico de dicho proceso es el polipéptido COP-1, y la ultrafiltración de dicha mezcla de reacción modificada proporciona las sales de adición de ácido de COP-1 purificado. Normalmente, el proceso comprende: (i) añadir una solución ácida acuosa a una mezcla de reacción que contiene polipéptidos COP-1 no protegidos para obtener sales de adición de ácido de COP-1 en una mezcla de reacción modificada; y (ii) ultrafiltrar dicha mezcla de reacción modificada que contiene dichas sales de adición de ácido de COP-1 para formar sales de adición de ácido de COP-1 purificado; en la que dicha solución acuosa ácida se combina con una solución de alimentación de dicha mezcla de reacción durante dicha ultrafiltración. El ácido puede ser orgánico o inorgánico, como se ha mencionado anteriormente, y de forma típica es ácido acético. La mezcla de reacción modificada que contiene dichas sales de ácido acético de COP-1 tiene generalmente un pH que difiere del punto isoeléctrico promedio de los polipéptidos COP-1 no protegidos en al menos una unidad de pH. Normalmente, la mezcla de reacción que contiene dichos polipéptidos de COP-1 no protegidos tiene un pH superior o igual a aproximadamente 12 antes de dicha adición de la etapa (i). En el caso habitual, la adición de la solución de ácido acético disminuye el pH de la mezcla de reacción desde su valor de partida típico de aproximadamente 12-13 a 10 o inferior. La concentración de dicha solución acuosa de ácido acético es normalmente de 0,05 a 0,5 % de ácido acético en volumen, tal como aproximadamente de 0,1 a 0,3 %.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de dicho proceso de ultrafiltración. Específicamente, en un proceso para purificar polipéptidos de COP-1, que comprende someter los polipéptidos de COP-1 no protegidos en una mezcla de reacción a la ultrafiltración, se puede realizar una mejora que comprende la etapa de añadir un ácido, especialmente ácido acético, a la mezcla de reacción alcalina durante la ultrafiltración.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a un proceso para purificar polipéptidos copoliméricos tales como los polipéptidos de COP-1 mediante la realización de la ultrafiltración de la solución de polipéptidos en presencia de un ácido y/o la 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 polipéptidos copoliméricos en una etapa temprana de la ultrafiltración reduce o evita la obturación de la membrana filtrante y/o la precipitación de los polipéptidos copoliméricos durante la ultrafiltración. Al proporcionar el ácido antes de que se produzca la precipitación del polipéptido copolimérico y/o que se produzca la obturación, el proceso se puede realizar de forma rápida y eficaz. Además, se puede reducir el número de etapas de ultrafiltración, por ejemplo, no hay necesidad de intercambiar repetidamente los líquidos del proceso durante la ultrafiltración, y menos medidas (por ejemplo, medidas de pH) son necesarias para determinar el punto final de la purificación de la ultrafiltración.

Los polipéptidos copoliméricos a purificar mediante la invención son una mezcla de varios polipéptidos que colectivamente tienen más aminoácidos básicos que aminoácidos ácidos. Frecuentemente, los polipéptidos copoliméricos se forman a partir de alanina; ácido glutámico y/o ácido aspártico; lisina y/o arginina; y tirosina. Pueden estar presentes otros aminoácidos, pero normalmente, los polipéptidos copoliméricos están limitados a estos 4 a 6 aminoácidos. Los polipéptidos copoliméricos tienen varias longitudes de cadena, secuencias, y pesos moleculares, y colectivamente tienen un peso molecular promedio que normalmente está comprendido entre 2 y 40 kilodaltons.

Una realización preferida de la presente invención se refiere la purificación de los polipéptidos copoliméricos a los que se hace referencia como COP-1. El término "COP-1" ("Copolímero-1") se refiere a una mezcla de polipéptidos preparada a partir de los aminoácidos alanina (A), ácido glutámico (E), lisina (K), y tirosina (Y). La relación molar de A:E:K:Y en COP-1 se ha notificado de forma variada. Por ejemplo, la siguiente tabla ilustra las diferentes relaciones molares adscritas a COP-1:

Fuente	relación molar A:E:K:Y
documento US 3.849.550	6: 2: 4,5: 1
documento US 5.800.808	6: 2: 5: 1
documentos WO 2006/083608 y US 2008/0021192	~4,49 : ~1,48 : ~3,56 : 1
NDA n.º 020622 para COPAXONE®	4,5: 1,5: 3,5: 1

Para los fines de esta solicitud, se pretende que el término polipéptidos de "COP-1" abarque todas estas variaciones en las relaciones molares de A:E:K:Y.

5 La ultrafiltración, en general, es una técnica de purificación / separación bien conocida en la que una solución se pone en contacto con una membrana de ultrafiltración bajo una presión aplicada. La presión aplicada puede ser, por ejemplo, presión osmótica o presión hidrostática. La presión aplicada fuerza al disolvente y las moléculas más pequeñas a atravesar la membrana, mientras que las moléculas más grandes quedan retenidas por la membrana, en función del corte de pesos moleculares de la membrana. La solución que pasa a través de la membrana se denomina permeato. La solución que contiene las moléculas retenidas se denomina retentato. La membrana de ultrafiltración puede retener partículas de 1 kilodalton a 1000 kilodaltons. La membrana de ultrafiltración debe ser inerte respecto a la mezcla de reacción. Los proveedores de membranas tienen criterios de selección fácilmente disponibles. La membrana tiene, preferentemente, un corte de pesos moleculares de 1 a 10 kilodaltons, tal como de 3 o 5 kilodalton. Normalmente, el volumen del retentato se mantiene constante durante la ultrafiltración añadiendo una solución de alimentación al retentato. Esto permite controlar mejor el proceso de ultrafiltración y la pureza del retentato.

20 La ultrafiltración utilizada en la invención comprende de forma típica hacer pasar una mezcla de reacción que contiene los polipéptidos copoliméricos, tales como COP-1, a través de una membrana que tiene un corte de pesos moleculares de, por ejemplo, 1 a 10 kilodaltons, por lo cual los polipéptidos copoliméricos quedan retenidos en el retentato y se purifica porque las entidades de menor peso molecular atraviesan la membrana. Los polipéptidos copoliméricos se "purifican" en el sentido de que al menos cierta cantidad de los residuos no deseados de la mezcla de reacción se eliminan/separan de los polipéptidos copoliméricos retenidos. La eliminación de las moléculas pequeñas, tales como bases y sus sales, durante la ultrafiltración conduce por lo general a una reducción en el pH de la mezcla de reacción inicialmente alcalina o retentato.

25 Un aspecto la invención se refiere a combinar una mezcla de reacción que tiene un pH inicial de 10 o superior, preferentemente de 12 o superior, y que contiene varios polipéptidos copoliméricos (es decir, que colectivamente 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 inferior y es a veces de 8 o inferior y normalmente está en el intervalo de 4 a 8 o de 5 a 7. La mezcla de reacción modificada se somete a ultrafiltración para formar una mezcla de reacción purificada. Por claridad, la "mezcla purificada" no se necesita para obtener una pureza casi completa, sino que realmente solo necesita ser más pura que la mezcla de reacción inicial. Esto es, al eliminar parte de las moléculas pequeñas, el resto de los polipéptidos son más puros y se considerarían por tanto como "purificados". La "mezcla de reacción" es normalmente el resultado de la síntesis de polipéptidos, pero por lo general incluye cualquier líquido que contenga los polipéptidos copoliméricos cuya purificación, en cierta medida, se desea. Por ejemplo, la mezcla de reacción se puede concentrar antes de llevar a cabo la etapa de combinación con el ácido. Pero la mezcla de reacción tiene un pH superior a 10 en el momento de la etapa de combinación. La solución acuosa de ácido se puede basar en ácidos orgánicos o inorgánicos. Los ácidos deberán disolverse normalmente en la solución acuosa. Normalmente, se utilizan ácidos orgánicos que tienen de 1 a 8 átomos de carbono, más normalmente de 1 a 4 átomos de carbono; es decir, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, o ácido butírico. Aunque en el presente documento se haga referencia a la forma singular, se entiende que el término "ácido" también incluye la forma plural; es decir, se pueden utilizar uno o más ácidos en la solución. En general, el agua es el único disolvente, aunque el uso de alcoholes inferiores u otros disolventes orgánicos miscibles con el agua no están prohibidos en la fabricación de la solución acuosa ácida.

45 Las dos etapas se llevaron a cabo simultáneamente. Esto es, mientras la mezcla de reacción está sometida a ultrafiltración, una solución acuosa ácida se puede combinar con la anterior para formar la mezcla de reacción modificada *in situ*. Esta etapa de "combinación" y ultrafiltración simultánea se puede llevar a cabo convenientemente si se emplea una solución acuosa ácida como solución de alimentación en el proceso de ultrafiltración.

50 Como 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 ahora además con respecto a esta realización en la que el ácido es ácido acético. Debe entenderse que otros ácidos, diferentes a los que se han mencionado anteriormente, se pueden usar en vez del ácido acético. El proceso comprende añadir una solución acuosa de ácido acético a la mezcla de reacción que contiene COP-1 sin proteger 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 el que la solución acuosa de ácido acético se añade (y se forman las sales de ácido acético de COP-1) durante el sometimiento de la mezcla de reacción que contiene los polipéptidos COP-1 sin proteger de cualquier ultrafiltración.

60 La solución acuosa de ácido acético contiene normalmente de 0,05 a 0,5 % de ácido acético por volumen en agua, tal como aproximadamente de 0,1 a 0,3 % de ácido acético por volumen en agua.

65 La expresión "mezcla de reacción que contiene los polipéptidos COP-1 sin proteger" se refiere a una solución que contiene los polipéptidos COP-1 que no tienen sustancial o prácticamente grupos de aminoácidos secundarios protegidos por un grupo protector. Por ejemplo, cuando se preparan polipéptidos COP-1 mediante polimerización

aleatoria (por ejemplo, como se describe en el documento US 3.849.550), tras desproteger los grupos de aminoácidos secundarios, la mezcla de reacción es una "mezcla de reacción que contiene polipéptidos COP-1 sin proteger". Como otro ejemplo, cuando se preparan polipéptidos COP-1 mediante técnicas de ADN recombinante (por ejemplo, como se describe en el documento EP 0383620) después que se han expresado los polipéptidos COP-1 recombinantes en *E. coli* y escindido de la proteína de fusión Proteína A/rCOP-1, la mezcla de reacción es una "mezcla de reacción que contiene polipéptidos COP-1 sin proteger". Por tanto, el término "polipéptidos COP-1 sin proteger" se refiere a polipéptidos COP-1 que se sometieron a etapas de protección y de desprotección (tales como en polimerización aleatoria) y a polipéptidos COP-1 que no se han sometido a una etapa de protección (tal como en las técnicas de ADN recombinante).

En una forma preferida de esta realización, la mezcla de reacción modificada que contiene las sales de ácido acético de COP-1 tienen un pH de menos de o igual a aproximadamente 10 mientras que las sales de ácido acético de COP-1 se someten a ultrafiltración. Cuando la mezcla de reacción que contiene los polipéptidos COP-1 sin proteger tiene un pH de más de 10, tal como un pH de más de o igual a aproximadamente 12, la adición de la solución acuosa de ácido acético disminuye el pH al pH deseado de menos de o igual a aproximadamente 10. Dicho pH de partida alto no se requiere estrictamente, sin embargo. Esto es, es posible que la mezcla de reacción de partida que contiene los polipéptidos COP-1 sin proteger tenga un pH de menos de 10 antes de que se añada la solución acuosa de ácido acético. No obstante, la realización típica de la invención utiliza una mezcla de reacción que tiene un pH de aproximadamente 13 y la adición de ácido acético al anterior reduce el pH a aproximadamente 10 o menos. En algunas de estas realizaciones, el pH de la mezcla de reacción modificada durante la ultrafiltración es menor de 8, tal como un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 o incluso de aproximadamente 5 a aproximadamente 7. El medio de reacción modificado resultante que tiene dicho pH reducido se somete a ultrafiltración para purificar las sales de ácido acético de COP-1.

La ultrafiltración de los polipéptidos puede experimentar un gradiente de concentración hacia la interfase de la membrana, conocido como polarización por concentración. La polarización de la concentración tiene un efecto negativo sobre el flujo (transporte de masa sobre la membrana). Asimismo, la fuerza iónica del retentato afecta el flujo. Los flujos son generalmente mayores a fuerza iónica baja y disminuyen cerca del pH isoelectrico del(de los) polipéptido(s) que se están ultrafiltrando. Una fuerza iónica alta da como resultado también una presión osmótica alta 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, completamente ionizada, 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 un promedio de puntos isoelectricos de los polipéptidos contenidos en la mezcla.

Los polipéptidos COP-1, en su conjunto, tienen más aminoácidos básicos que aminoácidos ácidos, y el punto isoelectrico promedio para los polipéptidos COP-1 es normalmente mayor de aproximadamente 7, por ejemplo, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 11, tal como aproximadamente 9 o aproximadamente 10, dependiendo en su conjunto de la relación real entre los aminoácidos básicos y los aminoácidos ácidos presentes en los polipéptidos COP-1. De manera ventajosa, la mezcla de reacción modificada que contiene dichas sales de ácido acético de COP-1 tiene generalmente un pH que difiere del punto isoelectrico promedio de los polipéptidos COP-1 no protegidos en al menos una unidad de pH, debido a que el transporte de masa sobre la membrana (flujo) es más bajo en el pH isoelectrico. Parece que la presencia de los aniones de ácido acético en la mezcla de reacción/retentato modificada evita o reduce la precipitación de los polipéptidos a medida que la mezcla/retentato pasa a través del pH que corresponde al punto isoelectrico u otro punto de precipitación de los polipéptidos COP-1 sin proteger.

Se usa normalmente una solución de alimentación durante la ultrafiltración. La solución de alimentación se usa como la solución acuosa ácida en la etapa de combinación o adición. Preferentemente, la concentración de una solución acuosa de alimentación de ácido acético es de aproximadamente 0,05 a 0,5 % en volumen, tal como aproximadamente 0,1 a 0,3 % en volumen. Concentraciones mayores de ácido acético pueden dar como resultado una eliminación menos eficaz de ácido acético durante las etapas de aislamiento (liofilización) posteriores. Opcionalmente, la solución de alimentación puede cambiarse a agua en las últimas etapas del proceso de ultrafiltración para eliminar el ácido acético en exceso; por ejemplo, una vez que el pH es menor de 6. La concentración de ácido acético en la mezcla de reacción no excede normalmente la concentración de ácido acético en la solución de alimentación.

El volumen/velocidad de adición de la solución de alimentación se ajusta normalmente para conseguir una concentración de sales de ácido acético de COP-1 en el retentato de aproximadamente 1 a 50 gramos por litro durante la ultrafiltración, a menudo 20 a 50 gramos por litro, aunque se pueden usar concentraciones mayores. Durante la ultrafiltración, la concentración no debe ser generalmente mayor de aproximadamente 100 gramos por litro y deben evitarse concentraciones de alrededor de 250 gramos por litro o mayores. Estas concentraciones mayores pueden tener un efecto negativo sobre el flujo.

Tras la finalización de la etapa de ultrafiltración, el retentato (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 aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6. De manera ventajosa, se puede llevar a cabo la ultrafiltración durante 20 horas o menos, preferentemente 10 horas o menos, y más preferentemente 5 horas o menos. La concentración

de los polipéptidos COP-1 purificados en el retentado tras la finalización es normalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 gramos por litro, generalmente 20 a 50 gramos por litro, aunque se pueden obtener concentraciones mayores tales como 75 gramos por litro.

- 5 En una realización preferida, los polipéptidos COP-1 purificados tienen un peso molecular promedio de 4 a 11 kilodaltons (tal como de 5 a 9 kilodaltons o 6 a 10 kilodaltons) o 7 a 12 kilodaltons. Normalmente, menos de 5 % en peso de los polipéptidos COP-1 purificados tienen un peso molecular promedio de 40 kilodaltons. Preferentemente, una fracción molar de polipéptidos COP-1 que tienen un peso molecular de 2 a 20 kilodaltons en dichos polipéptidos COP-1 purificados es al menos de 0,75. El término "fracción molar" es el número de moles de una sustancia
10 componente en una mezcla dividido por el número total de moles en la mezcla.

Se pueden preparar polipéptidos COP-1 adecuados para el uso en el proceso de purificación de la presente invención utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, los polipéptidos COP-1, incluyendo los polipéptidos COP-1 que tienen un perfil específico de peso molecular, se preparan comúnmente mediante polimerización aleatoria tal como se muestra en los documentos US 5.800.808 y US 2008/0021192. Un método para preparar polipéptidos
15 COP-1 utilizando tecnología de ADN recombinante, sin embargo, se sabe también que se describe en el documento EP 0383620.

Por tanto, el proceso de purificación de la presente invención puede incluir además etapas dirigidas a preparar los polipéptidos COP-1 sin proteger mediante polimerización aleatoria. En particular, el proceso de purificación puede comprender además polimerizar una mezcla de N-carboxianhídridos de alanina, ácido glutámico protegido, lisina protegida, y tirosina para formar polipéptidos COP-1 protegidos y tratar los polipéptidos COP-1 protegidos con al menos un agente desprotector para obtener los polipéptidos COP-1 sin proteger. El ácido glutámico protegido se puede formar utilizando, por ejemplo, un grupo protector bencilo o un grupo protector metoxi. Por otra parte, la lisina protegida se puede formar utilizando, por ejemplo, una imida cíclica o un grupo protector t-butoxicarbonilo.
20

La distribución de pesos moleculares de los polipéptidos COP-1 se ve afectada por varios factores, tales como la concentración del iniciador de la polimerización, la temperatura de reacción, y el tiempo de reacción. Al finalizar la reacción de polimerización, la mezcla del polipéptido resultante se puede someter, por ejemplo, a hidrólisis ácida o alcalina para obtener un peso molecular promedio inferior con una distribución de peso molecular más amplia, tal como los polipéptidos COP-1 que tienen los perfiles de pesos moleculares descritos anteriormente. Se conocen en la técnica otros métodos para obtener un perfil de peso molecular deseado.
25

Se conocen en la técnica los agentes desprotectores adecuados para su uso con los correspondientes agentes protectores. Por ejemplo, se puede eliminar un grupo protector éster de bencilo de un ácido glutámico protegido tras polimerización mediante ácidos adecuados, tal como ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético, que está preferentemente exento de bromo. Dicha etapa de desprotección ácida puede utilizarse también convenientemente como etapa de despolimerización, de tal manera que la desprotección y la despolimerización se combinan en una etapa. Como otro ejemplo, se pueden eliminar los grupos protectores trifluoroacetilo de una lisina protegida con una base orgánica, tal como piperidina. Normalmente, se usa un primer agente desprotector para eliminar los grupos protectores de los restos de ácido glutámico (tal como ácido bromhídrico al 33 %), y a continuación se usa un segundo agente desprotector para eliminar los grupos protectores de los restos de lisina tal como piperidina. La expresión "tratar dichos polipéptidos COP-1 protegidos con al menos un agente desprotector para obtener dichos polipéptidos COP-1 sin proteger" incluye múltiples etapas de desprotección utilizando agentes de desprotección diferentes, así como una única etapa de desprotección o múltiples etapas de desprotección utilizando el mismo agente de desprotección.
35

Opcionalmente, los polipéptidos COP-1 purificados se pueden aislar a partir del retentado. Por ejemplo, el proceso de purificación de la presente invención puede comprender además liofilizar los polipéptidos COP-1 purificados en forma de sal tras la ultrafiltración. De esta forma, se pueden obtener acetatos de polipéptidos COP-1 sólidos. La liofilización permite también la eliminación del ácido acético en exceso utilizado en la ultrafiltración.
40

En la realización anteriormente preferida, la solución de ácido acético se combina con la mezcla de reacción como solución de alimentación al comienzo de la ultrafiltración, o bien, durante la ultrafiltración. En esta realización, el ácido debe combinarse con la mezcla de reacción no más tarde que el punto isoeléctrico u otro punto de pH al cual se produce la precipitación del polipéptido, es decir, añadirse antes de la precipitación del polipéptido, y generalmente no más tarde de un pH de 10. Para una mezcla de reacción de COP-1, el ácido se combina normalmente no más tarde de un pH de alrededor de 12. El resto de condiciones tal como las que se han indicado anteriormente se aplican igualmente a esta realización.
45

Aunque la descripción anterior se ha centrado principalmente en purificar los polipéptidos COP-1 utilizando ácido acético y sus sales, la presente invención no está limitada de esta manera y las condiciones de ultrafiltración, incluyendo la solución de alimentación, etc., tales como se han indicado anteriormente son generalmente aplicables a todos los aspectos de la invención. Del mismo modo, los polipéptidos COP-1 se purificarían también utilizando otras soluciones ácidas y sus sales de adición de ácido correspondientes. De manera similar, además de COP-1, otros polipéptidos que se han descrito previamente en el presente documento pueden purificarse de manera similar
50

como se describe para COP-1.

La invención se describirá además con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Se preparó un polipéptido como se describe en el documento US 3.849.550. La mezcla de reacción resultante, una solución de 50 mililitros (piperidina 1 M) que contenía 1,0 gramos de polímero protegido con trifluoroacetilo, se diluyó a 500 ml con un 0,3 % en volumen de ácido acético en agua desmineralizada. El pH de la solución resultante es de aproximadamente 10. La solución diluida se introdujo en el depósito de un sistema Millipore Labscale TFF, provisto de un filtro Pellicon XL con una membrana de 5 kDa (PLCCC 5, 50 cm²). En las condiciones seleccionadas (presión de entrada 30 psi (207 kPa), presión de salida 10 psi (69 kPa), flujo del permeato 100 ml/h), se usó ácido acético al 0,3 % en agua desmineralizada como solución de alimentación para purificar el polímero. Después de 16 horas, el retentato tenía un pH de aproximadamente 5, se detuvo la alimentación, y el retentato se ultrafiltró durante 4 horas más para aumentar la concentración del polipéptido en el retentato a aproximadamente 20 gramos por litro. El tiempo de trabajo total fue de 20 horas.

Ejemplo 2 (ejemplo comparativo): Como 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 poliméricos cuando el retentato alcanzó un pH de aproximadamente 8 o 9. Estos agregados parecieron bloquear el filtro, dando como resultado una presión de membrana aumentada de más de 4 bares (400 kPa), que estaba muy por encima de las especificaciones de seguridad indicadas por el suministrador. La solución de alimentación se cambió a continuación inmediatamente a un 0,3 % en volumen de ácido acético, y se continuó la ultrafiltración hasta que el pH del retentato era de aproximadamente 5. El tiempo de trabajo total aumentó de 20 a 24 horas.

Una comparación de los ejemplos muestra las ventajas del método de acuerdo con la invención. Además de omitir un cambio en la solución de alimentación, se disminuyó el tiempo de trabajo total significativamente ya que se redujo o evitó la precipitación del polipéptido. Sorprendentemente, no se observó precipitación o agregación en el Ejemplo 1 cuando el retentato pasó a través del punto isoeléctrico del polipéptido. Adicionalmente, en el Ejemplo 1, se redujo o se eliminó el riesgo de daño de membrana. Esto es ventajoso porque cuando se hace funcionar una membrana fuera de los límites de presión de seguridad especificados, esta debe revisarse tras completar la tarea de ultrafiltración. Cuando está dañada, ha de repetirse la tarea de ultrafiltración.

Cada una de las patentes, solicitudes de patente, y los folletos mencionados anteriormente se incorporan en el presente documento por referencia. Será evidente que la invención que se ha descrito se puede variar de muchas maneras y se contempla que todas las modificaciones mencionadas estén comprendidas en el alcance de la invención como se define en las siguientes modificaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de ultrafiltración, que comprende:
 - 5 combinar una mezcla de reacción que tiene un pH de 10 o más y que contiene varios polipéptidos formados por copolimerización aleatoria de aminoácidos, 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,
 - 10 en donde dicha solución acuosa ácida se combina con una solución de alimentación de dicha mezcla de reacción durante dicha ultrafiltración.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución acuosa ácida contiene un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácidos orgánicos que tienen de 1 a 8 átomos de carbono, preferentemente ácido acético, y ácidos inorgánicos.
3. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dichos polipéptidos se componen de alanina; ácido glutámico y/o ácido aspártico; lisina y/o arginina; y tirosina.
- 20 4. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en el que dicho pH de dicha mezcla de reacción antes de dicha etapa de combinación es al menos 12.
5. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en el que (i) la mezcla de reacción contiene polipéptidos COP-1 sin proteger y (ii) la ultrafiltración de dicha mezcla de reacción modificada da como resultado sales de adición de ácido de COP-1 purificadas.
- 25 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho ácido en dicha solución acuosa ácida es ácido acético y dichas sales de adición de ácido de COP-1 son sales de adición de ácido acético de COP-1.
- 30 7. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en el que dicha mezcla de reacción modificada tiene un pH que difiere del punto isoeléctrico promedio de dichos polipéptidos COP-1 sin proteger en al menos una unidad de pH.
8. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que dicha ultrafiltración comprende hacer pasar dicha mezcla de reacción modificada, tal como las sales de ácido acético, a través de una membrana, en donde la membrana tiene un corte de pesos moleculares de 1 a 10 kilodaltons.
- 35 9. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 5-8, en el que dicha ultrafiltración se lleva a cabo hasta que la mezcla de reacción modificada, que contiene preferentemente las sales de ácido acético de COP-1, tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0.
- 40 10. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 5-9, en el que dicha ultrafiltración se lleva a cabo durante 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 de 2 a aproximadamente 50 gramos por litro.
- 45 11. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 5-10, en el que dichos polipéptidos COP-1 purificados tienen un peso molecular promedio de 4 a 11 kilodaltons.
- 50 12. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 5-11, que comprende además:
 - a) polimerizar una mezcla de N-carboxianhídridos 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 sin protección.
- 55 13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho ácido glutámico protegido comprende un grupo protector bencilo o un grupo protector metoxi, y dicha lisina protegida comprende una imida cíclica o un grupo protector t-butoxicarbonilo.
- 60 14. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-13, que comprende además liofilizar dicha mezcla de reacción purificada, preferentemente dichos polipéptidos COP-1 purificados.