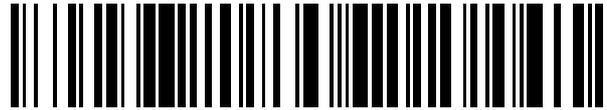


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 629**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/36** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**C07K 14/59** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2006 E 06819921 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 1960419**

54 Título: **Método para purificar FSH o un mutante de FSH**

30 Prioridad:

**09.12.2005 EP 05111915**

**09.12.2005 EP 05111917**

**04.08.2006 US 835754 P**

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

**01.06.2016**

73 Titular/es:

**ARES TRADING S.A. (100.0%)  
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ  
1170 AUBONNE, CH**

72 Inventor/es:

**ZIEGLER, THIERRY;  
ROSSI, MARA;  
DATOLA, ANTONIO y  
FIUMI, SABRINA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 572 629 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 o un mutante de FSH

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a la purificación de una hormona estimuladora del folículo (FSH) o de un mutante de la misma.

**Fundamento de la invención**

La hormona estimuladora del folículo (FSH) es una proteína que forma parte de la clase de las gonadotropinas. La FSH se utiliza en el tratamiento de la infertilidad y de trastornos de la reproducción en pacientes tanto femeninos como masculinos.

10 En la naturaleza, la FSH es producida por la glándula pituitaria o hipófisis. Para uso farmacéutico, la FSH puede producirse por vía recombinante (rFSH), o puede ser aislado de la orina de mujeres postmenopáusicas (uFSH).

15 La FSH se utiliza en pacientes femeninas para la inducción de la ovulación (OI) y en la hiperestimulación ovárica controlada (COH) para técnicas de reproducción asistida (ART). En un régimen de tratamiento típico para la inducción de la ovulación, se administran a una paciente inyecciones diarias de FSH o una variante (aproximadamente 75 a 300 UI de FSH/día) durante un período de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 días. En un régimen de tratamiento típico para la hiperestimulación ovárica controlada, se administran 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.

20 La FSH se utiliza también para inducir la espermatogénesis en hombres que padecen oligospermia. Un régimen que usa 150 UI de FSH tres veces por semana en combinación con 2.500 UI de hCG dos veces por semana ha logrado éxito consiguiendo una mejora en el recuento de espermatozoides en hombres que padecen de hipogonadismo hipogonadotrófico [Burgues et al.; *Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotrophic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotrophic Hypogonadism; Hum. Reprod.*; 1997, 12, 980-6].

25 Se han desarrollado agonistas de FSH/mutantes de FSH con valores mayores de la vida media fusionando el péptido carboxiterminal de hCG (CTP) con FSH humana recombinante nativa (rhFSH). El resto CTP consta de los aminoácidos 112 - 118 a 145 con cuatro sitios de glicosilación unida a O localizados en las posiciones 121, 127, 132 y 138. La patente de EE.UU. No. 5.338.835 y la patente de EE.UU. No. 5.585.345 describen una subunidad  $\beta$  de FSH modificada extendida en la Glu C-terminal con el resto CTP de hCG. Se afirma que el análogo modificado  
30 resultante tiene la actividad biológica de la FSH nativa, pero una prolongada vida media en circulación. La patente de EE.UU. No. 5.405.945 describe que la porción carboxi terminal de la subunidad beta de hCG o una variante de la misma tiene efectos significativos en el aclaramiento de CG, FSH y LH.

35 La patente de EE.UU. No. 5.883.073 describe proteínas de cadena simple que comprenden dos subunidades alfa con actividad agonista o antagonista para CG, TSH, LH y FSH. La patente de EE.UU. No. 5.508.261 describe polipéptidos heterodiméricos que tienen afinidad de unión a receptores de LH y FSH que comprenden una subunidad  $\alpha$  de hormona de glicoproteína y un polipéptido  $\beta$ -subunidad de origen no natural, en donde el polipéptido subunidad  $\beta$  es una cadena de aminoácidos que comprende cuatro subsecuencias unidas, cada de las cuales se elige entre una lista de secuencias específicas. Klein et al. (2003) describen un análogo de cadena simple de FSH con una vida media aumentada, en el que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están unidas por un oligopéptido que contiene dos  
40 sitios de glicosilación unidos a N.

45 El documento WO 01/58493 describe 77 mutaciones que se pueden hacer en la subunidad  $\alpha$  de FSH y 51 mutaciones que se pueden hacer en la subunidad beta de la FSH en un intento de mejorar la vida media in vivo de la FSH. El documento WO 01/58493 describe que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  mutantes se pueden usar individualmente (1 sitio de glicosilación adicional) o en combinación (2 sitios de glicosilación adicionales). Los 128 mutantes candidatos se identificaron usando 50 modelos de la estructura 3D de la FSH que fueron generados basándose únicamente en la estructura de la hCG y un alineamiento de secuencia de FSH y hCG a pesar de la identidad de sólo el 32% entre las subunidades beta de hCG y FSH. El documento WO 01/58493 no describe la producción o el ensayo de cualquiera de las subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  de FSH donde se introdujo un sitio de glicosilación mediante mutagénesis dirigida.

50 El documento WO 05/020934 describe el mutante de FSH GM1, con mutaciones en las subunidades tanto alfa como beta de FSH, incluyendo una mutación en H83N de la subunidad alfa y una doble mutación en E55N/V57T de la subunidad beta. Este documento describe un método de purificación para dicho mutante de FSH que comprende etapas de filtración seguidas por inmunoafinidad,

55 Debido a la importancia de la FSH en el tratamiento de los trastornos de la fertilidad, es de desear la provisión de FSH o mutantes de FSH de alta pureza y alta actividad específica. El tratamiento con FSH requiere inyecciones

repetidas. Se pueden administrar por vía subcutánea preparados de FSH muy puros, que permiten la auto-administración por el paciente, lo que aumenta la comodidad del paciente y el cumplimiento.

Lynch et al. [The extraction and purification of human pituitary follicle-stimulating hormone and luteinising hormone; *Acta Endocrinologica*, 1988, 288, 12 - 19] describen un método para purificar FSH hipofisaria humana. El método implica cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, extracción por inmunoespecificidad y cromatografía de exclusión por tamaño. Se dice que el método tiene por resultado FSH hipofisaria que tiene una actividad específica de 4.990 UI (inmunoensayo) /mg, con 16 UI / mg de LH. El contenido de proteína se determinó bien sea por peso seco o en solución por absorción a 280 nm (suponiendo que la  $A_{1\text{ cm}}^{280}$  para 1 g/l es igual a 1).

El documento WO 98/20039 (IBSA Institut Biochimique SA) describe un procedimiento para la purificación de la FSH urinaria humana a partir de extractos urinarios llamados gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG). El procedimiento utiliza cromatografía de intercambio iónico en resinas de intercambio aniónico débilmente básicas del tipo DEAE, seguida de cromatografía de afinidad en resina que tiene un derivado de antraquinona como ligando. Se dice que el procedimiento produce FSH urinaria libre de LH y que tiene una actividad específica de 6.870 UI (inmunoensayo)/mg. El contenido de proteína se determinó suponiendo que una solución acuosa de 1 mg/ml de proteína tiene una densidad óptica de 0,62 a 277 nm, en cubetas de cuarzo de 1 cm de recorrido.

El documento WO 00/63248 (Institut Massone SA) describe un procedimiento para la purificación de gonadotropinas, incluyendo FSH, a partir de orina humana. El proceso implica las siguientes etapas: cromatografía de intercambio iónico con una resina catiónica fuerte del tipo de sulfopropilo, cromatografía de intercambio iónico con una resina aniónica fuerte, y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Según se ha publicado se ha obtenido un preparado de FSH que tiene una actividad específica de 8.400 UI/ mg (método de Steelman - Pohley: *Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin*; *Endocrinology*; 1953, 53, 604 - 616) y menos de 1 UI de LH (método del aumento de peso de la vesícula seminal de la rata: Van Hell H., Matthijsen R&GA Overbeek, *Acta Endocrinol*, 1964, 47, 409) de actividad biológica por 75 UI de FSH. El contenido de proteína se obtuvo por el método de [O. H. Lowry et al., *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265].

La patente de EE.UU. No. 5.990.288 (Musick et al.) describe un método para purificar FSH a partir de muestras biológicas tales como la hipófisis humana o de orina post-menopáusica humana. El proceso utiliza cromatografía de intercambio catiónico en Fractogel EMD  $\text{SO}_3$  - 650M, seguido de cromatografía de afinidad de colorante sobre resina Mimetic Orange 1, seguido de una etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica en una resina Bakerbond Wide Pore HI-propilo. Se dice que el proceso tiene por resultado una FSH hipofisaria humana que tiene una actividad específica de 7.066 UI (inmunoensayo)/mg y menos de 1 UI (inmunoensayo) /mg de LH, y una FSH urinaria que tiene una actividad específica de 6.298 UI (inmunoensayo)/ mg y menos de 3 UI (inmunoensayo)/mg de LH. El contenido de proteína se determinó por absorción a 280 nm (suponiendo que la  $A_{1\text{ cm}}^{280}$  de 1 g/l es igual a 1).

Chiba et al. [Isolation and partial characterisation of LH, FSH and TSH from canine pituitary gland; *Endocrinol. J.*, 1997, 44, 205 - 218] describen una técnica para la purificación de gonadotropinas hipofisarias caninas, incluyendo FSH, usando cromatografía de afinidad de concanavalina (Con) A, cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y cromatografía de iones metálicos inmovilizados con  $\text{Cu}^{++}$ . Se afirma que la FSH resultante tiene una actividad específica de 2,17 UI/g de proteína/g usando un ensayo de radioreceptor para FSH para medir la actividad biológica y el kit de ensayo de proteínas BioRad (BioRad Laboratories CA, EE.UU.) para determinar el contenido de proteína.

El documento WO 88/10270 (Istituto di Ricerca Cesare Serono SPA) describe un método para purificar FSH humana a partir de orina. El proceso implica inmunocromatografía con anticuerpos monoclonales inmovilizados específicos de FSH unidos a Sepharose 4B por divinil sulfona, seguido por HPLC de fase inversa. La FSH resultante está libre de LH y otras proteínas urinarias y tiene una actividad específica de 6.200 UI/mg de polvo liofilizado (método de Steelman - Pohley). El preparado fue el primer preparado de FSH adecuado para la administración subcutánea, debido a su pureza.

Na et al. [Purification and characterization of recombinant human follicle stimulating hormone produced by Chinese hamster ovary cells; *Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 15, 395 - 402] describen un método de purificación de FSH que comprende una primera etapa de cromatografía de intercambio aniónico, seguida por cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía con hidroxipatita. Se dice que el procedimiento tiene por resultado una FSH recombinante que tiene una actividad específica de aproximadamente 16.000 UI.

## Sumario de la invención

La invención proporciona un método para enriquecer una muestra de FSH o mutantes de FSH en proteínas con subunidades beta triglicosiladas, que comprende la etapa de someter la muestra a cromatografía de interacción hidrofóbica, en donde la muestra de FSH o mutantes de FSH ha sido primero purificada, que comprende la etapa de someter un líquido que comprende dicho FSH o mutantes de FSH a:

- (1) cromatografía de afinidad de colorante;
- (2) cromatografía de intercambio aniónico débil;

- (3) cromatografía de interacción hidrofóbica;
- (4) cromatografía de intercambio aniónico fuerte.

Las etapas cromatográficas se llevan a cabo en dicho orden.

5 La FSH mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender preferiblemente una o más de las siguientes mutaciones en comparación con la FSH de tipo silvestre:

D3N y/o H83N en la subunidad alfa, y/o

E55N y/o V57T en la subunidad beta.

10 Los mutantes de FSH también pueden comprender inserciones de aminoácidos en comparación con la FSH de tipo silvestre. En realizaciones preferidas se insertan secuencias de cuatro aminoácidos tales como GNFT o GNRT entre los aminoácidos 3 y 4 de la subunidad alfa de la FSH de tipo silvestre.

En una realización preferida, los mutantes de FSH comprenden una mutación D3N en la subunidad alfa y una doble mutación E55N/V57T en la subunidad beta.

En otra realización preferida, los mutantes de FSH comprenden una inserción GNFT entre los aminoácidos 3 y 4 de la subunidad alfa de la FSH de tipo silvestre y una doble mutación E55N/V57T en la subunidad beta.

15 En otra realización preferida, los mutantes de FSH comprenden una inserción de GNRT entre los aminoácidos 3 y 4 de la subunidad alfa de la FSH de tipo silvestre y una doble mutación E55N/V57T en la subunidad beta.

En otra realización preferida, los mutantes de FSH comprenden una mutación H83N en la subunidad alfa y una mutación doble E55N/V57T en la subunidad beta.

20 Un mutante de FSH particularmente preferido de acuerdo con la presente invención es el descrito en el documento WO 2005/020934, que se refiere como GM1, en el que la subunidad alfa de FSH comprende la secuencia de SEC ID NO. 1, y en el que la subunidad beta de FSH comprende la secuencia de SEC ID NO. 2.

En la FSH de tipo silvestre hay 4 sitios de N glicosilación, 2 de cada uno dentro de la subunidad alfa (N52 y N78) y de la beta (N7 y N24).

25 La FSH mutante puede ser N-glicosilado en los restos de asparagina 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de dicha FSH mutante. El N83 de la subunidad alfa mutante puede estar glicosilado, además de los sitios de glicosilación de la FSH de tipo silvestre. N55 de la subunidad beta mutante puede estar glicosilado, además de los sitios de glicosilación de FSH de tipo silvestre.

30 En una realización preferida, el mutante de FSH tiene una subunidad alfa de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO. 1, y una subunidad beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO. 2, en donde N52 y N78 de la subunidad alfa están glicosilados y además N7 y N24 de la subunidad beta están glicosilados. Este mutante FSH se denomina aquí GM1 con subunidad beta diglicosilado.

35 En una realización más preferida, la FSH mutante tiene una subunidad alfa de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO. 1, y una subunidad beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO. 2, en donde N52 y N78 de la subunidad alfa están glicosilados y además N7, N24 y N55 de la subunidad beta están glicosilados. Este mutante de FSH se denomina GM1 con subunidad beta triglicosilado.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método para enriquecer una muestra de FSH o mutantes de FSH en proteínas con subunidades beta tri-glicosiladas, que comprende la etapa de someter la muestra a cromatografía de interacción hidrofóbica.

40 Preferiblemente la cromatografía de interacción hidrofóbica se lleva a cabo sobre una columna Source 15 o una columna análoga.

Preferiblemente, el mutante de FSH es GM1.

Un cuarto aspecto de la presente invención consiste en un mutante de FSH con una subunidad alfa de acuerdo con SEC ID NO 1 y una subunidad beta de acuerdo con SEC ID NO 2 en donde dicho mutante de FSH tiene una bioactividad específica entre 11.000 y 17.000 UI/mg.

45 Un quinto aspecto de la presente invención consiste en una composición farmacéutica que comprende una FSH o un mutante de FSH que tiene una subunidad alfa de acuerdo con SEC ID NO 1 y una subunidad beta de acuerdo con SEC ID NO 2, obtenida por el método de la presente invención, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un sexto aspecto de la presente invención consiste en el uso de FSH o un mutante de FSH que tiene una subunidad alfa de acuerdo con SEC ID NO 1 y una subunidad beta de acuerdo con SEC ID NO 2 obtenido por el método de la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de la fertilidad.

En una realización, la FSH o mutante de FSH se obtiene por medios recombinantes.

5 **Abreviaturas**

Las siguientes abreviaturas se usan en la descripción de la invención:

DF: diafiltración

FSH: hormona estimuladora del folículo;

r-FSH: FSH recombinante;

10 hFSH: FSH humana;

r-hFSH: FSH humana recombinante

BV: Volumen del lecho

DEAE: dietilaminoetilo

ELISA: inmunoensayo ligado a una enzima

15 DAC: cromatografía de afinidad de colorante

OD: densidad óptica

HIC: cromatografía de interacción hidrofóbica

HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución

IRMA: ensayo inmunorradiométrico

20 KD o kD: kiloDalton

HCP: proteína de célula hospedadora, proteínas que proceden de la célula hospedadora usada para la expresión de FSH

IPC: controles en proceso

IEF: enfoque isoeléctrico

25 PES: poliéter sulfona

RP-HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa

Q FF: intercambio aniónico en Q Sepharose FF

RT: temperatura ambiente

UF: ultrafiltración

30 WFI: agua para inyección

**Descripción detallada de la invención**

Se describe en el presente texto un método para enriquecer una muestra de FSH o un mutante de FSH en proteínas con subunidades beta triglicosiladas que comprende la etapa de someter la muestra a cromatografía de interacción hidrofóbica.

35 La invención proporciona un método para enriquecer una muestra de FSH o mutantes de FSH en proteínas con subunidades beta triglicosiladas que comprende la etapa de someter la muestra a cromatografía de interacción hidrofóbica en donde la muestra de FSH o mutantes de FSH ha sido primera purificada, que comprende la etapa de someter un líquido que comprende dicha FSH o mutantes de FSH a:

(1) cromatografía de afinidad de colorante;

40 (2) cromatografía de intercambio aniónico débil;

- (3) cromatografía de interacción hidrofóbica;
- (4) cromatografía de intercambio aniónico fuerte;

Las etapas cromatográficas se llevan a cabo en dicho orden.

5 El método de purificación de la invención proporciona una masa de la FSH o mutante de FSH, de alta pureza que después puede ser formulada para el medicamento final. Tiene la ventaja de proporcionar un alto grado de pureza sin utilizar cromatografía de inmunoafinidad. La FSH o mutante de FSH crudos que forma el material de partida para la purificación de acuerdo con la presente invención consiste en cosechas de cultivo de células que contienen la FSH o mutante de FSH.

10 En una realización preferida, se incluye un antioxidante o un aminoácido libre o dipéptido con efecto antioxidante y eliminador en algunas o todas las etapas del método de purificación de acuerdo con la presente invención. Más concretamente, el antioxidante está presente en cualquiera de los tampones utilizados para purificar y/o concentrar y/o filtrar el mutante de FSH. El antioxidante previene la oxidación de la FSH o mutante de FSH durante el tratamiento. Un antioxidante preferido es la L-metionina. Preferiblemente, la L-metionina se utiliza a una concentración de aproximadamente 10 a 100 mM. Otros ejemplos de antioxidante incluyen t-butil-4-metoxi-fenol, 15 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil fenol; bimeta-bisulfito de potasio o de sodio, bisulfito de sodio. Ejemplos de aminoácido libre y dipéptido con efecto antioxidante y eliminador son histidina, taurina, glicina, alanina, carnosina, anserina, 1-metilhistidina o combinaciones de los mismos.

20 Típicamente, el material de partida se clarifica primero y después opcionalmente se concentra (por ejemplo, usando ultrafiltración) y/o se intercambia en tampón (por ejemplo a través de una etapa de diafiltración) antes de ser capturado en la primera etapa cromatográfica.

En las etapas de cromatografía pueden utilizarse resinas basadas en polímeros y resinas basadas en agarosa. También es posible usar cromatografía de membrana, en la que la resina se reemplaza con una membrana funcionalizada.

Las 4 etapas de purificación de la presente invención se presentan a continuación con más detalle.

25 Etapa de cromatografía de afinidad de colorante (1).

30 El método de la invención implica una etapa de cromatografía de afinidad de colorante (1). En una realización preferida, la etapa de cromatografía de afinidad de colorante se lleva a cabo utilizando una resina que tiene como ligando inmovilizado un compuesto colorante que es bien conocido por los expertos en la técnica, es decir, Cibacron Blue F3G-A. El término "inmovilizado" es bien entendido por los expertos en la técnica y significa que el ligando es derivatizado en el sentido de que está unido químicamente a la resina. Una resina particularmente preferida es Blue Sepharose FF (que puede obtenerse de GE Biosciences Inc.). Las características técnicas de Blue Sepharose FF son las siguientes:

<b>ESPECIFICACIONES TÉCNICAS</b>	
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 gel drenado
Matriz	Agarosa altamente reticulada, 6%
Límite de exclusión (M <sub>r</sub> )	4 × 10 <sup>6</sup>
Intervalo de tamaños de partícula	45 - 165 μm
Velocidad lineal de flujo *	≈ 750 cm/h
Densidad de ligando	≈ 7 μmol Cibacron azul / ml de medio
Estabilidad de pH	4 - 12 (a largo plazo), 3 - 13 (a corto plazo)
Estabilidad química	40°C durante 7 días en: etanol al 70%, hidrocloreuro de guanidina 6 M, urea 8 M

Se entiende que el método puede realizarse con resinas alternativas que tienen características similares. Los ejemplos de resinas alternativas incluyen: Toyopearl AF-blue-HC-650M (Tosoh Bioscience), Blue Cellthru BigBead (Sterogene), SwellGel Blue (Pierce), Cibachrome blue 3GA-agarosa 100 (Sigma), Affi-Gel Blue (BioRad), cartuchos Econo-Pac blue (Bio-Rad), Blue sepharose HP (Amersham), Cibacron blue 3GA (Sigma).

5 La elución en la etapa de cromatografía de afinidad de colorante inmovilizado debe llevarse a cabo preferiblemente usando un tampón de fosfato, de forma especialmente preferible hidróxido de amonio. El pH del eluyente debe ser preferiblemente de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 13, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 12, de forma especialmente preferible a aproximadamente 11 - 12. Entre los tampones alternativos apropiados para mantener un pH de aproximadamente 11,8 se incluye el bicarbonato amónico.

10 En una realización particularmente preferida, los tampones en contacto con el producto para la etapa de cromatografía de afinidad de colorante (equilibrio y lavado) contienen un antioxidante, tal como L-metionina. Otros ejemplos de antioxidante incluyen t-butil-4-metoxifenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil fenol; bimetabisulfito de potasio o de sodio, bisulfito de sodio.

Etapa de cromatografía de intercambio aniónico débil (2).

15 El método de la invención comprende también una etapa de cromatografía de intercambio aniónico débil (2). Una resina preferida es DEAE Sepharose FF (que puede obtenerse de GE Biosciences), o una resina que tenga características similares. Alternativamente, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico débil puede llevarse a cabo en Fractogel DEAE (Merck KGaA), Toyopearl DEAE 650M (Tosoh Biosep Inc.). La etapa de cromatografía de intercambio aniónico débil (2) se lleva a cabo preferiblemente usando un tampón de acetato de amonio a un pH de aproximadamente 7,5 a 9,5.

20

Etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica (3).

El método implica también una etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica (3). En una realización preferida, la cromatografía de interacción hidrofóbica se lleva a cabo con una resina tal como Toyopearl Butyl 650M (que puede obtenerse de Tosoh Biosep Inc.).

25 Se entiende que la etapa (3) puede realizarse utilizando resinas alternativas, que tienen características similares. Las resinas alternativas que se pueden utilizar son los siguientes: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub); Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub); Butyl Sepharose 4 Fast Flow; Octyl Sepharose 4 Fast Flow; Phenyl Sepharose High Performance; SOURCE 15ETH; SOURCE 15ISO; SOURCE15PHE, todos de GE Biosciences (800) 526 - 3593; (véase [www.amershambiosciences.com](http://www.amershambiosciences.com)). Otras resinas son: Hydrocell C3 o C4; Hydrocell Phenyl de Biochrom Labs Inc. (812) 234 - 2558; (véase [www.biochrom.com](http://www.biochrom.com)).

30

La unión a la resina HIC se consigue en un tampón con una conductividad elevada, que se obtiene por adición de sal (NaCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por ejemplo). La elución en la etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica se lleva a cabo preferiblemente por la reducción de la conductividad de la fase móvil (reduciendo la concentración de sal), utilizando un tampón que tiene un pH desde aproximadamente 6 a aproximadamente 8, más preferiblemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, lo más preferiblemente a aproximadamente 7). Un sistema particularmente preferido contiene fosfato de sodio para el tamponamiento preferiblemente a un pH de 7 o aproximadamente 7, y sulfato de amonio. Anteriormente se han mencionado tampones alternativos.

35

En una realización particularmente preferida, los tampones en contacto con el producto para la etapa (3) de HIC (equilibrado, lavado, elución) contienen un antioxidante tal como L-metionina. Anteriormente se han mencionado antioxidantes alternativos.

40

Etapa de cromatografía de intercambio aniónico fuerte (4).

El método de la invención comprende también una segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico (4), que se realiza en una resina de intercambio aniónico fuerte. Una resina preferida es Fractogel EMD TMAE HICAP (que puede obtenerse de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Soporte	Fractogel ® EMD TMAE
Nº Cat.	1.16887
Tamaño de las partículas tipo S	20 – 40 µm
Tipo de cromatografía	cromatografía de intercambio iónico
Grupo funcional	grupo trimetilaminoetilo (tipo Q)
Estructura del monómero	CH <sub>2</sub> =CH-CONH (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N + (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>

## ES 2 572 629 T3

Capacidad de unión con proteína	120 mg de BSA /ml de gel
Intervalo de estabilidad de pH	pH 2 a pH 12
Valor de pK	> 13
Condiciones de elución	altas concentraciones de sal
Límite de presión (lecho: 150 x 10 mm)	20 bar (pérdida de carga a lo largo de la columna)
Temperatura de trabajo	de 4 °C a temperatura ambiente
Conservante	etanol al 20%
Cartucho listo para usar	50 - 10 mm
Material a granel tipos S	100 ml; 500 ml
Velocidad lineal de flujo	1,27 - 6,35 cm /min

Alternativamente, la segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico puede llevarse a cabo en Q Sepharose FF con las siguientes características:

Tipo de intercambiador de iones	anión fuerte
Capacidad total (mmol/ml)	0,18 a 0,25
Límite de exclusión (proteínas globulares)	$4 \times 10^6$
Forma de las esferas	esférica, diámetro de 45 - 165 $\mu\text{m}$
Estructura de las esferas	agarosa reticulada, 6%
Estabilidad del pH en operación	2 - 12
Estabilidad del pH en limpieza	1 - 14
Velocidad lineal de flujo a 25 °C 1 bar 15 cm de altura del lecho, columna XK 50/30	400 - 700 cm/h

- 5 La segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo preferiblemente usando un tampón que tiene un pH ligeramente alcalino (por ejemplo, de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 9,0, o de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0, lo más preferiblemente a aproximadamente 8,5). Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, tampón de borato, ácido trietanolamina/iminodiacético Tris, acetato de amonio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. El más preferido es el tampón borato, a un pH de aproximadamente 8,5. La
- 10 elución a partir de la resina de intercambio aniónico se consigue aumentando la conductividad de la fase móvil por medio de la adición de sal, preferiblemente NaCl. En una realización particularmente preferida, los tampones de contacto con el producto para la cromatografía de intercambio aniónico (equilibrado, lavado, elución) contienen un antioxidante, preferiblemente L-metionina. Anteriormente se han mencionado antioxidantes alternativos.

Etapa opcional de purificación (0) – Etapa de captura.

- 15 Antes de la etapa de cromatografía de afinidad de colorante (1), puede ser de desear llevar a cabo una etapa de captura con el fin de eliminar las impurezas más crudas. La etapa de captura se lleva a cabo preferiblemente utilizando un Q Sepharose Fast Flow (GE Biosciences) llevado a cabo preferiblemente usando un tampón que tiene un pH ligeramente alcalino (por ejemplo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, lo más preferiblemente a aproximadamente 7,0). Los tampones adecuados incluyen,
- 20 por ejemplo, tampón de borato, ácido trietanolamina/iminodiacético Tris, acetato de amonio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. El más preferido es el tampón borato, a un pH de aproximadamente 7,0. La elución de la resina de intercambio aniónico se consigue aumentando la conductividad de la fase móvil mediante la adición de sal, preferiblemente NaCl. En una realización particularmente preferida, los tampones en contacto con el producto para la cromatografía de intercambio aniónico (equilibrado, lavado, elución) contienen un antioxidante, preferiblemente L-
- 25 metionina. Anteriormente se han mencionado antioxidantes alternativos.

Etapa de purificación adicional opcional (3bis) - ultrafiltración/diafiltración.

- 5 Antes de la etapa de la segunda cromatografía de intercambio iónico (4), puede ser deseable llevar a cabo una etapa de ultrafiltración (3bis) con el fin de concentrar la FSH o mutante de FSH crudos. La ultrafiltración (o diafiltración) se lleva a cabo preferiblemente utilizando una membrana que tiene un valor de corte de aproximadamente 3 - 10 kD, lo más preferiblemente aproximadamente 8 kD.

Etapa de purificación adicional opcional (5) – nanofiltración.

Puede ser deseable someter la muestra de FSH a una etapa de nanofiltración, en particular como etapa de aclaramiento de virus, es decir, para reducir el riesgo de contaminación del preparado de FSH con virus o partículas similares a virus que se originan del cultivo de células.

- 10 La nanofiltración se puede hacer en cualquier etapa del proceso de purificación, pero particularmente se prefiere llevar a cabo la nanofiltración después de la 2ª etapa de cromatografía de intercambio iónico. La nanofiltración puede ser realizada más de una vez, por ejemplo puede llevarse a cabo dos veces.

En una realización particularmente preferida, se llevan a cabo las siguientes etapas en el orden que se indica a continuación:

- 15 (0) etapa de captura (preferiblemente usando una columna Q SFF);  
 (1) cromatografía de afinidad de colorante (preferiblemente usando una columna de Blue Sepharose FF);  
 (2) cromatografía de intercambio aniónico débil (preferiblemente usando una columna de DEAE Sepharose FF);  
 (3) cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) (preferiblemente utilizando una columna Butyl 650M);  
 20 (3bis) ultrafiltración (preferiblemente con una membrana que tiene un valor de corte de 8 kD);  
 (4) cromatografía de intercambio aniónico en una resina de intercambio aniónico fuertemente básica (preferiblemente usando una resina TMAE hicap);  
 (5) nanofiltración

- 25 La ventaja de la presente invención es que el método de purificación carece de una etapa de cromatografía de inmunoafinidad, de alto elevado, y de todas formas proporciona un alto grado de pureza y bioactividad específica de glicoproteína. También, la glicoproteína purificada, preferiblemente la FSH o mutante de FSH de la presente invención, no contiene impurezas no deseadas añadidas por la cromatografía de inmunoafinidad (por ejemplo, inmunoglobulinas lixiviadas de la resina).

- 30 Las muestras de FSH o mutantes de FSH, que han sido sometidas al menos a las etapas (1) a (4) y opcionalmente (0), (3 bis) y/o (5) se consideran puras.

Etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica.

- 35 Un mutante de FSH más preferido de acuerdo con esta invención tiene una subunidad alfa de FSH que comprende la secuencia SEC ID NO. 1, y una subunidad beta de FSH que comprende la secuencia SEC ID NO. 2, en donde N52 y N78 de la subunidad alfa están glicosilados y otros N7, N24 y N55 de la subunidad beta están glicosilados. Este mutante de FSH se refiere como GM1 con subunidad beta triglicosilada.

Sin embargo, dependiendo de la línea celular elegida para la producción recombinante de GM1, la posición N55 de la subunidad beta puede estar sólo parcialmente glicosilada. Cuando se produce en células CHO (ovario de hámster chino), que es una línea celular común para la producción de FSH y sus mutantes, sólo aproximadamente el 40% de las proteínas GM1 tienen una subunidad beta tri-glicosilada.

- 40 Como GM1 con subunidad beta triglicosilada tiene una bioactividad específica más alta que GM1 con subunidad beta-diglicosilada, existe la necesidad de un procedimiento para acumular o enriquecer las proteínas con subunidad beta triglicosilada.

Ahora se ha encontrado que una muestra de FSH o mutantes de FSH puede ser enriquecida en proteínas con una subunidad beta triglicosilada sometiéndola a una columna de interacción hidrofóbica.

- 45 En una realización, la invención se refiere por tanto a un método para enriquecer una muestra de FSH o mutantes de FSH en proteínas con subunidades beta tri-glicosiladas, que comprende la etapa de someter la muestra a cromatografía de interacción hidrofóbica. Preferiblemente la cromatografía de interacción hidrofóbica se lleva a cabo en una columna Source 15 o una columna análoga.

## ES 2 572 629 T3

Por consiguiente, es deseable llevar a cabo una etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica, en particular, usando una columna de Source 15 HIC (de Amersham; se define como perla resolutive Source 15 de 15 µm de diámetro) que tiene las siguientes características:

Soporte	Source 15 PHE
Nº cat.	17-0147
Tamaño de las partículas de tipo S	15 µm
Tipo de cromatografía	Cromatografía de interacción hidrofóbica
Grupo funcional	Fenilo
Estructura del monómero	R-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O- CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
Capacidad de unión de proteína	25 mg de BSA/ml de gel
Intervalo de estabilidad de pH	de pH 2 a pH 12
Valor de pK	NA
Condiciones de elución	bajas concentraciones de sal, preferiblemente la conductividad es de 105 ± 2 mS/cm
Límite de presión (altura del lecho: 30 mm)	14 bar (pérdida de carga a lo largo de la columna)
Temperatura de trabajo	de 4 °C a 40 °C
Conservante	Etanol al 20%
Cartucho listo para el uso	5/50 - 100 - 150 mm y 10/50 - 100 - 150 mm
Material en masa tipos S	100 ml; 1 L
Velocidad lineal de flujo	2,5 - 15 cm/min

- 5 Las columnas que se consideran análogas a la columna Source 15 HIC tienen las siguientes características: Permiten alta resolución, tienen esferas pequeñas, tamaño de poro grande y son hidrófilas. Esfera pequeña significa preferiblemente un tamaño entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 µm. Tamaño de poro grande significa preferiblemente tamaños de poro de aproximadamente 750 a aproximadamente 1000 Angstrom. Preferiblemente, estas columnas se basan en resinas basadas en polímero, que se derivatizan con un ligando funcional de interacción hidrofóbica, opcionalmente a través de enlazadores de diferentes tamaños hasta polímeros largos. Las resinas basadas en polímeros comprenden preferiblemente resinas de metacrilato, poliestireno y divinilbenceno. Los ligandos funcionales de interacción hidrofóbica comprenden preferiblemente éter, propilo, polipropilenglicol, isopropilo, fenilo, butilo y hexilo.
- 10

Las columnas HIC preferidas utilizadas como análogos de la columna Source 15 son:

- 15
- Fractogel fenilo tipo S (de Merck)
  - TSK gel fenilo 5PW (de Tosoh Biosciences)
  - Todas las resinas hidrofóbicas tipo 'S' de Merck
  - Todas las resinas hidrofóbicas TSK de Tosoh Biosciences

20 En una realización en la que la proteína es un mutante de FSH existente en diferentes formas de glicosilación, esta etapa proporciona un enriquecimiento en la forma más glicosilada. Específicamente, utilizando una columna Source 15 HIC o una columna análoga se proporciona un enriquecimiento en el mutante de FSH en el que la subunidad beta es, por ejemplo, triglicosilada en lugar de diglicosilada.

25 En una realización preferida, la etapa de enriquecimiento se realiza en una muestra pura de FSH o mutantes de FSH, es decir, la muestra había sido previamente sometida a las etapas (1) a (4), y opcionalmente, (0), (3 bis) y/o (5) como se definió anteriormente. Sin embargo, la muestra de FSH o mutantes de FSH también puede haber sido sometida a un proceso de purificación diferente.

En una realización preferida, la presente invención se refiere entonces a un método que comprende las etapas en el orden siguiente:

- (0) etapa de captura;
- (1) cromatografía de afinidad de colorante;
- 5 (2) cromatografía de intercambio aniónico débil;
- (3) cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC);
- (3 bis) ultrafiltración;
- (4) cromatografía de intercambio aniónico fuerte;
- (5) nanofiltración;
- 10 (6) cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

En una realización, la etapa de enriquecimiento (6) sola o combinada con etapas previas de purificación proporciona un producto final del mutante de FSH con una subunidad alfa que comprende la secuencia de SEC ID NO. 1, y con una subunidad beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO. 2, con la siguiente relación de glicosilación:

- 15 • mutante de FSH que tiene una subunidad beta triglicosilada                      aproximadamente 70 - 80%
- mutante de FSH que tiene una subunidad beta diglicosilado                      aproximadamente 20 - 30%

La relación de mutante de FSH en el que está presente la subunidad beta triglicosilada se incrementa por tanto en comparación con una muestra sin realizar la etapa de enriquecimiento en el que la relación es la siguiente:

- mutante de FSH que tiene una subunidad beta triglicosilada                      aproximadamente 30 - 40%
- 20 • mutante de FSH que tiene una subunidad beta diglicosilado                      aproximadamente 70 - 60%

La presente invención se refiere también a una muestra de mutantes de FSH que pueden obtenerse por la etapa de enriquecimiento anterior.

25 Los mutantes de FSH que tienen una subunidad alfa de acuerdo con SEC ID NO 1 y una subunidad beta de acuerdo con SEC ID NO 2 con subunidades beta tri-glicosiladas tienen bioactividades específicas mayores que los mutantes con subunidades beta diglicosiladas.

En una realización de la presente invención se obtiene un mutante de FSH que tiene una subunidad alfa de acuerdo con SEC ID NO 1 y una subunidad beta de acuerdo con SEC ID NO 2 y que tiene una bioactividad específica entre 11.000 y 17.000 UI/mg.

30 Tales mutantes, tanto si se obtienen por cualquiera de los métodos anteriores o por cualquier otro método, también se incluyen en esta invención.

Preferiblemente, la muestra de mutante de FSH tiene una bioactividad específica entre 12.000 y 16.000 UI/mg y más preferiblemente de aproximadamente 15.000 UI/mg, en donde la actividad biológica se mide por el bioensayo de Steelman Pohley y el contenido de proteínas se mide mediante SE-HPLC.

35 Preferiblemente, la muestra de mutante de FSH contiene al menos 60%, preferiblemente al menos 70% - 80%, más preferiblemente al menos 90% de subunidades beta triglicosiladas.

#### Almacenamiento/Liofilización

40 La composición líquida resultante del proceso de purificación como se describe anteriormente y que contiene FSH o mutante de FSH purificados, se puede congelar para su almacenamiento tal cual, o después de la purificación el material eluido se puede someter a liofilización ("secado por congelación") para eliminar disolvente. El líquido o producto liofilizado resultante se denomina "granel de mutante de FSH".

#### Formulaciones de FSH

45 La FSH o mutante de FSH de la invención o purificada de acuerdo con el método de la invención se pueden formular para inyección, por vía intramuscular o subcutánea, preferiblemente subcutánea. La formulación de mutante de FSH puede ser liofilizada, en cuyo caso se disuelve en agua para inyección justo antes de la inyección. La formulación de FSH o mutante de FSH puede ser también una formulación líquida, en cuyo caso se puede inyectar directamente, sin disolución previa.

La FSH o formulación mutante de FSH pueden ser de dosis única o de dosis múltiple. Si se trata de dosis múltiple, debe contener preferiblemente un agente bacteriostático, tal como, por ejemplo, alcohol bencílico, metacresol, timol o fenol, preferiblemente alcohol bencílico o metacresol. Las formulaciones de dosis única también pueden comprender un agente bacteriostático.

- 5 La FSH o mutante de FSH de la invención puede formularse con excipientes y estabilizantes conocidos, por ejemplo sacarosa y manitol. También puede comprender un antioxidante, tal como metionina. Puede comprender además un agente tensioactivo, tal como TWEEN (preferiblemente TWEEN 20), o Pluronic (preferiblemente Pluronic F68).

10 Una composición farmacéutica particularmente preferida que puede obtenerse por los métodos de la invención es una formulación liofilizada, en la que un mutante de FSH con una subunidad alfa de acuerdo con SEC ID NO 1 y una subunidad beta de acuerdo con SEC ID NO 2 se formula con sacarosa, metionina, Tween 20,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , hidróxido de sodio y ácido o-fosfórico a un pH de aproximadamente 7.

En una formulación multidosis particularmente preferida, la FSH producida por el método de la invención se formula disolviéndola en agua para inyección con sacarosa, tampón de fosfato (pH 7), Pluronic F68, metionina y metacresol o alcohol bencílico.

#### 15 Indicaciones

La FSH o mutante de FSH de la invención es adecuada para su uso en todos los tratamientos en los que está indicada la FSH. Es especialmente adecuada para la administración subcutánea en la inducción de la ovulación, la hiperestimulación ovárica controlada para tecnologías de reproducción asistida, y en el tratamiento de la oligospermia. Se puede usar junto con otras gonadotropinas, tales como LH y hCG. También se puede usar con otros compuestos que aumentan la respuesta a la FSH, tales como el citrato de clomifeno, inhibidores de la aromatasa, tales como Anastrozol, Letrozol, Fadrozol y YM-511.

Secuencias:

SEC ID NO. 1: mutante de FSH (GM1) subunidad  $\alpha$ ;

SEC ID NO. 2: mutante de FSH (GM1) subunidad  $\beta$ .

25 La expresión "célula recombinante" se refiere a una célula producida insertando ADN heterólogo, incluyendo cualquiera de los métodos de manipulación genética antes mencionados. Preferiblemente la FSH es producida por vía recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un vector o vectores que comprenden ADN que codifica la glicoproteína humana subunidad alfa y la subunidad beta de FSH. El ADN que codifica las subunidades alfa y beta puede estar presente en el mismo vector o en vectores diferentes.

30 En una realización preferida, la FSH o mutante de FSH se produce de forma recombinante en células CHO, o bien en un suero o en un medio libre de suero.

En una realización preferida, la FSH purificada o mutante de FSH producidos de acuerdo con el método de la invención son adecuados para la administración subcutánea, permitiendo la autoadministración por el paciente.

35 La expresión "FSH o mutante de FSH recombinante crudos" se refiere al sobrenadante de cultivo celular a partir de células recombinantes que expresan FSH, antes de que haya sido sometido a ninguna etapa de cromatografía. La expresión comprende la forma cruda del sobrenadante (como se aísla de las células), así como sobrenadante concentrado y/o filtrado y/o ultrafiltrado.

40 La expresión "actividad biológica" en relación con la actividad de FSH, se refiere a la capacidad de una formulación de mutante de FSH de desencadenar respuestas biológicas asociadas con FSH, tales como aumento de peso ovárico en el ensayo de Steelman-Pohley [Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin; *Endocrinology*; 1953, 53, 604 - 616], o el crecimiento folicular en una paciente. El crecimiento folicular en una paciente puede ser evaluado mediante ultrasonidos, por ejemplo, en términos del número de folículos que tienen un diámetro medio de aproximadamente 16 mm en el día 8 de la estimulación. La actividad biológica se evalúa con respecto a un estándar aceptado para FSH.

45 El contenido de LH en un preparado de FSH puede medirse, por ejemplo, usando un inmunoensayo específico de LH, tal como el Delfia hLH Spec (Wallac Oy, Turku, Finlandia).

50 La expresión "actividad específica", en referencia a la FSH o el mutante de FSH de acuerdo con la presente invención, significa la actividad biológica en UI del preparado en un ensayo biológico para FSH reconocido, tal como el bioensayo de Steelman Pohley [dividido por la cantidad de proteínas, determinada mediante un ensayo para el contenido de proteína total, como el ensayo de Lowry [O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265; Hartree E. E. (1972). *Anal. Biochem.* 48: 422; J. R. Duley y P. A. Grieve (1975) *Anal. Biochem.* 64: 136], el ensayo de Bradford [Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248], o mediante la absorbancia a 280 nm.

Las muestras de FSH pueden analizarse en relación con su pureza en diversas etapas del procedimiento usando, por ejemplo, técnicas tales como las enumeradas a continuación:

Cuantificación de FSH o mutante de FSH/ subunidad alfa libre / pureza / formas oxidadas: RP-HPLC.

- 5 Como se mencionó anteriormente, la FSH o mutante de FSH es una glicoproteína heterodimérica, compuesta de una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Puede ocurrir cierta disociación de las subunidades, y esto puede controlarse observando la cantidad de subunidad  $\alpha$  libre presente en una muestra. Además, las subunidades de mutante de FSH pueden llegar a oxidarse. Los contaminantes oxidados pueden ser cuantificados utilizando RP-HPLC, mientras que las subunidades libres pueden evaluarse usando SDS-PAGE.

Cuantificación de FSH o mutante de FSH: Inmunoensayo.

- 10 El contenido de mutante de FSH en una muestra puede determinarse usando un inmunoensayo específico para el mutante de FSH, tal como el inmunoensayo DELFIA FSH.

Proteína total: Ensayo de Bradford, ensayo de Lowry, absorbancia a 280 nm.

Como con cualquier preparado proteico, el contenido de proteína total puede determinarse usando técnicas tales como un ensayo de Bradford, un ensayo de Lowry o por absorbancia a 280 nm.

- 15 Patrón de isoformas: IEF.

- 20 Como se mencionó anteriormente, la FSH o mutante de FSH es una glicoproteína que tiene múltiples restos de oligosacáridos unidos en varios lugares en ambas subunidades. Los restos de oligosacáridos pueden tener diferentes grados de ramificación y pueden estar cubiertos con restos de ácido siálico. Los restos de ácido siálico están cargados negativamente (a pH neutro). Las diferencias de recubrimiento conducen a la heterogeneidad, con una mezcla de especies que tienen diferentes puntos isoeléctricos (pI). Esto puede evaluarse usando una técnica que separa basándose en la carga, tal como el enfoque isoeléctrico (IEF).

Proteína de la célula hospedadora (HCP).

La proteína de la célula hospedadora puede ser analizada usando un ensayo ELISA. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos contra un "cultivo simulación", que es un cultivo de células hospedadoras sin gen de FSH.

## 25 Ejemplos

La presente invención será ahora ilustrada mediante 2 ejemplos.

### Ejemplo 1

Etapas (1): Cromatografía de afinidad de colorante sobre Blue Sepharose.

- 30 El material de partida de mutante de FSH para la purificación se prepara a partir de cosechas de cultivo celular que contienen mutante de FSH recombinante, es decir, el mutante de FSH que tienen una subunidad alfa de acuerdo con SEC ID NO 1 y una subunidad beta de acuerdo con SEC ID NO 2 fue producido por vía recombinante en células CHO de acuerdo con el documento WO 2005/020934. La columna de cromatografía de afinidad de colorante (resina Blue Sepharose FF) se equilibra primero con un tampón de baja conductividad a un pH de 7,0 que contiene L-metionina. Entonces se aplica el líquido que contiene la FSH directamente a la resina. Después de la carga, el material no unido se separa por lavado usando tampón de equilibrado. La FSH se eluye finalmente lavando la columna con tampón de hidróxido de amonio a pH 11,8, que contiene L-metionina. El conjunto de elución se procesa directamente al paso siguiente. El paso se realiza a temperatura ambiente.

Etapas (2): Cromatografía de intercambio aniónico débil en DEAE Sepharose FF.

- 40 El material eluido Blue Sepharose FF de la etapa (1) se carga en una columna de DEAE Sepharose FF equilibrada frente a un tampón de acetato de amonio, pH 8,5, que contiene acetato de amonio y L-metionina. El material no unido se lava con tampón de equilibrio. El mutante de FSH se encuentra en la fracción no unida.

Etapas (3): Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) en Toyopearl Butyl 650M.

- 45 El material eluido de Blue Sepharose FF procedente de la etapa (2) se carga en una columna Toyopearl Butyl 650M equilibrada contra un tampón de fosfato de sodio, pH 7,0, que contiene sulfato de amonio y L-metionina. El material no unido se lava con tampón de equilibrado. La elución se realiza con tampón de fosfato de sodio pH 7,0 que contiene sulfato de amonio y L-metionina.

Etapas (4): Cromatografía de intercambio aniónico fuerte en Fractogel EMD TMAE HICAP.

El material eluido de HIC (de la etapa (3)) se carga en una columna Fractogel EMD TMAE HICAP equilibrada frente a tampón de borato de sodio, pH 8,5, que contiene L-metionina. Después de la carga, la columna se aclaró con

tampón de equilibrado con el fin de eliminar todo el material no unido. A continuación, la columna se eluyó con tampón de borato de sodio pH 8,5, que contiene NaCl (para aumentar la conductividad) y L-metionina (como antioxidante).

5 Al seguir el procedimiento anterior, el factor de purificación, es decir la relación de pureza del mutante de FSH en la muestra purificada frente a la pureza del mutante de FSH en el material de partida (mutante de FSH crudo), es de aproximadamente 40.000.

#### Ejemplo 2

Etapa (0): Etapa de captura.

10 El material de partida de mutante de FSH para la purificación se prepara a partir de cosechas de cultivo de células que contiene mutante de FSH recombinante, es decir, el mutante de FSH que tiene una subunidad alfa de acuerdo con SEC ID NO 1 y una subunidad beta de acuerdo con SEC ID NO 2 fue producido por vía recombinante en células CHO de acuerdo con el documento WO 2005/020934.

#### Clarificación

15 El mutante r-FSH crudo se filtró a través de un filtro profundo (tal como filtros Millipore Millistack o equivalentes). La recolección clarificada se concentra en una membrana de 8 kDa y se captura en la columna Q SFF.

Etapa (1): Cromatografía de afinidad de colorante sobre Blue Sepharose.

20 El material de partida de mutante de FSH para la purificación se prepara a partir de cosechas de cultivo celular que contienen mutante de FSH recombinante, es decir, el mutante de FSH fue producido por vía recombinante en células CHO de acuerdo con el documento WO 2005/020934, bien sea en un suero o en un medio libre de suero. La columna de cromatografía de afinidad de colorante (resina Blue Sepharose FF) se equilibra primero con un tampón de baja conductividad a pH 7,0 que contiene L-metionina. Entonces se aplica el líquido que contiene la FSH directamente a la resina. Después de la carga, el material no unido se elimina por lavado usando tampón de equilibrado. La FSH se eluye finalmente lavando la columna con tampón de hidróxido de amonio a pH 11,8, que contiene L-metionina. El conjunto de elución se procesa directamente a la etapa siguiente. La etapa se realiza a temperatura ambiente.

Etapa (2): Cromatografía de intercambio aniónico débil en DEAE Sepharose FF.

El material eluido de Blue Sepharose FF de la etapa (1) se carga en una columna de DEAE Sepharose FF equilibrada frente a un tampón de acetato de amonio, pH 8,5, que contiene acetato de amonio y L-metionina. El material no unido se elimina con tampón de equilibrado. El mutante de FSH está en la fracción no unida.

30 Etapa (3): Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) en Toyopearl Butyl 650M.

El material eluido Blue Sepharose FF de la etapa (2) se carga en una columna Toyopearl Butyl 650M equilibrada frente a un tampón de fosfato de sodio, pH 7,0, que contiene sulfato de amonio y L-metionina. El material no unido se elimina con tampón de equilibrio.

Etapa (3 bis): Diafiltración.

35 El mutante de FSH de la etapa (3) se concentró mediante filtración de flujo tangencial sobre una membrana de 8 KD de poliéter sulfona. Cuando el material retenido alcanzó aproximadamente la mitad del volumen inicial, el material se sometió a intercambio de tampón mediante diafiltración frente a WFI y luego tampón de equilibrado de la cromatografía de intercambio aniónico siguiente.

Etapa (4) Cromatografía de intercambio aniónico en resina Fractogel EMD TMAE hicap.

40 Una columna Fractogel EMD TMAE hicap se equilibró primero con tampón de borato de sodio, pH 8,5, que contiene L-metionina. El material diluido (de la etapa (3)) se cargó en la columna. El material no unido se eliminó usando tampón de equilibrado. La FSH se eluye de la columna aumentando la concentración de sal de una forma lineal.

Etapa (5) Nanofiltración.

45 El material eluido de la etapa (4) de Fractogel EMD-TMAE se aplicó directamente a un dispositivo de nanofiltración de 20 nm a una presión de 3 bares bajo nitrógeno. El filtrado se procesa para la etapa siguiente. La operación se llevó a cabo a 2 - 8 °C.

Etapa (6) Etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica usando una columna Source 15 HIC.

El filtrado de la nanofiltración se ajusta en relación con la conductividad y se carga en una columna Source 15 HIC equilibrada frente a borato de sodio, pH 9,1, que contiene sulfato de amonio, sulfato de potasio y L-metionina. El

material no unido se elimina con tampón de equilibrio. La FSH se eluye de la columna disminuyendo el contenido de sal de una forma escalonada.

Se obtiene un producto final del mutante de FSH con lo que se identifican las siguientes glicofomas (utilizando un método analítico basado en cromatografía de líquidos de alta presión):

- 5 Mutante de FSH que tiene una subunidad beta triglicosilada 76%  
 Mutante de FSH que tiene una subunidad beta diglicosilada 24%

Pureza de las muestras

Tabla 1: pureza de las muestras de mutante de FSH después de cada etapa de purificación

Etapa de purificación	Pureza
Etapa (0): Etapa de captura	19% FSH  <ul style="list-style-type: none"> <li>Contenido de FSH determinado por RP-HPLC</li> <li>Contenido total de proteína determinado mediante Bradford</li> </ul>
Etapa (1): Cromatografía de afinidad de colorante en resina Blue Sepharose FF	aproximadamente 1.182.000 ppm HCP  <ul style="list-style-type: none"> <li>Contenido de FSH determinado por RP-HPLC</li> <li>Contenido de proteína de células hospedadoras determinado por ELISA</li> </ul>
Etapa (2): Cromatografía de intercambio aniónico en resina DEAE Sepharose FF	Cantidad de impureza: 586.000 ppm  <ul style="list-style-type: none"> <li>Contenido de FSH determinado por RP-HPLC</li> <li>Contenido de proteína de células hospedadoras determinado por ELISA</li> </ul>
Etapa (3): Cromatografía de interacción hidrofóbica en resina Toyopearl Butyl 650 M	Cantidad de impureza: 3500 ppm  <ul style="list-style-type: none"> <li>Contenido de FSH determinado por RP-HPLC</li> <li>Contenido de proteína de células hospedadoras determinado por ELISA</li> </ul>
Etapa (4): Cromatografía de intercambio aniónico en resina Fractogel EMD TMAE hicap	Cantidad de impureza: < 1000 ppm  <ul style="list-style-type: none"> <li>Contenido de FSH determinado por RP-HPLC</li> <li>Contenido de proteína de células hospedadoras determinado por ELISA</li> </ul>

10 Actividad biológica de muestras de mutante de FSH

La actividad biológica del mutante de r-FSH purificado se midió utilizando el método de aumento de peso ovárico Steelman - Pohley. La actividad específica se calculó usando la actividad biológica dividida por el contenido de mutante de FSH como se determina por un método de SE-HPLC, como se describe a continuación.

15 En la Tabla 2 se dan Ejemplos de valores para dos muestras de una FSH global final. Las muestras se obtuvieron siguiendo un método que comprende los siguientes etapas:

- (0) etapa de captura;  
 (1) cromatografía de afinidad de colorante;  
 (2) cromatografía de intercambio aniónico débil;  
 (3) cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC);  
 20 (3 bis) ultrafiltración;  
 (4) cromatografía de intercambio aniónico fuerte;  
 (5) nanofiltración;

(6) cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

La actividad específica de la masa final obtenida está típicamente entre 11.000 y 17.000 UI/mg, en particular de 12.000 a 16.000.

Tabla 2. Actividad específica de mutante de r-FSH purificado en masa de la invención

Análisis	Muestra 1	Muestra 2
Concentración de proteína por SE-HPLC (mg/ml)	0,72	0,64
Actividad específica (actividad biológica/SE-HPLC)	15.824 UI/mg	11.914 UI/mg

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para enriquecer una muestra de FSH o mutantes de FSH en proteínas con subunidades beta triglicosiladas, que comprende la etapa de someter la muestra a cromatografía de interacción hidrofóbica, en donde la muestra de FSH o mutantes de FSH ha sido primero purificada, que comprende la etapa de someter un líquido que comprende dichos FSH o mutantes de FSH a:
- 5
- (1) cromatografía de afinidad de colorante;
  - (2) cromatografía de intercambio aniónico débil;
  - (3) cromatografía de interacción hidrofóbica;
  - (4) cromatografía de intercambio aniónico fuerte.
- 10 en donde las etapas se llevan a cabo en dicho orden.
2. El método según la reivindicación 1ª, en donde la cromatografía de interacción hidrofóbica se lleva a cabo en una columna Source 15 o una columna análoga.
3. El método según la reivindicación 1ª o la reivindicación 2ª, en donde el mutante de FSH tiene una subunidad alfa según la SEC ID No. 1 y una subunidad beta según la SEC ID No. 2.
- 15 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en donde la cromatografía de afinidad de colorante de la Etapa (1) se lleva a cabo con una resina que tiene Cibacron Blue F3G-A inmovilizado.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en donde la resina usada para la cromatografía de afinidad de colorante de la Etapa (1) es Blue Sepharose FF.
- 20 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, en donde la cromatografía de afinidad de colorante de la Etapa (1) se lleva a cabo usando un tampón de hidróxido de amonio a un pH de aproximadamente 9 a 13 como eluyente.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en donde la resina usada para la cromatografía de intercambio aniónico débil de la Etapa (2) es DEAE Sepharose FF.
- 25 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 7ª, en donde la cromatografía de intercambio aniónico débil de la Etapa (2) se lleva a cabo usando un tampón de acetato de amonio a un pH de aproximadamente 7,5 a 9,5.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 8ª, en donde la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) de la Etapa (3) se lleva a cabo usando Toyapearl Butyl 650 M.
- 30 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 9ª, en donde la cromatografía de interacción hidrofóbica de la Etapa (3) se lleva a cabo usando fosfato sódico/sulfato amónico con un pH de aproximadamente 6 a 8 como eluyente.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 10ª, en donde la resina utilizada para la cromatografía de interacción hidrofóbica de la Etapa (4) es Fractogel TMAE HiCap.
- 35 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 11ª, en donde la etapa de cromatografía de intercambio aniónico fuerte de la Etapa (4) se lleva a cabo usando borato sódico con un pH de aproximadamente 7,2 a 9 como eluyente.
13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 12ª, que comprende además una etapa de captura (0).
- 40 14. El método según la reivindicación 13ª, en donde la Etapa de captura (3) se lleva a cabo usando una columna de Q Sepharose FF.
15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una etapa de concentración, preferiblemente una etapa de ultrafiltración.
- 45 16. Un método para enriquecer una muestra de FSH o mutantes de FSH para proteínas con subunidades beta triglicosiladas que comprende las etapas de someter la muestra a cromatografía de interacción hidrofóbica, comprendiendo el método las etapas:
- (0) etapa de captura;
  - (1) cromatografía de afinidad de colorante;

- 5
- (2) cromatografía de intercambio aniónico débil;
  - (3) cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC);
  - (3 bis) ultrafiltración;
  - (4) cromatografía de intercambio aniónico fuerte;
  - (5) nanofiltración;
  - (6) cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

en donde las etapas se llevan a cabo en dicho orden.

17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cualquiera de los eluyentes y/o tampones puede contener un antioxidante, en particular L-metionina.

10