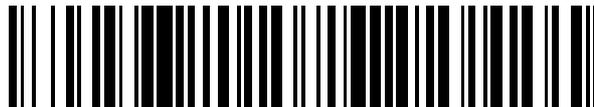


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 055**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 14/59 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2010 E 10713424 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2414380**

54 Título: **Método para purificar FSH biotecnológica**

30 Prioridad:

01.04.2009 EP 09157133

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

25.11.2015

73 Titular/es:

**RATIOPHARM GMBH (100.0%)
Graf-Arco-Strasse 3
89079 Ulm , DE**

72 Inventor/es:

**SCHECKERMANN, CHRISTIAN;
EICHINGER, DIETMAR y
ARNOLD, STEFAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 552 055 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

Método para purificar FSH biotecnológica

La presente invención se refiere a un método para purificar una hormona estimulante del folículo biotecnológica (FSH) o la variante de FSH biotecnológica. El método comprende las etapas de someter un líquido que contiene una FSH biotecnológica o la variante de FSH biotecnológica a una cromatografía de intercambio aniónico, a una cromatografía de interacción hidrófoba y a una cromatografía de afinidad de los colorantes, en donde estas etapas cromatográficas pueden realizarse en cualquier orden, y en donde el método no comprende una cromatografía de intercambio aniónico débil ni una cromatografía de fase inversa. El método de purificación da lugar a un alto rendimiento de FSH biotecnológica que tiene un grado de pureza deseado. La FSH obtenida es especialmente útil para la profilaxis y el tratamiento de los trastornos y las indicaciones médicas donde las preparaciones de FSH se consideran remedios útiles.

La hormona estimulante del folículo (FSH) es producida por las células gonadótropas de la pituitaria anterior y liberada en la circulación. La FSH actúa junto con la hormona luteinizante (LH) en el control de la maduración de ovocitos en las hembras y de la espermatogénesis en los machos. Tanto LH como FSH pertenecen a una familia de glucoproteínas heterodiméricas que consisten en dos cadenas alfa y beta unidas por enlaces no covalentes que están codificadas por genes independientes. Tanto la cadena alfa como la beta están glucosiladas. La subunidad α consiste en 92 restos de aminoácidos mientras que la subunidad β consiste en 111 restos de aminoácidos, cada una de las cuales tiene dos sitios potenciales de glucosilación unidos a asparagina.

La FSH humana se utiliza para tratar a mujeres con anovulación, para la estimulación del desarrollo folicular múltiple (superovulación) y en la preparación para una concepción asistida como la FIV, ICSI, GIFT o CIFT. Además, la FSH humana se usa para estimular la maduración de los folículos en mujeres con poca o ninguna producción de FSH y para estimular la espermatogénesis en hombres que padecen oligospermia.

En un régimen de tratamiento típico para provocar la ovulación, se administra a una paciente inyecciones diarias de FSH o una variante (aproximadamente 75 a 450 UI de FSH/día) durante un período de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 días. En un régimen de tratamiento típico para hiperestimulación ovárica controlada, se administra a una paciente inyecciones diarias de FSH o una variante (aproximadamente 150 a 600 UI de FSH/día) durante un período de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 días.

Para la estimulación de la espermatogénesis un régimen utilizando 150 UI de FSH tres veces a la semana en combinación con 2.500 UI de hCG dos veces a la semana ha tenido éxito en la consecución de una mejora en el recuento de espermatozoides en hombres que padecen hipogonadismo hipogonadotrópico.

Hasta la década de 1980, una fuente principal de FSH humana era la FSH aislada de la orina de las mujeres en edad de procrear. Otra forma purificada de alta pureza, la FSH obtenida de la orina fue introducida en la década de 1990, y por último una FSH biotecnológica se desarrolló y ha sido ampliamente utilizado desde el año 1998. Con la aparición de la ingeniería genética, se hizo posible producir FSH humana en cultivos de células transfectadas con las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas α y β . Las secuencias de ADN que codifican las cadenas α y β y los métodos para producir FSH biotecnológica se han descrito en p. ej. los documentos WO 88/10270, WO 86/04589 y EP 0 735 139.

Actualmente, hay dos productos comerciales de la FSH biotecnológica humana en el mercado en Alemania, GONAL-f® y Puregon®, ambos son producidos por secuencias de expresión de ADN que codifican las naturales α y β humanas en células de ovario de hámster chino (CHO).

Debido a la importancia de la FSH en el tratamiento de trastornos de fertilidad, es deseable disponer de la FSH biotecnológica de alta pureza y alta actividad específica. El tratamiento con FSH requiere inyecciones repetidas. Los preparados de FSH muy puros se pueden administrar por vía subcutánea, lo que permite la autoadministración por el paciente, aumentando así la comodidad y el cumplimiento terapéutico del paciente.

La solicitud de patente internacional WO 2006/051070 A1 de Ares Trading S.A. describe un método para purificar FSH biotecnológica que comprende las etapas siguientes: 1) cromatografía de afinidad de los colorantes, 2) cromatografía de interacción hidrófoba; y 3) cromatografía de fase inversa. Además, el documento WO 2006/051070 A1 describe un método para purificar FSH que comprende las etapas de someter FSH a 1) cromatografía de intercambio aniónico, 2) cromatografía de afinidad de los colorantes, 3) cromatografía de interacción hidrófoba, 4) cromatografía de fase inversa y 5) cromatografía de intercambio aniónico.

La solicitud de patente internacional WO 2005/063811 A1 de Ares Trading SA se refiere a un método para purificar la FSH biotecnológica humana que comprende las etapas siguientes (1) cromatografía de intercambio iónico; (2) cromatografía de ion metálico inmovilizado; y (3) cromatografía de interacción hidrófoba (CIH).

El documento WO 2007/065918 A2 de Ares Trading SA describe un método para purificar FSH que comprende la etapa de cromatografía: cromatografía de afinidad de los colorantes, cromatografía de intercambio aniónico débil,

cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico fuerte, que puede llevarse a cabo en cualquier orden.

Hay una necesidad continua de nuevos métodos para purificar FSH biotecnológica y variantes de FSH. En particular, hay necesidad de métodos de purificación que evitan el uso de etapas de cromatografía de fase inversa. Además, es deseable tener un método de purificación que no se base en la cromatografía de inmovilización, pero pueda realizarse sin esta etapa de coste intensivo.

Según la presente invención, éste y otros problemas se resuelven por medio de las características de la reivindicación principal. Las realizaciones ventajosas se definen en las subreivindicaciones.

Es un objeto de la invención proporcionar un nuevo método, ventajoso para purificar FSH biotecnológica o una variante de FSH biotecnológica.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para purificar FSH biotecnológica humana o una variante de FSH a partir de un líquido que contiene la FSH en bruto, que comprende las etapas siguientes:

- una cromatografía de intercambio aniónico,
 - una cromatografía de interacción hidrófoba, y
 - una cromatografía de afinidad de los colorantes,
- que puede realizarse en cualquier orden,

en donde el método evita cualquier cromatografía de intercambio aniónico débil, así como cualquier cromatografía de fase inversa.

En otra realización, las diferentes etapas cromatográficas se realizan en el orden siguiente: (1) cromatografía de intercambio aniónico, (2) cromatografía de interacción hidrófoba, y (3) cromatografía de afinidad de los colorantes. La cromatografía de intercambio aniónico (CII) se basa en interacciones carga-carga entre las proteínas en la muestra y las cargas inmovilizadas sobre la resina. En cromatografía de intercambio aniónico, los iones de unión de las proteínas son negativos, y el grupo funcional inmovilizado es positivo. Las resinas de intercambio aniónico comúnmente utilizadas son Q-resin, una amina cuaternaria, y resina de DEAE (dietilaminoetano). Sin embargo, en general la etapa de cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse con todas las resinas de intercambio aniónico o membranas corrientes disponibles en el mercado. Las resinas de intercambio aniónico se pueden utilizar en forma de columnas en las que se vierten previamente. Alternativamente, las columnas pueden autoprepararse. No hay limitaciones específicas en cuanto a la capacidad y la geometría de las columnas que no sean las habituales. El experto en la técnica sabe que la cantidad de resina de intercambio aniónico que debe utilizarse depende del contenido global de proteína del líquido de cultivo celular o cualquier otro líquido, p. ej., el eluido de una etapa de cromatografía anterior, aplicado a la columna en la etapa de captura.

Las resinas de intercambio aniónico fuertes típicas que pueden utilizarse para la invención comprenden grupos funcionales tales como: restos de aminoetilo cuaternario (QAE), las resinas incluyen p. ej. Toyopearl QAE (disponible en Tosoh Bioscience, Alemania), Selectacel QAE (un derivado aminoetilo cuaternario de celulosa, disponible en Polysciences Inc., Pennsylvania EE.UU.) y otros; restos de amonio cuaternario (Q), las resinas incluyen p. ej. Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, Q Sepharose HP (disponible en GE Healthcare, Alemania), Resource Q (disponible en GE Healthcare, Alemania), Macro Prep High Q (Bio-Rad, California, EE.UU.), Toyopearl Super Q (disponible de Tosoh Bioscience, Alemania), UNOsphere Q (disponible en Bio-Rad, California, EE.UU.) y grupos trimetilamonioetilo (TMAE), las resinas incluyen p. ej. Fractogel EMD TMAE (disponible en Merck, Alemania).

La cromatografía de intercambio aniónico es preferiblemente un cromatografía de intercambio aniónico fuerte que se lleva a cabo utilizando una resina de intercambio aniónico fuerte con grupos funcionales $-N^+(CH_3)_3$, o una resina con características similares.

Los ejemplos preferidos de resinas de intercambio aniónico fuertes que pueden utilizarse para la invención son resinas intercambio aniónico fuertes de amonio cuaternario conocidas en la técnica como UNOsphere Q, Q Sepharose HP y otras resinas que tienen restos de amonio cuaternario (Q).

ES 2 552 055 T3

Las características del intercambiador aniónico fuerte UNOsphere Q son las siguientes:

	Grupo funcional	-N ⁺ (CH ₃) ₃
	Capacidad iónica total	120 µeq/ml
	Capacidad de unión dinámica	
5	150 cm/hr	180 mg/ml
	600 cm/hr	125 mg/ml
	Contraión de transporte	Cl ⁻
	Tamaño medio de partícula	120 µm
	Intervalo de caudal lineal recomendado	50-1.200 cm/h
10	Estabilidad química	
	NaOH 1,0 M (20°C)	hasta 2.000 h
	HCl 1,0 M (20°C)	hasta 200 h
	Cambios de volumen	
	pH 4-10	<5%
15	NaCl 0,01-1,0 M	<5%
	Estabilidad de pH	1-14

Las características del intercambiador aniónico fuerte Q Sepharose HP son las siguientes:

	Capacidad iónica	0,14-0,20 mmol Cl ⁻ /ml
	Capacidad dinámica	70 mg BSA/ml de medio
20	Caudal de rec.	30-150 cm/h
	Presión máx. sobre el lecho relleno durante el funcionamiento	3 bar (42 psi, 0,3 MPa)
	Límite de presión del del soporte físico de la columna HiLoad	5 bar (73 psi, 0,5 MPa)
25	Tamaño medio de partícula	34 µm
	Límite de exclusión (M _r)	aprox. 4 x 10 ⁶ proteínas globulares
	Matriz	agarosa reticulada, 6%
	Estabilidad de pH	2-12 (en operación y largo plazo), 1-14 (a corto plazo)
30	Estabilidad química	estable en todos los tampones usados habitualmente

Es preferible evitar el uso de resinas de intercambio aniónico débiles, tales como las de dietilaminoetilo (DEAE) o dimetilaminoetilo (DMAE) como grupos funcionales.

La etapa de cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo preferiblemente utilizando un tampón que tiene un pH ligeramente alcalino, p. ej., a o aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 9,0, o a o aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 8,5. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, tampón de borato, trietanolamina/ácido iminodiacético Tris, acetato de amonio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. Se prefiere el uso de un tampón Tris. La elución de la resina de intercambio aniónico se consigue normalmente aumentando la conductividad de la fase móvil mediante la adición de sal, preferiblemente cloruro de sodio.

La cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) del método de la invención se puede llevar a cabo utilizando una resina de CIH con una superficie hidrófoba relativamente moderada (en comparación con la superficie hidrófoba

mucho más fuerte de una resina de fase inversa). Las proteínas con propiedades de superficie hidrófobas son atraídas por dichas resinas que normalmente tienen grupos éter, fenilo, butilo o hexilo.

La CIH puede realizarse con todas las resinas CIH corrientes disponibles en el mercado. Las resinas CIH que pueden utilizarse para la invención comprenden matrices tales como butil, fenil, propil u octil Sepharose, SOURCE 5 15 (todas disponibles en GE Healthcare, Alemania), Macro-Prep Methyl o soporte de CIH de t-butilo (Bio- Rad, Alemania) o Fractogel EMD con ligandos propilo o fenilo (Merck AG, Alemania), resinas de CIH de Toyopearl, tales como Toyopearl Butil 650 M y resinas de CIH similares (Tosoh Bioscience).

En una realización preferida, la cromatografía de interacción hidrófoba se lleva a cabo utilizando una resina que consiste en perlas de agarosa reticulada modificada con grupos fenilo, butilo u octilo, o una resina con características similares. A continuación se indican las características de Fenil Sepharose 6 FF (disponible en GE 10 Healthcare).

Densidad de ligandos

Fenil Sepharose™ 6 Fast 25 µmol/ml de medio

Flow (bajo sub)

15 Fenil Sepharose™ 6 Fast 40 µmol/ml de medio

Flow (alto sub)

Capacidad de unión

Fenil Sepharose™ 6 Fast 10 mg de IgG/ml de medio

Flow (bajo sub) 24 mg de HSA/ml de medio

20 Fenil Sepharose™ 6 Fast 30 mg de IgG/ml de medio

Flow (alto sub) 36 mg de HSA/ml de medio

Presión/caudal espec. 200-400 cm/h, columna 1 bar XK 50/60, altura del lecho 25 cm

Estabilidad del pH 2-14 (a corto plazo), 3-13 (a largo plazo)

25 Estabilidad química Estable en tampones corrientes, agentes caótopos, detergentes y disolventes orgánicos polares.

Tamaño medio de partículas 90 µm

Almacenamiento etanol al 20%

Temperatura de almacenamiento 4°C a 30°C

30 La unión de la resina de CIH se consigue en un tampón con una alta conductividad, obtenido mediante la adición de sal (NaCl, (NH₄)₂SO₄ o Na₂SO₄, por ejemplo). La elución en la etapa de CIH se lleva a cabo generalmente reduciendo la conductividad de la fase móvil (es decir, reduciendo la concentración salina), utilizando un tampón que tiene un pH a o aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9, más preferiblemente a o aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8, más preferiblemente a o aproximadamente 7 hasta aproximadamente 8.

35 Los tampones de equilibrado, lavado y elución pueden comprender todos los tipos de tampón generalmente utilizados para CIH. Por lo tanto, los agentes amortiguadores comprenden fosfato de sodio, acetato de sodio, Tris/HCl, HEPES u otros agentes amortiguadores. Además, los tampones pueden contener entre 0,5 mM y 3 M de NaCl, KCl u otras sales adecuadas, dependiendo de si el tampón se utiliza para el equilibrado, lavado o elución. Los tampones de equilibrado y lavado contienen concentraciones más altas de las sales anteriormente mencionadas que los tampones de elución.

40 Un tampón particularmente preferido en la etapa de CIH es un tampón de Tris/HCl que contiene cloruro de sodio.

La cromatografía de afinidad de los colorantes del método de la invención puede realizarse utilizando una resina que tiene como ligando inmovilizado un compuesto colorante que es bien conocido para un experto en la técnica, es decir, Cibacron Blue F3G-A. Un experto en la técnica entiende bien el término "inmovilizado" y significa que el ligando está modificado en el sentido de que está químicamente ligado a la resina.

45 En una realización preferida, la cromatografía de afinidad de los colorantes se realiza con Cibacron Blue F3G-A como ligando, acoplado por enlace covalente a cualquier matriz, p. ej., una matriz de agarosa. Preferiblemente, la cromatografía de afinidad de los colorantes se lleva a cabo utilizando la resina conocida como Blue Sepharose FF (disponible en GE Healthcare, Alemania). A continuación se dan las características técnicas de Blue Sepharose FF:

Ligando	Cibacron Blue F3G-A
Método de acoplamiento del ligando	Acoplamiento de triazina
Capacidad de unión	> 18 mg de albúmina de suero humano/ml de medio
Densidad del ligando	≈ 7 μmol de Cibacron Blue/ml de medio
5 Matriz	Agarosa muy reticulada, 6%
Tamaño medio de partículas	90 μm
Estabilidad del pH	4-12 (a largo plazo), 3-13 (a corto plazo)
Almacenamiento	Etanol al 20%, tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 8,0
Temperatura de almacenamiento	4°C a 30°C
10 Estabilidad química M,	40°C durante 7 días en: etanol al 70%, clorhidrato de guanidina 6 urea 8 M

Se entiende que la cromatografía de afinidad de los colorantes del método de la invención puede llevarse a cabo con resinas alternativas, que tienen características similares. Ejemplos de resinas alternativas incluyen: Toyopearl AF-blue-HC-650M (Tosoh Biosciences), Blue Cellthru BigBead (Sterogene), SwellGel Blue (Pierce), Cibachrome blue 3GA-agarosa 100 (Sigma), Affi-Gel Blue (Bio-Rad), cartuchos Econo-Pac blue (Bio-Rad), Cibacron Blue 3GA (Sigma).

La elución en la etapa de cromatografía de afinidad de los colorantes inmovilizado se lleva a cabo preferiblemente utilizando un tampón Tris/HCl o un tampón fosfato. El más preferido es un tampón Tris/HCl que contiene cloruro de sodio. El pH del eluyente está preferiblemente a o aproximadamente 7 hasta aproximadamente 9, más preferiblemente el pH está en el intervalo entre 7 y 8.

En otro aspecto, el método de purificación de una FSH biotecnológica o una variante de FSH según la invención comprende las etapas de someter un líquido que contiene dicha FSH o variante de FSH a

- una cromatografía de intercambio aniónico,
 - una cromatografía de interacción hidrófoba,
 - 25 - una cromatografía de afinidad de los colorantes, y
- además a una cromatografía de intercambio catiónico

que puede realizarse en cualquier orden, en donde el método evita cualquier cromatografía de intercambio aniónico débil, así como cualquier cromatografía de fase inversa.

En una realización, las etapas se realizan en el siguiente orden: (1) cromatografía de intercambio aniónico, (2) cromatografía de interacción hidrófoba, (3) cromatografía de afinidad de los colorantes, y (4) cromatografía de intercambio catiónico.

La cromatografía de intercambio catiónico (CIC) se basa en interacciones carga-carga entre las proteínas en la muestra y las cargas inmovilizadas en la resina. En la cromatografía de intercambio catiónico, los iones de unión de las proteínas son positivos y el grupo funcional inmovilizado es negativo. Las resinas de intercambio catiónico normalmente utilizadas son la resina S, derivados de sulfato, y resinas CM (carboximetilo), iones derivados carboxilados.

Sin embargo, en general la etapa de cromatografía de intercambio catiónico puede llevarse a cabo con todas las resinas de intercambio catiónico o membranas corrientes disponibles en el mercado. Las resinas de intercambio catiónico pueden utilizarse en forma de columnas en las que se vierten previamente o membranas en la que el grupo funcional, p. ej., ácido sulfónico, está fijado. Alternativamente las columnas pueden estar autopreparadas. No hay limitaciones específicas en cuanto a la capacidad y la geometría de las columnas aparte de las habituales. El experto en la técnica sabe que la cantidad de resina de intercambio catiónico que debe utilizarse depende del contenido total de proteínas del líquido de cultivo celular o cualquier otro líquido, p. ej., el eluido de una etapa de cromatografía anterior.

45 Las resinas de intercambio catiónico típicas que pueden utilizarse para la invención están disponibles en GE Healthcare y otros fabricantes de accesorios y columnas de cromatografía iónica. Normalmente, la CIC se lleva a cabo utilizando tampones a valores de pH entre 4 y 7.

En una realización preferida, la etapa de intercambio catiónico del método de la invención se realiza como una membrana de intercambio catiónico. Preferiblemente, la etapa de intercambio catiónico se lleva a cabo con un ácido sulfónico intercambiador catiónico ácido fuerte fijado en una membrana o un intercambiador que tiene características similares.

- 5 Adsorbentes de membrana adecuados para su uso en la etapa de intercambio catiónico de la invención son conocidos en la técnica y están disponibles en varios proveedores. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico del método de la invención puede llevarse a cabo utilizando una membrana hecha de celulosa regenerada y que tiene una matriz cromatográfica de ácido sulfónico formada en el núcleo central de la celulosa. Un ejemplo de un adsorbente de membrana útil son los adsorbentes de membrana Sartobind S comercializados por Sartorius. Los
- 10 datos técnicos de los adsorbentes de membrana Sartobind S se dan a continuación.

Designación	Sartobind SingleSep [®] (intercambiador catiónico ácido fuerte S)
Ligando	ácido sulfónico (R-CH ₂ -SO ₃ ⁻)
Capacidad de unión estática	≥ 0,8 mg/cm ² (29 mg/ml) medida con albúmina de suero bovino y lisozima de huevo de gallina
15 Capacidad iónica	4-6 µeq/cm ²
Membrana	
Material de base	celulosa reforzada estabilizada
Espesor de membrana	275 µm
Tamaño nominal de poro	> 3 µm
20 Cápsula	
Diseño	Cilíndrico, número nominal de capas: 15
Altura del lecho:	4 mm
Material de la cápsula	Polipropileno (FDA)
Presión max.	0,4 MPa (4 bar, 58 psi)
25 Estabilidad del pH	3-14 (a corto plazo)
Almacenamiento	Descartar después de un uso
Estabilidad química	Estable contra todos los tampones utilizados normalmente en cromatografía, NaOH 1 M (30-60 min a 20°C), urea 8 M, de guanidina 8 M, etanol, acetona y acetonitrilo al 100%. Evita los
30 hidrocloruro	agentes oxidantes.

La etapa de CIC puede realizarse según el protocolo del fabricante. Por ejemplo, un tampón de Tris-HCl puede utilizarse a pH 7,0.

- 35 Se encontró que la etapa de CIC, preferiblemente la etapa del adsorbente de membrana catiónica, limpia las proteínas de la célula anfitriona de todos los tamaños moleculares, mientras que mantiene cortos los tiempos de proceso. El rendimiento, a aproximadamente 95%, es muy favorable porque la FSH no se une al adsorbente a pH 7,0.

- 40 En general, se encontró que cromatografía de intercambio catiónico en la forma de una membrana cromatográfica es muy útil para la purificación de FSH biotecnológica o de la variante de FSH. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de un adsorbente de membrana catiónica en un método de purificación de FSH o la variante de FSH. En una realización preferida, el adsorbente de membrana catiónica es un intercambiador de cationes adsorbente, preferiblemente un adsorbente de intercambio catiónico fuerte, hecho de celulosa regenerada y que tiene una matriz cromatográfica de ácido sulfónico formado en el núcleo central de celulosa.

En otro aspecto, el método de purificación de una FSH biotecnológica o una variante de FSH según la invención comprende las etapas de someter un líquido que contiene dicha FSH o una variante de FSH a

- 45 – una cromatografía de intercambio aniónico,
 – una cromatografía de interacción hidrófoba,

- una cromatografía de afinidad de los colorantes,
 - una cromatografía de intercambio catiónico opcional, y
- además a una cromatografía de intercambio aniónico adicional,
que puede realizarse en cualquier orden,

5 en donde el método evita cualquier cromatografía de intercambio aniónico débil así como cualquier cromatografía de fase inversa.

En una realización, las etapas se llevan a cabo en el siguiente orden: una primera cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía de interacción hidrófoba, una cromatografía de afinidad de los colorantes, una cromatografía de intercambio catiónico opcional y una segunda cromatografía de intercambio aniónico.

- 10 La segunda cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse utilizando resinas de intercambio aniónico típicas como se mencionó anteriormente en relación con la primera cromatografía de intercambio aniónico. También la segunda cromatografía de intercambio aniónico es preferiblemente un cromatografía de intercambio aniónico fuerte que se lleva a cabo utilizando una resina de intercambio aniónico fuerte que tiene grupos funcionales - $N^+(CH_3)_3$, o una resina que tiene características similares. Los ejemplos preferidos de resinas de intercambio
- 15 aniónico fuertes que pueden utilizarse para la invención son las resinas intercambiadoras de aniones fuertes de amonio cuaternario conocidas en la técnica como UNOsphere Q, Q Sepharose HP y otras resinas que tienen restos de amonio cuaternario (Q). Las características del intercambiador aniónico fuerte UNOsphereQ y Q Sepharose HP se han dado anteriormente en relación con la primera cromatografía de intercambio aniónico. Además en la segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico es preferible evitar el uso de resinas de intercambio aniónico
- 20 débiles, tales como las de dietilaminoetilo (DEAE) o dimetilaminoetilo (DMAE) como grupos funcionales.

- La etapa de cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo preferiblemente utilizando un tampón que tiene un pH ligeramente alcalino, p. ej., en o aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 8,5. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, tampón de borato, trietanolamina/ácido iminodiacético Tris, acetato de amonio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. Se prefiere
- 25 el uso de un tampón Tris. La elución de la resina de intercambio aniónico se consigue normalmente aumentando la conductividad de la fase móvil mediante la adición de sal, preferiblemente cloruro de sodio.

En una realización, la segunda cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo utilizando un tampón de Tris-HCl/cloruro de sodio como eluyente a un pH comprendido en el intervalo entre 7,0 y 9,0.

- En otro aspecto, el método de purificación de una FSH o de una variante de FSH biotecnológica según la invención
- 30 comprende las etapas de someter un líquido que contiene dicha FSH o variante de FSH a

- una cromatografía de intercambio aniónico,
 - una cromatografía de interacción hidrófoba y
 - una cromatografía de afinidad de los colorantes,
- que puede realizarse en cualquier orden,

35 en donde el método evita cualquier cromatografía de intercambio aniónico débil, así como cualquier cromatografía de fase inversa, y

en donde el método comprende además una cromatografía de exclusión por tamaño.

En otro aspecto, el método de purificación de una FSH biotecnológica o variante de FSH según la invención comprende las etapas de someter un líquido que contiene dicha FSH o variante de FSH a

- 40 - una cromatografía de intercambio aniónico,
- una cromatografía de interacción hidrófoba,
 - una cromatografía de afinidad de los colorantes,
 - una cromatografía de intercambio catiónico opcional,
 - una cromatografía de intercambio aniónico adicional opcional, y
- 45 - una cromatografía de exclusión por tamaño,
- que puede realizarse en cualquier orden,

en donde el método evita cualquier cromatografía de intercambio aniónico débil, así como cualquier cromatografía de fase inversa.

En una realización, las etapas se realizan en el orden siguiente: una cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía de interacción hidrófoba, una cromatografía de afinidad de los colorantes, una cromatografía de intercambio catiónico opcional, una cromatografía de intercambio aniónico adicional opcional y una cromatografía de exclusión por tamaño.

En una realización preferida, el método de la invención comprende las etapas siguientes en el orden siguiente: una primera cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, una cromatografía de afinidad de los colorantes, una cromatografía de intercambio catiónico opcional, una segunda cromatografía de intercambio aniónico opcional y una cromatografía de exclusión por tamaño.

La cromatografía de exclusión por tamaño (CET), también conocida como cromatografía de filtración en gel, es un método cromatográfico en el que las partículas, p. ej., proteínas y otras biomoléculas, se separan en base a su tamaño. Un medio de gel típico para CET es poliacrilamida, dextrano, agarosa o una de sus mezclas. Las matrices de la CET están disponibles en varios fabricantes de accesorios y columnas de cromatografía, p. ej., en Tosoh Bioscience LLC o GE Healthcare.

La cromatografía de exclusión por tamaño se realiza preferiblemente utilizando una matriz de compuesto esférico de agarosa reticulada y dextrano.

Ejemplos de matrices de cromatografía de exclusión por tamaño útiles son las matrices conocidas en la técnica como Superdex 75 pg, disponibles por ejemplo en GE Healthcare. Las columnas Superdex 75 pg permiten la separación de alta resolución de proteínas, péptidos y otras biomoléculas según el tamaño. Generalmente, las columnas de exclusión por tamaño son ideales para la etapa de pulido en un procedimiento de purificación.

Los detalles técnicos de la matriz Superdex 75 pg son los siguientes:

	Límite de exclusión (M_r)	1×10^5 proteína globular
	Intervalo de separación (M_r)	3.000-70.000 proteína globular
25	Matriz	Compuesto esférico de agarosa reticulada y dextrano
	Tamaño medio de partículas	34 μm
	Estabilidad química	Estable en todos los tampones comunes: ácido acético 1 M, urea 8 M, hidrocloreuro de guanidina 6 M,
30	limpieza	alcohol isopropílico al 30%, etanol al 70%, NaOH 1 M (para en el lugar)
	Estabilidad de pH	3-12 (en funcionamiento y a largo plazo), 1-14 (a corto plazo)
	Columnas Superdex™ 10/300 GL (Tricorn)*	
	Dimensiones del lecho	10 x 300 mm
	Volumen de muestra recomendado	25 a 250 μl
35	Volumen de lecho	24 ml
	Presión máx.	18 bar (261 psi, 1,8 MPa)
	Caudal máx.(H ₂ O a 25°C)	1,5 ml/min
	Platos teóricos	> 30.000 m^{-1}
40	Columnas Superdex™ PC 3.2/30	
	Dimensiones del lecho	3,2 x 300 mm
	Volumen del lecho	2,4 ml
	Volumen de muestra recomendado	2-25 μl
	Presión máx.	24 bar (348 psi, 2,4 MPa)

Caudal máx.(H ₂ O a 25°C)	0,100 ml/min
Platos Teóricos	> 30.000 m ⁻¹
Almacenamiento	etanol al 20%
Temperatura de almacenamiento	4°C a 30°C

- 5 La etapa de CET puede realizarse según el protocolo del fabricante. Por ejemplo, un tampón de fosfato de sodio puede utilizarse a pH 6 a 8, preferiblemente a aproximadamente pH 7,0.

En una realización preferida de la invención, el método de la invención comprende las etapas siguientes en el orden siguiente: una primera cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía de interacción hidrófoba, una cromatografía de afinidad de los colorantes, una cromatografía de intercambio catiónico, una segunda cromatografía

- 10 de intercambio aniónico y una cromatografía de exclusión por tamaño.

En una realización preferida, la etapa de cromatografía de intercambio catiónico del método de la invención se lleva a cabo como una membrana de intercambio catiónico. Preferiblemente, la etapa de intercambio catiónico se lleva a cabo con un intercambiador de cationes ácido fuerte ácido sulfónico, fijado sobre una membrana o un intercambiador que tiene características similares.

- 15 Además, el método de la invención comprende uno o más etapas de ultrafiltración y/o de nanofiltración. La ultrafiltración es una forma de filtración en membrana en la que la presión hidrostática fuerza a un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos en suspensión y solutos de alto peso molecular quedan retenidos, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. La ultrafiltración es un método de separación habitualmente utilizado para la purificación y concentración de soluciones macromoleculares, especialmente soluciones de proteínas. La ultrafiltración es similar a la nanofiltración, difiriendo sin embargo en
- 20 relación con el tamaño de las moléculas que retiene. En el marco de la presente invención, se prefiere un umbral de peso molecular de 10 kDa (10 kDa UF). Las membranas de UF se pueden utilizar también para la diafiltración para eliminar las sales y otras microespecies de la solución mediante dilución repetida o continua y reconcentración.

- En una realización preferida de la invención, el proceso de purificación comprende uno o más de ultrafiltración/ diafiltración y/o etapas de nanofiltración. Estas etapas de filtración se pueden llevar a cabo utilizando dispositivos de filtración disponibles en el mercado, p. ej. disponible en GE Healthcare o Sartorius.
- 25

La ultrafiltración se lleva a cabo preferentemente utilizando los casetes Sartocon y los casetes Sartocon Slice comercializados por Sartorius.

Membrana	Polietersulfona (PESU) o Hydrosart®
30 Umbral de peso molecular	10 kD
Área del filtro	0,02 a 0,7 m ²
Presión de alimentación	4 bar (58 psi) máxima
Estabilidad al pH	1-14
Temperatura de funcionamiento	50°C máximo, a 20°C
35 Limpieza	NaOH 1 M, 40°C
Desinfección	NaOH 1 M, 40-50°C, 30 min
Almacenamiento	NaOH 0,1 M

La membrana de polietersulfona (PESU) utilizada en los casetes de flujo cruzado comercializados por Sartorius es un polímero de membrana estable que cuenta con una amplia gama de pH y temperatura.

- 40 También se pueden utilizar los casetes de ultrafiltración Hydrosart® comercializados por Sartorius. Hydrosart es una membrana a base de celulosa estabilizada que se ha optimizado para aplicaciones biotecnológicas. Las membranas de ultrafiltración y casetes Hydrosart están disponibles en los siguientes umbrales de peso molecular nominal: 2 kD, 5 kD, 10 kD y 30 kD.

- En una realización preferida, el método de purificación incluye una etapa de nanofiltración. La nanofiltración se puede llevar a cabo utilizando cualquier dispositivo de nano-filtro útil. La nanofiltración se lleva a cabo preferiblemente utilizando filtros Planova, disponibles en Asahi Kasei Medical Co., Ltd.
- 45

Los filtros Planova están diseñados para eliminar los virus durante la fabricación de productos farmacéuticos bioterapéuticos tales como los productos biofarmacéuticos. Están basados en una membrana microporosa de fibra hueca construida de celulosa regenerada con cupramonio hidrófilo de forma natural con una distribución estrecha de poros, los filtros Planova están disponibles para un solo uso, módulos independientes en cuatro tamaños de poro medio de 15 nm, 19 nm, 35 nm y 72 nm (Planova 15N, 20N, 35N y 75N, respectivamente). En el proceso de la invención, se prefiere utilizar un filtro Planova 15N, es decir, un filtro que tiene un tamaño medio de poro de 15 nm. El filtro se utiliza según el protocolo del proveedor.

Se prefiere que el método de purificación de FSH según la invención no comprenda una cromatografía de afinidad por iones metálicos.

Además, también se prefiere que el método de la invención evite una cromatografía de inmunoafinidad. La purificación de FSH sin etapas de cromatografía de inmunoafinidad elimina la posible interferencia resultante de impurezas o agentes infecciosos, proveniente de la preparación del anticuerpo, con el compuesto de la FSH.

La descripción se refiere además a un método de purificación de una FSH biotecnológica o a una variante de FSH biotecnológica, que comprende la etapa de someter a un líquido que contiene dicha FSH o a la variante de FSH a un intercambiador catiónico de membrana.

En un aspecto preferido, el intercambiador catiónico de membrana es un ácido sulfónico intercambiador catiónico ácido fuerte, fijado sobre una membrana, o un intercambiador que tiene características similares.

Los adsorbedores de membrana adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles en varios proveedores. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico puede llevarse a cabo utilizando una membrana hecha de celulosa regenerada y que tiene una matriz cromatográfica de ácido sulfónico formado en el núcleo central de celulosa. Un ejemplo de un adsorbente de membrana útil son los adsorbentes de membrana Sartobind S comercializados por Sartorius. Los detalles técnicos de los mismos se han dado anteriormente.

En otro aspecto, el método de purificación de una FSH biotecnológica o de una variante de FSH biotecnológica que comprende la etapa de someter un líquido que contiene FSH a un intercambiador catiónico de membrana comprende además una cromatografía de interacción hidrófoba.

La cromatografía de interacción hidrófoba del método de la invención puede llevarse a cabo como se ha descrito anteriormente en relación con el método de purificación de una FSH biotecnológica o de una variante de FSH biotecnológica, que comprende las etapas de someter un líquido que contiene dicha FSH o la variante de FSH a una cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía de interacción hidrófoba y una cromatografía de afinidad de los colorantes, que se realizan en cualquier orden, en donde el método no comprende una cromatografía de intercambio aniónico débil, ni una cromatografía de fase inversa, y una de sus realizaciones preferidas.

En un aspecto preferido, la cromatografía de interacción hidrófoba se lleva a cabo utilizando una resina que consiste en perlas de agarosa reticulada modificada con grupos fenilo o butilo, o una resina que tiene características similares.

A menos que se indique lo contrario, las definiciones siguientes están destinados a ilustrar y definir el significado y alcance de los diversos términos utilizados para describir la presente invención.

El término "FSH" se refiere a un polipéptido de la hormona estimulante del folículo como una proteína madura completa que incluye, pero no se limita a, la FSH humana o "hFSH", ya sean producidas por biotecnología o aisladas de fuentes humanas, tales como la orina las mujeres posmenopáusicas. La secuencia proteica de la glucoproteína humana y la secuencia proteica de la subunidad β de la FSH humana son conocidas por el experto en bibliografía científica y de patentes (véase p. ej. el documento WO 2004/087213).

La secuencia de aminoácidos de la cadena α de la FSH humana se representa en la SEQ. ID. n° 1, y la secuencia de aminoácidos de la cadena β de la FSH humana se representa en la SEQ. ID. n° 2 adjunta a esta memoria. Estas secuencias de aminoácidos corresponden a las secuencias de aminoácidos naturales de las cadenas α y β de la FSH humana depositadas con el número de registro J 00152 en el base de datos EMBL y con el número de registro NM_000510 en la base de datos NCBI, respectivamente.

Las secuencias de ácidos nucleicos naturales que codifican la FSH humana se muestran en la SEQ. ID. n° 3 (= cadena α) y N° 4 (= cadena β).

La FSH biotecnológica puede ser codificada por la secuencia de ácido nucleico natural como se encuentra de forma natural en los seres humanos, o puede ser codificada por una secuencia alterada de ácido nucleico cuya expresión dan lugar a una FSH que tiene la secuencia de aminoácidos naturales, es decir, la secuencia de proteínas naturales que se encuentra que de forma natural en los seres humanos.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la FSH humana puede, por ejemplo, ser modificada de tal manera que una o ambas de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas α y β de la FSH humana han sido

adaptadas al uso del codón en células de ovario de hámster chino (CHO) con el fin de aumentar el nivel de expresión y el rendimiento de la FSH biotecnológica en estas células anfitrionas.

Un ejemplo de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la FSH humana y que han sido modificados con respecto al uso del codón en las células CHO se describe en la solicitud de patente internacional WO 2009/000913. La secuencia de ácido nucleico modificado que codifica la cadena β de la FSH humana es la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ. ID. n° 5 (en la SEQ. ID n° 5 la región codificadora comienza en el nucleótido 56 y se extiende hasta el nucleótido 442), y la secuencia de ácido nucleico modificado que codifica la cadena α de FSH humana es la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ. ID. n° 6 (en la SEQ. ID. n° 6 la región codificadora comienza en el nucleótido 19 y se extiende hasta hasta el nucleótido 366). Una estirpe de células CHO que contiene una molécula de ácido nucleico recombinado que comprende una primera secuencia de ácido nucleico modificado que codifica la cadena β de FSH humana y una segunda secuencia de ácido nucleico modificado que codifica la cadena α de FSH humana se depositó el 28 de marzo de 2007 en la DSMZ en Braunschweig con el número de depósito DSM ACC2833.

En una realización preferida, la formulación líquida de FSH contiene una FSH natural humana biotecnológica que se obtiene por expresión del gen recombinado a partir de secuencias de ácido nucleico de FSH que se modifican con respecto al empleo de codones en las células CHO con respecto tanto a la cadena β de FSH humana como a la cadena α de FSH. En otra realización preferida, la FSH biotecnológica se obtiene por la expresión de las secuencias de ácido nucleico de FSH descritas en el documento WO 2009/000913.

La expresión "variante de FSH" está concebida para abarcar las moléculas que difieren en la secuencia de aminoácidos, modelo de glucosilación o en el enlace entre subunidades de la FSH humana, pero que presentan actividad de FSH. Los ejemplos incluyen CTP-FSH, una FSH biotecnológica modificada de acción prolongada, que consiste en la subunidad α natural y una subunidad β híbrida en la que el péptido del terminal carboxi de hCG se ha fusionado al terminal C de la subunidad β de FSH, como se describe en LaPolt *et al.* (1992) *Endocrinology*, 131, 2514-2520; o en Klein *et al.* (2003) *Human Reprod.*, 18, 50-56. También se incluye CTP-FSH monocatenaria, una molécula monocatenaria descrita por Klein *et al.* (2002) *Fertility & Sterility*, 77, 1248-1255. Otros ejemplos de variantes de FSH incluyen moléculas de FSH que tienen secuencias de glucosilación adicionales incorporadas en la subunidad α y/o β , como se describe en el documento WO 01/58493, y moléculas de FSH con enlaces S-S entre subunidades, como se describe en el documento WO 98/58957. Otros ejemplos de variantes de FSH se describen en el documento WO 2004/087213, que se caracterizan por eliminaciones en el terminal carboxi de la subunidad β . Otros ejemplos de variantes de FSH incluyen moléculas de FSH con un grado alterado de glucosilación en comparación con la FSH natural debido a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante los cuales se introducen secuencia(s) de glucosilación adicional(es) o se eliminan secuencia(s) de glucosilación de origen natural.

Además, la FSH o la variante de FSH según la invención pueden ser una molécula de FSH que ha sido modificada por grupos químicos. Dichos conjugados de FSH pueden comprender, por ejemplo polialquilenglicol (tal como PEG), hidroxialquil-almidón (tal como HES) u otros grupos poliméricos.

Heterodímeros de FSH o heterodímeros de la variante de FSH se pueden producir por cualquier método adecuado, tal como por biotecnología, mediante aislamiento o purificación a partir de fuentes naturales o por síntesis química, o cualquier combinación de los mismos.

El empleo del término "recombinado" se refiere a preparados de FSH o de variantes de FSH que se producen mediante el empleo de ingeniería genética (véase por ejemplo el documento WO 85/01958). Las secuencias de los clones genómicos y de ADNc de FSH son conocidas por las subunidades α y β de varias especies. Varios métodos de producción de FSH biotecnológica o variantes de FSH que emplean ingeniería genética se describen en la técnica anterior, véase por ejemplo la solicitud de patente europea EP 0 711 894 y la solicitud de patente europea EP 0 487 512.

Preferiblemente, la FSH purificada según la invención tiene una subunidad alfa según la SEQ. ID. n° 1 y una subunidad beta según la SEQ. ID. n° 2.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una FSH o proteína de la variante de FSH purificadas obtenidas por el método de purificación según la invención.

La descripción se refiere además a una composición farmacéutica que comprende la FSH o la variante de FSH purificada empleando el método de la invención, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, la composición farmacéutica contiene un conservante y se puede utilizar para la administración de varias dosis. Las composiciones farmacéuticas preferidas se describen en el documento PCT/EP2009/051451.

Además, la invención se refiere también al uso de la FSH o a la variante de FSH purificada empleando el método de la invención, o a la utilización de una composición farmacéutica que comprende dicha FSH o una variante de FSH en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de trastornos de la fertilidad.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de producción de una FSH biotecnológica o de una variante de FSH biotecnológica que comprende las etapas siguientes:

- a) obtención de un clon de la célula CHO que produce la FSH biotecnológica o la variante de FSH biotecnológica a partir de una o más moléculas de ácido nucleico recombinado que codifican la FSH o la variante de FSH,
- 5 b) cultivo de las células anfitrionas de CHO en condiciones adecuadas, y
- c) purificación de la FSH biotecnológica o de la variante de FSH biotecnológica procedente del cultivo celular según el método de la invención.

La FSH humana biotecnológica se purifica a partir del sobrenadante de cultivo de células anfitrionas por el método de la invención. La FSH humana biotecnológica o la variante de FSH se produce preferiblemente como se describe
10 en la solicitud de patente internacional WO 2009/000913.

Más preferiblemente, la FSH es la FSH humana que se ha producido por ingeniería genética, en particular se ha producido preferentemente en células de ovario de hámster chino transfectadas con un vector o vectores que comprende(n) ADN que codifica la para la subunidad α de la glucoproteína humana y la subunidad β de FSH, ya sea codificada por la SEQ. ID. n° 3 y n° 4 (= secuencias de ácido nucleico naturales) o por la SEQ. ID. n° 5 y n° 6 (= secuencias de ácidos nucleicos de codones optimizados). El ADN que codifica las subunidades α y β puede estar
15 presente en el mismo o diferentes vectores.

La FSH biotecnológica presenta varias ventajas sobre su homóloga urinaria. Técnicas de cultivo y aislamiento que utilizan células biotecnológicas permiten consistencia entre lotes. En cambio, la FSH urinaria varía en gran medida de lote a lote en características tales como pureza, modelo de glucosilación, sialilación y oxidación de las subunidades. Debido a la mayor consistencia y pureza lote a lote de FSH biotecnológica, la hormona puede ser fácilmente identificada y cuantificada empleando técnicas tales como isoelectroenfoque (IEF). La facilidad con la que la FSH biotecnológica puede identificarse y cuantificarse permite el llenado de viales por masa de hormona (llenado por masa) en lugar de llenado por bioanálisis.
20

La expresión "actividad de FSH" se refiere a la capacidad de una formulación de FSH para provocar respuestas biológicas relacionadas con FSH, tales como aumento de peso ovárico en el ensayo de Steelman Pohley (Steelman *et al.* (1953) 53 *Endocrinology*, 604-616), o el crecimiento folicular en una paciente. El crecimiento folicular en una paciente puede ser evaluado por ultrasonidos, por ejemplo, en relación con el número de folículos que tienen un diámetro medio de aproximadamente 16 mm el 8° día de estimulación. La actividad biológica se evalúa con respecto a un patrón aceptado para FSH.
25

La actividad biológica específica *in vivo* de la FSH biotecnológica está comprendida por lo general en el intervalo de aproximadamente 8.000 UI de FSH/mg de proteína a aproximadamente 16.000 UI de FSH/mg de proteína. Por ejemplo, la FSH humana biotecnológica en el producto Puregon (de Organon) disponible en el mercado tiene una bioactividad específica de aproximadamente 10.000 IE/mg de proteína, y para Gonal-f de Serono la bioactividad de la FSH humana biotecnológica es de aproximadamente 13.600 IE/mg de proteína.
30

La actividad de FSH puede determinarse por métodos conocidos relacionados con FSH y otras gonadotropinas. Dichos métodos incluyen p. ej., el ensayo de inmunoadividad enzimática (EIA) o ensayos de gen indicador. La bioactividad se determina generalmente por el bioanálisis descrito en la Farmacopea Europea, 5ª edición para FSH procedente de orina, estimándose la bioactividad comparando el efecto de FSH en la ampliación de los ovarios de ratas inmaduras tratadas con gonadotropina coriónica con el mismo efecto de un preparado patrón
35

40 .

La actividad biológica de la FSH o de la variante de FSH se puede evaluar comparando, en las condiciones dadas, su efecto en la ampliación de los ovarios de ratas inmaduras tratadas con gonadotropina coriónica con el mismo efecto utilizando un preparado patrón internacional o de un preparado de referencia calibrado en unidades internacionales (Farmacopea Europea, 5ª edición).

La medición de la actividad de FSH *in vitro* la describe, p. ej. Albanese *et al.* (1994) *Mol. Cell Endocrinol.* 101: 211-219.
45

La pureza de la FSH o de la variante de FSH obtenido por el método de la invención es al menos 95%, preferiblemente al menos 97%, más preferiblemente al menos 99% y más preferiblemente más de 99%. El grado de pureza puede determinarse mediante el análisis HPLC. Los materiales y protocolos adecuados para la realización de dicho análisis se pueden obtener de proveedores comerciales tales como Vydac o TOSOH Bioscience.
50

Los ejemplos siguientes se proporcionan simplemente para ilustrar más el método de purificación de la invención. El alcance de la invención no debe interpretarse como meramente consiste en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de una FSH humana biotecnológica por ingeniería genética

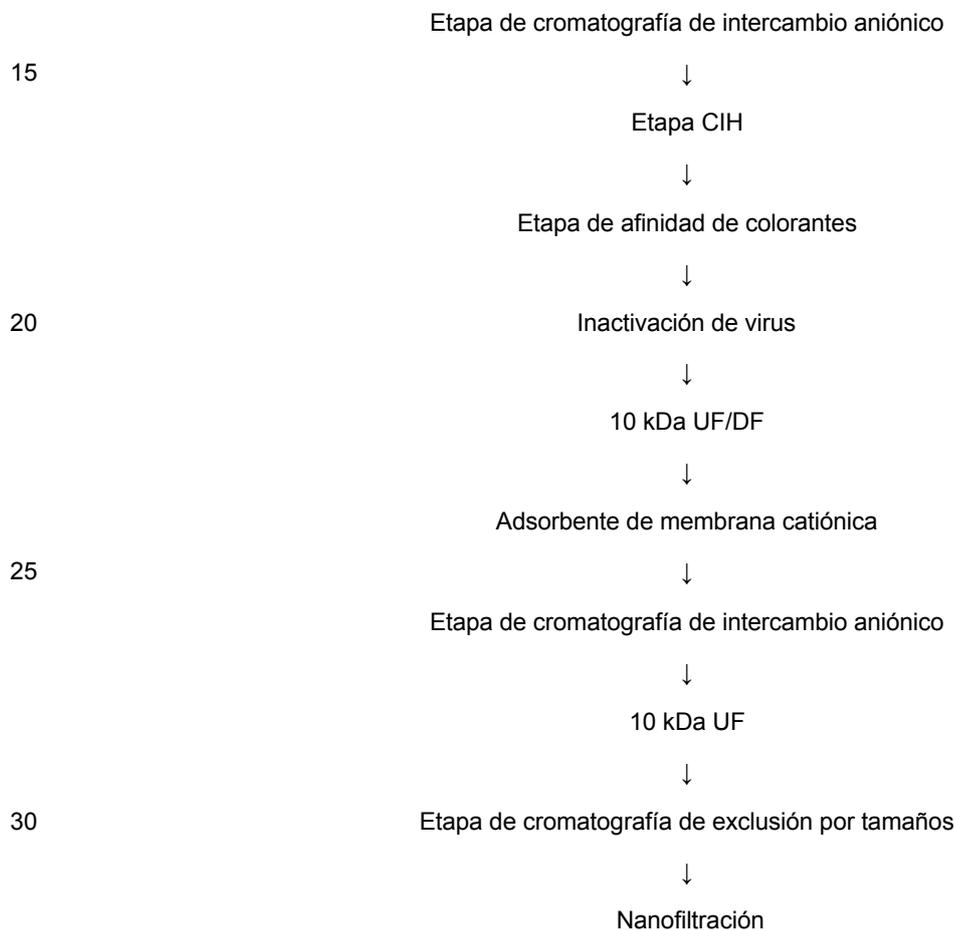
5 La FSH humana biotecnológica se produce en células anfitrionas CHO transfectadas por métodos normalizados. Estos métodos incluyen la generación de un clon de células CHO que produce FSH humana biotecnológica a partir de una o más moléculas de ácido nucleico recombinado que codifican la cadena α y la cadena β de la FSH humana, y el cultivo de las células anfitrionas en condiciones adecuadas. La FSH humana biotecnológica se purifica a continuación a partir del cultivo celular según la invención.

10 En una realización preferida, la FSH humana biotecnológica se produce como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2009/000913.

Ejemplo 2

Purificación de FSH a partir de cultivo celular

El esquema de purificación es el siguiente:



La duración de la fermentación fue de 28 días, y el volumen de fermentación fue de 30 l. La recolección se filtró por 0,22 μ m y se diluyó con agua RO por el factor 3,5.

35 Etapa de cromatografía de intercambio de aniónico (CIA):

La recolección de sobrenadante de cultivo celular diluida se aplicó a la cromatografía de intercambio aniónico utilizando la resina de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario conocida en la técnica como UNOsphere Q. Esta matriz está disponible de BioRad.

40 Tres volúmenes de columna (VC) de Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 se utilizaron para el equilibrado. La columna se cargó con la recolección (diluida 1:3,5 con agua RO; el valor de la recolección fue de aprox. 1,8 μ g de FSH/ml) y se lavó después con Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 (5 VC). A continuación, la columna se lavó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 15 mM,

pH 7,6 (5 VC), y la proteína se eluyó utilizando Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6 (8 VC). El rendimiento de la etapa fue 90% y superior.

Etapa de CIH:

5 La CIH se llevó a cabo utilizando una resina que consiste en perlas de agarosa reticulada modificada con fenilo. Fenil Sepharose 6 FF (disponible en GE Healthcare) es un derivado muy reticulado a base de agarosa. Es física y químicamente estable lo que permite grandes caudales y aumento de la duración de la resina. Los detalles técnicos de esta resina se dieron anteriormente.

10 Se combinaron ocho eluidos de CIA y se diluyeron con Tris-HCl 50 mM, NaCl 4,5 mM, pH 7,6 por el factor 3. La columna de CIH se equilibró con Tris-HCl 50 mM, NaCl 3 M, pH 7,6 (4 VC) y se cargó con el eluido de la CIA 1:3 diluyó. A continuación, la columna se lavó utilizando Tris-HCl 50 mM, NaCl 3 M, pH 7,6 (3 VC) y se lavó utilizando Tris-HCl 50 mM, NaCl 1,8 M, pH 7,6 (5 VC). Se encontró que el tampón de lavado con NaCl 1,8 M tenía un buen potencial de eliminación sin pérdida detectable de FSH. A continuación, la proteína se eluyó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,8 M, pH 7,6 (6 VC).

15 El rendimiento en FSH de la etapa de CIH fue > 95% sin ninguna pérdida significativa durante la carga y un buen potencial eliminación total de las proteínas de aprox. factor 10. Estos datos demuestran que la etapa de CIH desarrollada es una etapa de purificación muy eficiente con un rendimiento razonable y la calidad del producto.

Etapa de cromatografía de afinidad de los colorantes:

20 Se utilizó Blue Sepharose FF, disponible de GE Healthcare, para la etapa de cromatografía de afinidad de los colorantes. El eluido de CIH se diluyó con Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 por el factor 4. La columna se equilibró utilizando Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 (3 VC) y se cargó con el eluido de CIH diluido 1:4. La columna se lavó después con Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 (3 VC), y la proteína FSH se eluyó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 4 M, pH 7,6 (6 VC).

25 Después de cromatografía de afinidad se llevó a cabo una etapa de inactivación de virus se realizó por incubación del eluido en 2-propanol al 15% durante 2 horas. Para ello, el eluido de la cromatografía de afinidad de los colorantes se diluyó por el factor 2 con Tris-HCl 50 mM, 2-propanol al 30%, pH 7,6, dando como resultado Tris-HCl 50 mM, 2-propanol al 15%, NaCl 2M, pH 7,6. Después de la incubación durante 2 horas el eluido de la cromatografía de afinidad de los colorantes inactivado por virus se diluyó con Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 por el factor 2.

10 kDa UF/DF:

30 La ultrafiltración y la diafiltración se llevaron a cabo generalmente según protocolos habituales. Los dispositivos UF/DF útiles son los casetes Sartocoon de ultrafiltración/diafiltración (polietersulfona (PESU), 10 kDa) de Sartorius (área del filtro: 14.000 cm², factor de UF: 13-20, factor de DF: 8-10, carga: 0,1 a 0,5 mg FSH/cm²). La diafiltración con dispositivos de UF/DF se llevó a cabo generalmente con factores de ultrafiltración (concentración) 13 a 20 y factores de diafiltración 8 a 10.

El eluido de la cromatografía de afinidad de los colorantes inactivado por virus se diafiltró en tampón Tris-HCl (Tris-HCl 20, pH 7,0) y se cargó directamente sobre el adsorbente de membrana catiónico.

35 Etapa de adsorbente de membrana catiónico:

40 La cromatografía de intercambio catiónico del método de la invención se llevó a cabo utilizando una membrana hecha de celulosa regenerada y que tiene una matriz cromatográfica de ácido sulfónico formada en el núcleo central de celulosa. Dicho adsorbente de membrana está disponible en Sartorius con el nombre comercial adsorbente de membrana Sartobind S. Un adsorbente de membrana Sartobind S es una cápsula con varias capas de membrana, en la que se inmoviliza el ligando. Los adsorbentes de membrana tienen la ventaja de cortos tiempos de proceso y bajos volúmenes de tampón. Los costes y el tiempo de validación son insignificantes debido a la idea de un solo uso.

El adsorbente de membrana se equilibró con Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 (200 ml) y se cargó lo retenido UF/DF 10 kDa (aprox. 100 ml). El adsorbente se lavó después con Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 (200 ml).

45 El tratamiento sobre el adsorbente de membrana está en modo de flujo a través que reduce los tiempos de proceso. Además, no es necesario acondicionamiento de la carga con respecto a la etapa de proceso siguiente (cromatografía de intercambio aniónico). El rendimiento del producto en el flujo a través era muy bueno. No había prácticamente ninguna pérdida de producto, durante el tratamiento de más de un módulo Sartobind S a valores de pH 6,0, 6,5 y 7,0 en diferentes sistemas tampón.

50 La etapa de adsorbente de membrana catiónico presenta muchas ventajas para la depuración de HCP (proteína de la célula anfitriona). El rendimiento, 90 a 95%, es muy favorable debido a que la FSH que debe purificarse no se une al adsorbente a pH 7,0 en el sistema de tampón Tris-HCl 20 mM.

Etapa de cromatografía de intercambio aniónico:

Se llevó a cabo una segunda cromatografía de intercambio aniónico utilizando la resina de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario conocida en la técnica como Q Sepharose HP. Esta resina está disponible en GE Healthcare.

- 5 La columna de CIA se equilibró con Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 (3 VC). El conjunto flujo a través adsorbente de membrana se cargó en la columna (3 VC), y la columna se lavó en primer lugar con Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 (2 VC), luego con Tris-HCl 20 mM, pH 8,5 (3 VC) y por último se lavó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 60 mM, pH 8,5 (5 VC). A continuación, la FSH se eluyó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 130 mM, pH 8,5 (6 VC).

El eluido de Q Sepharose HP tiene una pureza muy alta comparable con el producto comercial GONAL-f®.

- 10 10 kDa UF:

Se llevó a cabo la ultrafiltración 10 kDa según protocolos habituales utilizando el casete de ultrafiltración Sartocon (PESU, 10 kD) de Sartorius (área de filtro: 3.000 cm², factor de UF: 10-30, carga: 0,2 a 1,0 mg de FSH/cm²). La ultrafiltración se llevó a cabo generalmente con factores de ultrafiltración (concentración) 10 a 30.

Etapa de cromatografía de exclusión por tamaños (CET):

- 15 La cromatografía de exclusión por tamaños se realizó utilizando Superdex 75 pg, disponible en GE Healthcare. La columna se equilibró utilizando 50 mM Na-PO₄, pH 7,0 (2 VC). Lo retenido de UF 10 kDa se cargó en la columna (0,025 VC), y la columna se lavó después con Na-PO₄ 50 mM, pH 7,0 (2 VC).

El eluido de la CET tiene una alta pureza en el mismo intervalo que el producto comercial GONAL-f®.

Nanofiltración:

- 20 Finalmente el eluido de la CET se nanofiltró utilizando filtros Planova 15N, comercializados por Asahi Kasei Medical Co., Ltd., siendo el tamaño medio de poro de 15 nm. La carga máxima objetivo era 2,5 ml/cm². La filtración se realizó según el protocolo del proveedor.

La pureza de la FSH purificada se midió por SE-HPLC y SDS-PAGE. La pureza e impurezas especificadas de la FSH obtenida fueron las siguientes:

- | | |
|--|----------------------|
| 25 SE-HPLC (dímeros y sustancias afines de masa molecular superior | < 1% |
| SDS-PAGE red. (coloidal) | pureza > 97% |
| HCP (genérica) | < 10 ppm |
| ADN | < 0,006 pg/UI de FSH |

- 30 La bioactividad de la FSH humana biotecnológica se determinó como por lo menos aproximadamente 10.000 UI/mg. Preferiblemente, la bioactividad de la FSH humana biotecnológica o la variante de FSH es el intervalo de aproximadamente 10.000 UI/mg a aproximadamente 17.000 UI/mg, más preferiblemente la bioactividad es por lo menos aproximadamente 12.000 UI/mg, y aún más preferiblemente la bioactividad es por lo menos aproximadamente 15.000 UI/mg.

Listado de secuencias:

- 35 SEQ. ID. n° 1: secuencia de aminoácidos de la cadena α de la FSH humana
 SEQ. ID. n° 2: secuencia de aminoácidos de la cadena β de la FSH humana
 SEQ. ID. n° 3: secuencia de ácido nucleico natural que codifica la cadena α de la FSH humana
 SEQ. ID. n° 4: secuencia de ácido nucleico natural que codifica la cadena β de la FSH humana
 40 SEQ. ID. n° 5: secuencia de ácido nucleico optimizada en el codón que codifica la cadena β de la FSH humana
 SEQ. ID. n° 6: secuencia de ácido nucleico optimizada en el codón que codifica la cadena α de la FSH humana

Listado de secuencias

<110> Biogenerix AG

<120> Método para purificar FSH biotecnológica

<130> B 9682/RN

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(116)

<223> cadena alfa de FSH humana

<400> 1

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
20 25 30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
35 40 45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
50 55 60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
65 70 75 80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
85 90 95

Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
100 105 110

Tyr His Lys Ser
115

<210> 2

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(129)

<223> cadena beta de FSH humana

<400> 2

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
 1 5 10 15
 Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
 20 25 30
 Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
 35 40 45
 Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
 50 55 60
 Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg
 65 70 75 80
 Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
 85 90 95
 Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
 100 105 110
 Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
 115 120 125

Glu

<210> 3
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ácido nucleico natural que codifica la cadena alfa de FSH humana

<400> 3
 ctttaattaag cgcagcat ggattactac agaaaatag cagctatctt tctggtcaca 60
 ttgtcgggtgt ttctgcatgt tctccattcc gctcctgatg tgcaggattg ccagaatgc 120
 acgctacagg aaaaccatt cttctcccag ccgggtgccc caatacttca gtgcatgggc 180
 tgctgcttct cttagacata tcccactcca ctaagggtcca agaagacgat gttgggtccaa 240
 aagaacgtca cctcagagtc cacttgctgt gtagctaaat catataacag ggtcacagta 300
 atgggggggtt tcaaagtgga gaaccacacg gcgtgccact gcagtacttg ttattatcac 360
 aaatcttaa 369

<210> 4
 <211> 474
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ácido nucleico natural que codifica la cadena beta de FSH humana

<400> 4
 aggatccccg ggctacctcc cgcggggag gcgcgccct taattaagcc gccaccatga 60
 agacactcca gttttcttc cttttctgtt gctggaaagc aatctgctgc aatagctgtg 120
 agctgaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc ataagcatca 180
 acaccacttg gtgtgctggc tactgctaca ccagggatct ggtgtataag gaccagcca 240
 ggccaaaat ccagaaaaca tgtacctca aggaactggt atatgaaaca gtgagagtgc 300
 ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacatacc agtggccacc cagtgtcact 360
 gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggcctgggg ccagctact 420
 gtccttttg tgaaatgaaa gaataaacat gccatggcat gcgagctcga attc 474

<210> 5
 <211> 471
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico con codón optimizado que codifica la cadena beta de FSH humana

<400> 5
 aggatccccg ggtacctccc cgcggggagg gcgcgccctt aattaagccg ccaccatgaa 60
 gaccctgcag ttcttcttcc tgttctgctg ctggaaggcc atctgctgca acagctgcga 120
 gctgaccaac atcaccatcg ccatcgagaa ggaggagtgc aggttctgca tcagcatcaa 180
 caccacctgg tgcgccgat actgctacac cagggacctg gtgtacaagg accccgccag 240
 gcccaagatc cagaagacct gcacctcaa ggagctggtg tacgagaccg tgaggggtgcc 300
 cggctgcgcc caccagccg acagcctgta cacctacccc gtggccacc agtgccactg 360
 cggcaagtgc gacagcgaca gcaccgactg caccgtgagg ggctggggc ccagctactg 420
 cagcttcggc gagatgaagg agtaatgacc atggcatgcg agctcgaatt c 471

<210> 6
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico con codón optimizado que codifica la cadena alfa de FSH humana

<400> 6
 cttaattaag ccgccagcat ggactactac aggaagtacg ccgccatctt cctggtgacc 60
 ctgagcgtgt tcctgcacgt gctgcacagc gcccagacg tgcaggactg ccccagatgc 120
 accctgcagg agaaccatt cttcagccag cccggagccc ccatcctgca gtgcatgggc 180
 tgctgcttca gcagggccta cccaccccc ctgaggagca agaagaccat gctggtgcag 240

ES 2 552 055 T3

aagaacgtga ccagcgagag cacctgctgc gtggccaaga gctacaacag ggtgaccgtg 300
atgggcggct tcaaggtgga gaaccacacc gcctgccact gcagcacctg ctactaccac 360
aagagctaat ga 372

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar FSH biotecnológica humana o una variante de FSH biotecnológica, que comprende las etapas de someter a un líquido que contiene dicha FSH o la variante de FSH a:

– una cromatografía de intercambio aniónico,

5 – una cromatografía de interacción hidrófoba, y

– una cromatografía de afinidad de los colorantes,

que puede realizarse en cualquier orden,

en donde el método no comprende una cromatografía de intercambio aniónico débil ni una cromatografía de fase inversa.

10 2. El método de la reivindicación 1, en donde las etapas se llevan a cabo en el orden siguiente:

a) una cromatografía de intercambio aniónico,

b) una cromatografía de interacción hidrófoba, y

c) una cromatografía de afinidad de los colorantes.

15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo utilizando una resina de intercambio aniónico fuerte con grupos funcionales $-N^+(CH_3)_3$, o una resina con características similares.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cromatografía de interacción hidrófoba se lleva a cabo utilizando una resina que consiste en perlas de agarosa reticulada modificada con grupos fenilo o butilo, o una resina con características similares.

20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cromatografía de afinidad de los colorantes se lleva a cabo con Cibacron Blue 3G como ligando, acoplado por enlace covalente a cualquier matriz.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cromatografía se lleva a cabo utilizando tampón Tris-HCl/cloruro sódico como eluyente a un pH comprendido en el intervalo entre 7,0 y 9,0.

25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una cromatografía de intercambio catiónico.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo con un ácido sulfónico intercambiador catiónico ácido fuerte fijado en una membrana o un intercambiador que tiene características similares.

9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde las etapas se llevan a cabo en el orden siguiente:

30 a) una cromatografía de intercambio aniónico,

b) una cromatografía de interacción hidrófoba,

c) una cromatografía de afinidad de los colorantes, y

d) una cromatografía de intercambio catiónico.

35 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una cromatografía de intercambio aniónico.

11. El método de la reivindicación 10, en donde la cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo utilizando una resina de intercambio aniónico fuerte que tiene grupos funcionales $-N^+(CH_3)_3$, o una resina con características similares.

40 12. El método de la reivindicación 10 u 11, en donde la cromatografía se lleva a cabo utilizando tampón Tris-HCl/cloruro sódico como eluyente a un pH comprendido en el intervalo entre 7,0 y 9,0.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde las etapas se llevan a cabo en el siguiente orden:
- a) una primera cromatografía de intercambio aniónico,
 - b) una cromatografía de interacción hidrófoba,
 - 5 c) una cromatografía de afinidad de los colorantes,
 - d) una cromatografía opcional de intercambio catiónico, y
 - e) una segunda cromatografía de intercambio aniónico.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una cromatografía de exclusión por tamaños.
- 10 15. El método de la reivindicación 14, en donde la cromatografía de exclusión por tamaños se lleva a cabo utilizando una matriz de compuesto esférico de agarosa reticulada y dextrano.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, en donde las etapas se llevan a cabo en el siguiente orden:
- a) una primera cromatografía de intercambio aniónico,
 - 15 b) una cromatografía de interacción hidrófoba,
 - c) una cromatografía de afinidad de los colorantes,
 - d) una cromatografía opcional de intercambio catiónico,
 - e) una segunda cromatografía opcional de intercambio aniónico, y
 - f) una cromatografía de exclusión por tamaños.
- 20 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende las etapas siguientes en el orden siguiente:
- a) una primera cromatografía de intercambio aniónico,
 - b) una cromatografía de interacción hidrófoba,
 - c) una cromatografía de afinidad de los colorantes,
 - 25 d) un intercambio catiónico de membrana,
 - e) una segunda cromatografía opcional de intercambio aniónico, y
 - f) una cromatografía de exclusión por tamaños.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una o más etapas de ultrafiltración y/o nanofiltración.
- 30 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se lleva a cabo la cromatografía de afinidad de ion no metálico.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde no se lleva a cabo la cromatografía de inmunofinidad.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la FSH tiene una subunidad α según la SEQ. ID. nº 1 y una subunidad β según la SEQ. ID. nº 2.
- 35 22. Un método de producción de una FSH biotecnológica humana que comprende las etapas siguientes:
- a) generación de un clon de la célula CHO que produce la FSH biotecnológica humana a partir de una o más moléculas de ácido nucleico recombinado que codifican la cadena α y la cadena β de la FSH humana,
 - b) cultivo de las células anfitrionas de CHO en condiciones adecuadas, y
 - 40 c) purificación de la FSH biotecnológica humana procedente del cultivo celular según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.