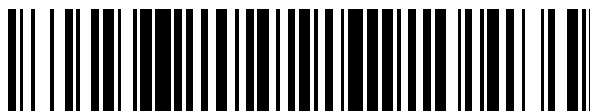


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 248**

51 Int. Cl.:

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 14/59 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2010** **PCT/EP2010/007115**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011** **WO11063943**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2010** **E 10788242 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017** **EP 2504350**

54 Título: **Proceso para la purificación de glucoproteínas**

30 Prioridad:

24.11.2009 EP 09014585

24.11.2009 US 263931 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2017

73 Titular/es:

GLYCOTOPE GMBH (100.0%)

Robert-Rössle-Strasse 10

13125 Berlin, DE

72 Inventor/es:

GOLETZ, STEFFEN y

STÖCKL, LARS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 626 248 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

Proceso para la purificación de glucoproteínas

La presente invención se refiere a un proceso para la purificación de glucoproteínas, como la FSH (hormona de estimación de folículos), LH (hormona luteinizante), CG (gonotropina coriónica) y TSH (hormona estimuladora de tiroides) y a la fabricación de una glucoproteína de interés que emplea un proceso de purificación respectivo.

Las glucoproteínas son proteínas que contienen cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente a las cadenas laterales polipéptido. Las glucoproteínas pueden tener un amplio número de diferentes funciones biológicas, que incluyen funciones estructurales, protectoras, portadoras, funciones de hormonas o enzimas. De acuerdo con lo anterior, se pueden utilizar diversas glucoproteínas como productos farmacéuticos. La disposición de dichas glucoproteínas es altamente deseable de esta manera. Diversas glucoproteínas se pueden producir hoy en día en forma recombinante, lo que sin embargo requiere procedimientos de purificación extensos para extraer la glucoproteína objetivo de las cosechas de cultivos celulares.

Una clase importante de glucoproteínas son gonadotropinas, una familia de cuatro hormonas estrechamente relacionadas, que incluyen FSH, LH, CG y TSH (Glycobiology, vol. 13, Nº 3, páginas 179-189, 2003). el FSH se utiliza por ejemplo en el tratamiento de trastornos reproductivos y de infertilidad en pacientes masculinos y femeninos. También el hCG y el LH se utilizan en el tratamiento de fertilidad, solos o en combinación con FSH.

En la naturaleza, el FSH se produce mediante la glándula pituitaria. Para uso farmacéutico, el FSH se puede producir en forma recombinante (rFSH), o se puede aislar de la orina de mujeres posmenopáusicas (FSHu).

FSH se utiliza en pacientes femeninos en inducción de ovulación (OI) y en la hiperestimulación ovárica controlada (COH) para tecnologías reproductivas asistidas (ART). En un régimen de tratamiento típico para la inducción de la ovulación, se administra a un paciente inyecciones diarias de FSH o una variante (de 75 a 300 UI 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 un paciente inyecciones diarias de FSH o una variante (150-600 UI FSH/día, pero también tan poco como 75 UI FSH/día) durante un período de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 días.

El FSH también se utiliza para inducir espermatogénia en hombres que sufren de oligospermia. Un régimen que utiliza 150 UI de FSH 3 veces por semana en combinación con 2,500 UI de hCG dos veces por semana ha sido exitoso en alcanzar la mejora en el conteo de espermatozoides en hombres que sufren hipogonadismo hipogonadotrópico (Burgues et al.; Subcutaneous self- administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotropic Hypogonadism; Hum. Reprod.; 1997, 12, 980-6).).

Debido a la importancia del FSH es deseable en el tratamiento de los trastornos de la fertilidad, el suministro de FSH de alta pureza y alta actividad específica es deseable. El tratamiento de FSH requiere inyecciones repetidas. Se pueden administrar preparaciones de FSH altamente purificadas subcutáneamente, que permiten la auto administración por el paciente, aumentando de esta manera la comodidad y conveniencia del paciente.

Los documentos WO2005/110015 A2, US2006/0026719 A1, y EP0276551 A1 divulgan un proceso para la purificación de una glucoproteína en donde las etapas de purificación se realizan en la secuencia de cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión de tamaño, y cromatografía de fase inversa.

Lynch et al. (The extraction and purification of human pituitary follicle-stimulating hormone and luteinising hormone; Acta Endocrinologica, 1988, 288, 12-19) divulga un método para purificar FSH de pituitaria humana. El método implica cromatografía de intercambio de aniones y cationes, cromatografía de exclusión de tamaño y de extracción por inmunoafinidad.

El documento WO 98/20039 (IBSA Institut Biochimique SA) divulga un proceso para la purificación de FSH de orina humana partiendo con extractos de orina denominados gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG). El proceso utiliza cromatografía de intercambio iónico sobre resinas de intercambio aniónico de base débil del tipo DE[Xi]AE seguido por cromatografía de afinidad sobre resina que tiene un derivado antraquinona como ligando.

El documento WO 00/63248 (Instituto Massone SA) divulga un proceso para la purificación de gonadotropinas, que incluyen FSH, de orina humana. El proceso implica las siguientes etapas: cromatografía de intercambio de iones con una fuerte resina catiónica del tipo sulfopropilo, cromatografía de intercambio de iónico con una fuerte resina aniónica, y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

Chiba et al [Isolation and partial characterisation of LH, FSH and TSH from canine pituitary gland; Endocrinol. J., 1997, 44, 205-218] divulga una técnica para purificar gonadotropinas de pituitaria canina, que incluyen FSH, que utilizan cromatografía de afinidad de concavalina (Con) A, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y cromatografía de ion inmovilizado con Cu⁺⁺.

El documento WO 88/10270 (Istituto di Ricerca Cesare Serono SPA) describe un método para purificar FSH humano a partir de orina. El proceso implica inmunocromatografía con anticuerpos monoclonales de inmovilizado específicos FSH unidos a Sefarosa 4B mediante sulfona Divinilo, seguido por HPLC de fase inversa.

5 El documento EP 1 106 623 A1 divulga un método para purificar FSH a partir de muestras biológicas por ejemplo de glándulas pituitarias humanas u orina posmenopáusica humana mediante el uso de cromatografía de afinidad de tinte.

Procesos para la purificación de FSH recombinante se divulgan en los documentos WO 2005/063811 A1, WO 2006/051070 A1, WO 2007/065918 A2y WO 2009/000913 A1.

10 El documento WO 2009/000913 A1 divulga un clon de célula que produce FSH, un método para producir FSH utilizando el clon de célula y purificar el FSH recombinante obtenido a partir de sobrenadante de cultivo celular. La purificación se puede realizar mediante uno o más de las etapas conocidas por el experto, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxiapatita, cromatografía de afinidad y filtración de gel.

15 El documento WO 2005/063811 A1 divulga un método para purificación de FSH recombinante utilizando las etapas (1) cromatografía de intercambio iones, (2) cromatografía de ion de metal inmovilizado y (3) cromatografía de interacción hidrófoba.

El documento WO 2006/051070 A1 divulga un método para la purificación de FSH recombinante utilizando las etapas (1) cromatografía de afinidad de tinte, (2) cromatografía de interacción hidrófoba y (3) cromatografía de fase inversa, que se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

20 El documento WO 2007/065918 A2 divulga un método para la purificación de FSH recombinante utilizando las etapas (1) cromatografía de afinidad de tinte (2) cromatografía de intercambio aniónico, (3) cromatografía de interacción hidrófoba y (4) cromatografía de intercambio de anión fuerte, que se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

El objeto de la presente invención es por lo tanto proporcionar un proceso de purificación preferiblemente eficiente en costes que produce glucoproteínas tal como FSH en alto rendimiento y pureza.

25 De acuerdo con lo anterior la presente invención se refiere a un proceso de purificación para glucoproteínas tal como FSH que comprende someter un líquido que contiene la glucoproteína a las siguientes etapas:

a) cromatografía de fase inversa (RPC);

b) cromatografía de exclusión de tamaño (SEC); y

c) cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); en el que las etapas se realizan en la secuencia de cromatografía de fase inversa, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de interacción hidrófoba.

30 El proceso de purificación puede comprender opcionalmente las etapas de, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico tal como la cromatografía de intercambio de aniones o cromatografía de intercambio cationes, cromatografía de afinidad tal como cromatografía de afinidad de tinte, cromatografía de afinidad inmunitaria, cromatografía de afinidad de lectina o cromatografía de afinidad de perborato, filtración tal como diafiltración, ultrafiltración o nanofiltración, y/o por lo menos una etapa de inactivación vírica. En una realización preferida el proceso de la presente invención incluye una cromatografía de intercambio de aniones (AEX) tal como la cuarta etapa de cromatografía.

35 Realizar el RPC como primera etapa de cromatografía proporciona la opción para cargar líquidos biológicos "brutos" tal como glucoproteína cruda, líquidos de frente natural, medios de cultivo celular o lisatos celulares directamente sobre el RPC, opcionalmente después de depuración (por ejemplo, filtración), concentración y/o etapa de intercambiado de regulador como se describió adelante. Esta realización proporciona la ventaja de que cuando se utilizan dichos líquidos de muestra se pueden cargar grandes cantidades de la en la columna de cromatografía sin peligro de sobrecargar o atascar la columna. Adicionalmente, las condiciones de regulador requeridas para RPC no conducen a agregación excesiva de componentes de la solución de muestra. En resumen, utilizar RPC como primera etapa de cromatografía reduce el número de etapas de preparación que son necesarias antes de empezar la purificación cromatográfica y permite el uso de grandes cantidades de solución de muestra con altas cantidades de otros componentes independiente de la glucoproteína de interés.

En otra realización preferida se realiza una cromatografía (d) de intercambio de aniones posterior a la cromatografía (2) de exclusión de tamaño y antes de la cromatografía (3). de interacción hidrófoba. Como se describió anteriormente, se pueden realizar etapas adicionales y también entre etapas.

50 El método de purificación de la invención proporciona la glucoproteína tal como FSH de alta pureza, que luego se puede formular como una composición farmacéutica. La pureza en general está por encima del 90%, preferiblemente > 95% p/p, más preferiblemente > 99% p/p, incluso más preferiblemente > 99.5% p/p, con base en la proteína total. Adicionalmente, el método de purificación de la invención también se puede escalar fácilmente incluso a tamaño industrial, sin mayor cambio en las condiciones de purificación.

La glucoproteína cruda que forma el material de partida para los procesos de purificación de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar en u obtener a partir de líquidos de fuentes naturales o mediante técnicas recombinantes tal como por ejemplo cosecha de cultivo celular que contiene la glucoproteína. Normalmente, el material de partida que se obtiene de una fuente natural o cosecha celular, preferiblemente de una cosecha celular, se clarifica primero (por ejemplo, por filtración) y luego se concentra opcionalmente (por ejemplo, mediante ultrafiltración) y/o intercambiado de regulador (por ejemplo, a través de una etapa de diafiltración) antes de ser capturado por la primera etapa cromatográfica.

En las etapas de cromatografía normalmente se utilizan resinas disponibles comercialmente, preferiblemente resinas a base de polímeros o resinas a base de agarosa. También es posible utilizar cromatografía de membrana en la que la resina se reemplaza mediante una membrana funcionalizadas tal como membranas de Sartobind™ (Sartorius) o ChromaSorb™ (Millipore).

Las etapas del proceso de purificación de la presente invención se destacan en lo siguiente en más detalle.

Etapas (a) de cromatografía de fase inversa.

El proceso implica una etapa de cromatografía (a) de fase inversa. En una realización preferida, especialmente en el caso de glucoproteínas recombinantes, se utiliza la cromatografía de fase reversa como etapa de captura en la que la glucoproteína se enriquece, por ejemplo, a partir de líquido de fuente natural o cosecha de cultivo celular. Se prefiere realizar una posterior inactivación de virus hasta elución a partir de la columna RPC.

La "cromatografía de fase de inversa" de acuerdo con la invención en particular se refiere a una etapa de cromatografía en el que se utiliza una fase estacionaria no polar y preferiblemente una fase móvil polar. En la cromatografía de fase inversa, normalmente se eluyen compuestos polares primero mientras se retienen compuestos no polares.

La cromatografía de fase inversa usualmente se realiza al equilibrar y cargar la columna, seguido por un lavado posterior elución, cada uno con un regulador que contiene preferiblemente un disolvente orgánico tal como acetonitrilo o isopropanol. Se puede usar el disolvente orgánico tal como isopropanol para posterior inactivación del virus hasta elución.

El equilibrio, carga, lavado y elución se lleva a cabo preferiblemente al utilizar un regulador de fase móvil en pH medianamente alcalino, por ejemplo, en o aproximadamente pH 7 a 8.5, más preferiblemente en o aproximadamente 7.5. En una realización preferida, la especie de regulación es un regulador de fosfato, preferiblemente fosfato de sodio. Reguladores alternos adecuados para un pH en o aproximadamente 7.5 incluyen BES, MOPS, acetato de amonio, TES, HEPES

Se prefiere que no se realice intercambio de regulador después de la etapa (a) en el caso de que la etapa (b) posteriormente (SEC) se realice. Se puede alcanzar intercambio de regulador posteriormente mediante SEC posterior al utilizar como regulador de serie el regulador preferido para la siguiente etapa de cromatografía tal como cromatografía AEX o HIC.

En una realización preferida de soluciones de regulador para la etapa RPC contiene un disolvente orgánico, cuya concentración se modula para diferentes fases de la etapa de cromatografía (equilibrio, carga, lavado y elución). Preferiblemente el disolvente orgánico es un disolvente orgánico miscible en agua tal como el acetonitrilo o un alcohol (tal como metanol, etanol, etcétera), más preferiblemente isopropanol.

En la solución de regulación de equilibrio y carga y la solución de regulador de lavado el disolvente orgánico está contenido preferiblemente en una cantidad entre 5 y 15% v/v de solución reguladora total, preferiblemente entre 5 y 12% v/v de solución de regulador total. El regulador de lavado es normalmente idéntico al regulador de carga. En la solución de regulador de elución el disolvente orgánico está preferiblemente contenido en una cantidad mayor que en el regulador de carga, preferiblemente en una cantidad entre 15 y 22% v/v de solución de regulador total, más preferiblemente entre 16 y 20% v/v de solución de regulador total.

En realizaciones preferidas, la etapa de cromatografía de fase inversa puede incluir una etapa de inactivación de virus. La inactivación de virus se puede alcanzar al incubar la proteína cargada en, unida a o eluida de la columna en la presencia de un disolvente orgánico, preferiblemente isopropanol o etanol. El tiempo de incubación y la temperatura de incubación se seleccionan preferiblemente con el fin de efectuar un grado deseado de inactivación de virus y en particular depende de la concentración y naturaleza del disolvente orgánico utilizado. Adicionalmente, estos parámetros también se deben ajustar dependiendo de la estabilidad de la glucoproteína que se va a purificar. Por ejemplo, la proteína se incuba durante por lo menos 15 minutos, preferiblemente durante por lo menos 30 min, por lo menos 45 minutos, por lo menos 1 h, por lo menos 2 h, por lo menos 3 h o por lo menos 6 h. La incubación se puede realizar a temperaturas bajas tal como en o por debajo de 4 °C o en o por debajo de 10 °C, o se puede realizar en aproximadamente la temperatura ambiente. La incubación se puede realizar directamente después que se ha cargado la muestra sobre la columna, durante o después de la etapa de lavado, después de aplicar el regulador de elución pero antes de elución de la glucoproteína, o después de elución de la glucoproteína. Si se utiliza isopropanol como el disolvente orgánico, la inactivación de virus se hace preferiblemente en una concentración de isopropanol de por lo menos 15% (v/v), preferiblemente en aproximadamente 18% (v/v). En este caso, la glucoproteína se incuba

referiblemente durante aproximadamente 2 horas, preferiblemente a temperatura ambiente. Preferiblemente, la inactivación del virus se realiza después de elución de la glucoproteína a partir de columna de cromatografía de fase inversa, preferiblemente en el uso de regulador de elución. Sin embargo, opcionalmente se pueden agregar componentes adicionales a la solución de glucoproteína después de elución de la columna, en particular para mejorar la inactivación del virus y/o la estabilidad de la glucoproteína. Utilizar una etapa de inactivación de virus durante el RPC, el proceso de la invención se puede realizar sin ninguna etapa de inactivación de virus adicional. Sin embargo, también se pueden combinar diversas etapas de inactivación de virus, por ejemplo una inactivación de virus durante RPC y una inactivación de virus a través de nanofiltración y/o a través de ajuste de pH como se describe aquí.

En una realización particularmente preferida, los reguladores que contienen producto para la etapa de RPC (equilibrio, carga, lavado, elución) contienen un antioxidante, tal como L-metionina. Antioxidantes alternos incluyen t-butil-4-Metoxifenol, 2, 6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil fenol; bimetabisulfito de sodio o potasio, bisulfito de sodio.

El material de columna de fase inversa se hace de una resina a la que se puede unir el material hidrófobo. El material de columna típico es sílice y poliestireno; los ligandos hidrófobos se pueden unir opcionalmente. En el caso de resinas sustituidas, la resina se sustituye con un ligando hidrófobo, seleccionado normalmente de alifatos (pero no limitado a estos), tal como C₂, C₄, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆ o C₁₈ o derivados de estos, por ejemplo, cianopropilo (CN-propilo), o alifatos ramificados o aromáticos basados en benceno, tal como fenilo, u otros ligandos polares o no polares. El ligando puede ser una mezcla de dos o más de estos ligandos. Las resinas a base de poliestireno adecuadas incluyen, sin limitación, resinas suministradas por Rohm Haas (por ejemplo, Amberlite XAD or Amberchrom CG), Polymer Labs (por ejemplo, PLRP-S), GE Healthcare (e.g. Source RPC), Applied Biosystems (por ejemplo. Poros R). Una resina particularmente preferida es Source 30 RPC (GE Healthcare).

El proceso de fabricación y las características óptimas del material columna requieren frecuentemente que un grupo de enlace también denominado como separador se inserte entre la resina y el ligando. Otros parámetros en los métodos de la presente invención incluyen carga, es decir, cantidad de proteína que se carga a la columna e índice de flujo. Estos parámetros se pueden optimizar a través de experimentos que son conocidos por el experto en la técnica.

La glucoproteína normalmente se carga en la columna en una concentración de por lo menos aproximadamente de 0,1 mg por ml de resina, tal como, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0.2 mg, 0.5 mg, 1 mg, 2 mg, 5 mg, 10, o 20 mg por ml de resina; o en el rango de 0.1-200 mg, tal como, por ejemplo, 0.1-100 mg, 0.5-100 mg, 1-50 mg o 2-30 mg por mL de resina; preferiblemente la carga tiene por lo menos 1 mg por mL de resina. La medición del volumen de resina empacado se hace normalmente en modo de suspensión o en un modo similar.

Etapa (b) cromatografía de exclusión de tamaño

El proceso de la presente invención también implica una etapa de cromatografía (b) de exclusión de tamaño, por ejemplo, para purificación adicional y/o repetición de regulación de la glucoproteína. La cromatografía de exclusión de tamaño comprende la etapa de equilibrar y cargar el eluido de la etapa de cromatografía anterior a una matriz de filtración de gel equilibrada con un regulador que tiene una composición que se desea para almacenamiento o procesamiento adicional de la glucoproteína de un pH de normalmente entre 6.5 y 9, preferiblemente aproximadamente 8.5.

Para realizar la cromatografía de exclusión de tamaño, normalmente selecciona el gel de los grupos de geles poliméricos que incluyen, pero no se limitan a geles a base de dextrano tal como Sephadex (por ejemplo. Sephadex G-25) o geles de poli(acrilamida) tal como Sephacryl (por ejemplo, Sephacryl-S400), geles a base de agarosa tal como Superose o Sepharose (por ejemplo. Sepharose CL-4B), y geles de compuestos preparados a partir de dos tipos de geles tal como Superdex 200 que combina dextrano (Sephadex™) y geles agarosa reticulada agarosa (Superose™).

En una realización preferida el regulador se selecciona del grupo consistente de fosfato de sodio, acetato de amonio, MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico), Bis-Tris (2-bis(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol), ADA (ácido N-(2-Acetamido) iminodiacético), PIPES (piperazino-N, N'-bis (ácido 2 etanosulfónico), ACES (ácido N-(2-Acetamido)-2-aminoetano sulfónico), BES (ácido N, N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetano sulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico), TES (ácido N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminoetano sulfónico), HEPES (ácido N-2-Hidroxietilpiperazino-N'-2-etanosulfónico), preferiblemente fosfato de sodio o acetato de amonio, más preferiblemente acetato de amonio.

Opcionalmente dicho regulador comprende adicionalmente una sal inorgánica, preferiblemente un haluro de un metal alcalino, más preferiblemente cloruro de potasio o cloruro de sodio, más preferiblemente cloruro de sodio, en el que la concentración de dicha sal inorgánica es aproximadamente 0 a 500 mM, preferiblemente aproximadamente 0 a 300 mM, más preferiblemente aproximadamente 0 a 50 mM. En una realización preferida el regulador está libre de sal.

En una realización particularmente preferida, los reguladores que contienen producto para la etapa (b) de la SEC (equilibrado, carga, elución) contienen un antioxidante, tal como L-metionina. Alternativamente los antioxidantes incluyen t-butil-4-Metoxifenol, 2, 6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil fenol; bimetabisulfito de potasio o de sodio, bisulfito de sodio.

La cromatografía de exclusión de tamaño comprende adicionalmente la etapa de eluir la glucoproteína de dicha matriz de filtración gel mediante elución isocrática, es decir, el regulador de elución tiene aproximadamente la misma, preferiblemente la misma composición que el regulador utilizado para equilibrio y/o carga. El flujo pasante se puede registrar mediante absorción UV en 280 nm y se recolecta la fracción que contiene glucoproteína.

5 Etapa (c) de cromatografía de interacción hidrófoba

El proceso de la presente invención también implica una etapa (c) de cromatografía de interacción hidrófoba. La cromatografía de interacción hidrófoba se realiza usualmente al equilibrar y cargar la columna, seguido por un lavado y elución posterior.

10 La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) es un método de separación que toma ventaja de las propiedades hidrófobas de las proteínas. La adsorción se promueve mediante interacciones hidrófobas entre regiones no polares en los ligandos hidrófobos de proteína inmovilizados en dicho soporte sólido. La adsorción se alcanza en altas concentraciones de sal en la fase móvil acuosa y la elución se facilita al reducir la concentración de sal. El material de cromatografía de interacción hidrófoba es una matriz sustituida con ligandos hidrófobos tal como grupos etilo, butilo, fenilo - o hexilo. El material preferido es una matriz sustituida con un ligando butilo o fenilo.

15 Se conocen en la técnica resinas de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) he incluyen resinas tal como butilo Sepharose (GE Healthcare), Phenyl Sepharose (sustitución alta y baja), Octyl Sepharose y alquil Sepharose (todos de GE Healthcare; otras fuentes de resinas HIC incluyen Biosepra, Francia; E. Merck, Alemania; BioRad, EE UU).

20 En una realización preferida, la cromatografía de interacción hidrófoba se lleva a cabo con una resina tal como butil Sepharose HP (que se puede obtener de GE Healthcare). Se entiende que la etapa (c) se puede realizar utilizando resinas alternas, que tiene características similares. Las resinas alternas que se pueden utilizar son como sigue: Toyopearl butil 650M (que se puede obtener Tosoh Biosep Inc.) Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (bajo sub); Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (alto sub); Butilo Sepharose 4 Fast Flow; Octyl Sepharose 4 Fast Flow; Phenyl Sepharose High Performance; Source 15ETH; Source 15ISO; Source 15PHE todos de GE Biosciences (800) 526-3593. Resinas adicionales son: Hydrocell C3 o C4; Fenil Hydrocell de BioChrom Labs Inc. (812) 234-2558; (véase www.biochrom.com).

30 En una realización preferida el regulador de elución y lavado, carga, y equilibrio se selecciona del grupo que consiste de fosfato de sodio, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, BES, MOPS, TES, HEPES, preferiblemente fosfato de sodio. La unión en la resina HIC se alcanza en general al utilizar un regulador de equilibrado y carga con alta conductividad, obtenido por ejemplo a través de la adición de sal como NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o Na_2SO_4 , preferiblemente sulfato de amonio. Las concentraciones de sal preferidas son 1 a 2 M, preferiblemente aproximadamente 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El lavado generalmente utiliza el regulador de carga. La elución en la etapa de cromatografía de interacción hidrófoba se lleva a cabo preferiblemente al reducir la conductividad de la fase móvil (reducir la concentración de sal). La reducción se puede alcanzar en una forma lineal o en forma de etapas.

35 Se prefiere utilizar un regulador de lavado y elución, equilibrio y carga, que tiene un pH en o aproximadamente 6 a aproximadamente 9, preferiblemente en o aproximadamente 7.0 a o aproximadamente 8.5 más preferiblemente en o aproximadamente 7.5. Un sistema de regulador de carga y lavado particularmente preferido, contiene fosfato de sodio y sulfato de amonio preferiblemente en un pH de en o aproximadamente 7.5. Un regulador de elución preferido contiene fosfato de sodio en un pH en o aproximadamente 7.5.

40 En una realización particularmente preferida, los reguladores que contiene producto para la etapa (c) de HIC (equilibrio de carga, lavado, elución) contienen un antioxidante, tal como L-metionina. Antioxidantes alternativos incluyen t-butil-4-Metoxifenol, 2, 6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil fenol; bimetabisulfito de potasio o de sodio, bisulfito de potasio.

Etapas adicionales

45 Para las tres etapas (a), (b) y (c) de cromatografía principal los procesos de la presente invención pueden incluir opcionalmente etapas adicionales conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, etapas de cromatografía, etapas de filtración o etapas de inactivación de virus. Etapas adicionales preferidas son cromatografía de intercambio iónico tal como cromatografía de intercambio aniones o cromatografía de intercambio cationes, cromatografía de afinidad tal como cromatografía de afinidad de tinte, cromatografía de afinidad inmunitaria, cromatografía de afinidad de lectinas o cromatografía de afinidad de perborato, filtración tal como diafiltración, ultrafiltración, nanofiltración o inactivación de virus.

50 Etapa de cromatografía (d) de intercambio de aniones

E una realización preferida el proceso de la presente invención en adición comprende la etapa (d) cromatografía de intercambio de aniones. La cromatografía de intercambio de aniones usualmente se realiza al equilibrar y cargar la columna, seguido por lavado y posterior elución.

55 La cromatografía de intercambio de aniones se lleva a cabo, preferiblemente con una resina de amonio cuaternario, tal como CaptoQ (que se puede obtener de GE Healthcare), o resina que tiene características similares tal como

ToyoPearl QEA (que se puede obtener de Tosoh), Q Sepharose FF (que se puede obtener GE Healthcare), Fractogel EMD, Fractogel TMAE o Fractogel HICAP (que se puede obtener de KGaA, Darmstadt Alemania).

La resina de cromatografía de intercambio de aniones se equilibra preferiblemente, se carga y lava al utilizar un regulador que tiene un pH medianamente alcalino, por ejemplo, en o aproximadamente 7,2 a o aproximadamente 9,0, o en o aproximadamente 8,0 a o aproximadamente 9,0, más preferiblemente en o aproximadamente 8,5. Reguladores adecuados incluyen, por ejemplo, regulador de borato, ácido trietanolamina/iminodiacético, Tris (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol), fosfato de sodio acetato de amonio, Tricina (N-(Tri(hidroximetil)metil) glicina), ácido bicino (2 - (bis (2-hidroxietil) amino))etanoico, TES, HEPES, TAPS (ácido N-Tris (hidroximetil) metil-3-aminopropanosulfónico). El más preferido es acetato de amonio, en un pH de en o aproximadamente 8,5.

La elución de la resina de intercambio iónico se alcanza al aumentar la conductividad de la fase móvil a través de la adición de sal, preferiblemente NaCl. Reguladores adecuados incluyen, por ejemplo, regulador de borato, ácido trietanolamina/iminodiacético, Tris, acetato de amonio, Tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. Se prefiere acetato de amonio.

La cromatografía de intercambio de aniones se puede utilizar para eluir selectivamente diferentes isoformas que se originan principalmente de niveles de sulfatación y/o sialilación diferentes y de grupos funcionales glucano de la glucoproteína.

Las glucoproteínas son constituyen de una estructura principal de péptidos y oligosacáridos que se unen al grupo OH residuos de serina y/o treonina en una forma ligada a O y/o unida al grupo amida de asparragina en una forma ligada a N. Las estructuras de oligosacáridos frecuentemente terminan con ácido neuramínico de oligosacáridos cargados negativamente (también denominado ácido siálico).

La actividad in vivo de productos de glucoproteína parece estar influenciado por el grado sialilación de la galactosa terminal. Por ejemplo, De Leeuw et al (1996, Mol Hum Reprod. 1996 May;2(5):361-9) demostró que las isoformas FSH con alto contenido de ácido siálico ejercen mayor actividad específica que aquellas con menor contenido de ácido siálico debido a una prolongada vida media circulante. Sin embargo, las isoformas FSH tienen un menor contenido de ácido siálico que muestran una mayor actividad de unión de receptor. Por lo tanto, para aplicaciones específicas de FSH, se pueden requerir diferentes isoformas con diferentes grados de sialilación.

El término "isoformas", como se utiliza aquí, se refiere a una preparación/fracción de glucoproteína que contiene glucoproteínas que tienen secuencia de aminoácidos idéntica o muy similar y un punto isoeléctrico común pero que puede diferir con respecto al alcance, a la complejidad, a la naturaleza, a la antenaridad y al orden de los grupos siálico y galactosilo unidos. Una isoforma de acuerdo con la invención también puede comprender múltiples formas de glucoproteína de la misma secuencia de aminoácidos una a secuencia de aminoácidos muy similar y punto isoeléctrico que difiere adicionalmente en otras modificaciones que llevan carga tal como acetilación y sulfatación. El término "secuencia de aminoácidos muy similar" indica que la secuencia de aminoácidos de una proteína también comprende aquellas secuencias que son funcionalmente equivalentes a la secuencia de aminoácidos tipo natural y de esta manera, ejerce la misma función. En particular, "secuencia de aminoácidos muy similar" comparte una homología de secuencia, preferiblemente una identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácido de referencia de por lo menos 70%, preferiblemente por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, más preferiblemente por lo menos 98%, sobre un tramo de aminoácidos consecutivos que representan por lo menos 50%, preferiblemente por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, más preferiblemente 100% de la secuencia de aminoácidos de referencia completa.

de esta manera, las isoformas de glucoproteína se pueden definir preferiblemente mediante punto isoeléctrico y secuencia de aminoácidos y cada una de dichas isoformas definidas puede comprender actualmente múltiples isoformas en el sentido químico estricto (moléculas que tiene la misma composición atómica, pero difieren en su estructura espacial). En particular, el punto isoeléctrico de diferentes glucoproteínas de la misma isoforma preferiblemente no difiere en más de 2 unidades, más preferiblemente no más de 1 unidad, no más de 0,5 unidades o no más de 0,2 unidades, y más preferiblemente el punto isoeléctrico no difiere en más de 0,1 unidades.

Para la elución selectiva de isoformas cargadas en forma diferente tal como isoformas sialiladas diferentemente se prefiere utilizar dos o más, preferiblemente dos reguladores A y B de elución, que diferencian en pH y/o contenido de sal, cada uno de ellos se basa en por ejemplo, acetato de amonio, regulador de borato, ácido trietanolamina/iminodiacético, Tris, fosfato de sodio, acetato de amonio, Tricina, bicina, TES, HEPES o PAPS, se prefiere acetato de amonio. Utilizando diferentes reguladores de elución, se puede realizar elución en una forma de etapas, primero utilizando un regulador de elución y luego utilizando otro regulador de elución, opcionalmente también utilizando una o más etapas de elución intermedias con diferentes mezclas de reguladores de elución. Alternativamente o adicionalmente, se puede realizar elución utilizando un gradiente, partiendo con una primera relación de mezcla de los reguladores de elución (por ejemplo 100% del primer regulador de elución) y cambiando gradualmente a una segunda relación de mezcla de los reguladores de elución (por ejemplo, 100% del segundo regulador de elución).

El regulador de elución utilizado primero (regulador A) en general, puede ser A) un regulador medianamente ácido que está libre de sal, o b) un regulador neutro o medianamente básico con bajo contenido de sal tal como NaCl (preferiblemente entre 20 y 200 mM). El regulador A se puede utilizar para eluir glucoproteína de baja carga, por ejemplo, bajo grado de sialilación. En la variante A) el regulador A tiene un pH por ejemplo, en o aproximadamente 3.0 a o aproximadamente 6.5, o en o aproximadamente 4.0 a o aproximadamente 6.0, más preferiblemente en o aproximadamente 5. En la variante b) el regulador A tiene un pH de o aproximadamente 7.0 a 9.0, preferiblemente 8.5.

El segundo regulador de elución utilizado (regulador B) en general es un regulador ligeramente alcalino que contienen sal de un mayor contenido de sal que el regulador A que se puede utilizar para eluir glucoproteína de alta carga, por ejemplo, sialilación de alto grado. El regulador B tiene un pH por ejemplo, en o aproximadamente 7.0 o en aproximadamente 9.0 o en aproximadamente 8.0 o en aproximadamente 9.0, más preferiblemente en o aproximadamente 8.5. La sal es preferiblemente NaCl. El contenido de sal en el regulador B es preferiblemente de 200 mM a 1 M.

Utilizando diferentes reguladores de elución y un gradiente de elución en forma de etapas, las isoformas de glucoproteína diferentes cargadas sobre la columna de cromatografía de intercambio de aniones eluirá en diferentes fracciones dependiendo de su carga. Por ejemplo, la glucoproteína que se va a purificar puede estar presente en las fracciones de flujo, es decir, se une a la columna de cromatografía de intercambio de aniones solo débilmente o en lo absoluto, se pueden eluir con el primer regulador de unión, en una relación de mezcla específica del primero y segundo regulador de elución, o con el segundo regulador de elución. Las fracciones de glucoproteína que se utilizan para las etapas de purificación adicionales y de esta manera, las isoformas de glucoproteína que se van a purificar, dependerán principalmente de las aplicaciones deseadas de la glucoproteína. Las otras isoformas de glucoproteína que no son de interés se pueden eliminar utilizando la etapa de cromatografía de intercambio de aniones. Con respecto al FSH, por ejemplo sólo el FSH que tiene un alto grado de sialilación, y de esta manera que tiene una alta circulación de vida media, o solamente se puede purificar FSH tienen un bajo grado de sialilación y de esta manera, tiene una alta actividad de unión de receptor.

En una realización particularmente preferida los reguladores que hacen contacto con el producto para la cromatografía de intercambio de iones (equilibrio, lavado y elución) contiene un antioxidante, preferiblemente L-metionina. Los antioxidantes alternativos se mencionaron anteriormente.

Como una alternativa o adicionalmente a la cromatografía de intercambio de aniones estándar, se puede realizar cromatoenfoco. El cromatoenfoco es una técnica cromatografica que separa las proteínas de acuerdo con las diferencias en su punto isoelectrico (pI). En particular, se puede utilizar una fase estacionaria cargada y las proteínas cargadas en la columna de cromatoenfoco se pueden eluir utilizando un gradiente de pH. Por ejemplo, la fase estacionaria se puede cargar positivamente y el gradiente de pH se puede desarrollar a partir de un primer pH a un segundo, menor pH, por ejemplo, de aproximadamente pH 9 a aproximadamente pH 6 o de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 4. Debido a las condiciones específicas del cromatoenfoco, las proteínas eluyen con el fin de que sus puntos isoelectricos y preferiblemente las proteínas de un pI específico se enfocan en bandas angostas. Esto, como proteínas a un mayor pH que su pI se cargan negativamente y se unen a la fase estacionaria cargada positivamente, que por lo tanto se hacen lentas. Cuando el pH en el gradiente de elución alcanza el pI de la proteína, es generalmente neutro en carga y de esta manera migra con el flujo de la fase móvil. En un pH más bajo que el pI de la proteína, la proteína se rechaza por la fase estacionaria debido a su carga positiva, acelerándola de esta manera. Por lo tanto, las proteínas en la parte posterior de una zona migrarán más rápidamente que aquellas en la parte delantera, formando gradualmente bandas de proteínas más angostas. En esta configuración, la proteína con el pI más alto eluye primero y la proteína con el pI más bajo eluye de ultimo.

Las fases estacionariamente adecuadas son, por ejemplo, medios sustituidos con aminos de regulación, cargadas, tal como Mono P (que se puede obtener de GE Healthcare) u otro material de cromatografía de intercambio aniónico. Para formar el gradiente de pH para elución, los sistemas de regulación tales como Polybuffer 74 y Polybuffer 96 (que se puede obtener de GE Healthcare) se pueden utilizar. Equilibrar, cargar y lavar la columna se puede utilizando cualquier condición en donde la glucoproteína de interés y/o cualquier impureza se unen al material de columna. Por ejemplo, se puede utilizar las condiciones como se describió anteriormente para la cromatografía de intercambio de aniones. Cuando se utiliza un gradiente de pH decreciente, preferiblemente un regulador tiene un pH igual a o mayor que el pH de partida del gradiente de elución utilizado para equilibrado, carga y/o lavado. Cuando se utiliza un gradiente de pH creciente, preferiblemente un regulador que tiene un pH igual o menor que el pH de partida del gradiente de elución se utiliza para equilibrio, carga y/o lavado.

Preferiblemente, para equilibrio, carga y lavado, se utiliza un regulador similar a aquel utilizado al inicio del gradiente de pH de elución.

Proceso general

Las etapas de cromatografía de fase inversa, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio de aniones siguen el orden de

(1) cromatografía de fase inversa, (2) cromatografía de exclusión de tamaño, (3) cromatografía de intercambio de aniones, (4) cromatografía de interacción hidrófoba. Opcional se encuentra una concentración posterior y/o etapa (5) de intercambio de regulador de ultrafiltración y/o diafiltración, y la etapa (6) de nanofiltración.

En realizaciones preferidas, el proceso para la purificación de una glucoproteína de acuerdo con la invención no comprende una cromatografía de inmutafinidad y/o una cromatografía de intercambio de cationes. Más preferiblemente, el proceso de acuerdo con la invención no compromete ninguna etapa cromatográfica adicional salvo aquellas descritas aquí. El proceso de acuerdo con la invención comprende preferiblemente sólo tres etapas cromatográficas, es decir, una cromatografía de fase inversa, una cromatografía de exclusión de tamaño y una cromatografía de interacción hidrófoba, o sólo cuatro etapas, es decir, una cromatografía de fase inversa, una cromatografía de exclusión de tamaño, una cromatografía de intercambio de aniones y una cromatografía de interacción hidrófoba. La cromatografía de intercambio de aniones también se puede remplazar por una etapa de cromatoenfoco como se describió anteriormente.

Sin embargo, etapas no cromatográficas adicionales, preferiblemente aquellas descritas aquí, se pueden realizar adicionalmente a y también entre las etapas definidas. Preferiblemente, estas etapas adicionales incluyen etapas para disminuir o inactivar sustancias peligrosas o indeseadas tales como bacterias, virus, ácidos nucleicos o proteínas priones, por ejemplo, filtración estéril, nanofiltración, adsorción y/o etapas de activación de pH. En realizaciones alternas, a pesar de las etapas descritas anteriormente, el proceso de acuerdo con la invención puede comprender etapas cromatográficas para disminuir o inactivar sustancias peligrosas o indeseadas, que incluyen por ejemplo cromatografía de adsorción. Preferiblemente, los procesos de purificación de la invención comprenden por lo menos uno, más preferiblemente por lo menos dos, más preferiblemente por lo menos tres etapas de inactivación o disminución de virus. Ha este respecto, también las etapas de cromatografía del proceso de purificación de acuerdo con la invención, en particular la etapa (b) de cromatografía de exclusión de tamaño, se pueden utilizar como etapa de disminución de virus en razón a que normalmente separan los virus de la glucoproteína. Por ejemplo, virus y partículas similares a virus tienen un tamaño mucho más grande en comparación con las glucoproteínas y de esta manera, se separan efectivamente de estas durante cromatografía de exclusión de tamaño.

Adicionalmente, el proceso de acuerdo con la invención preferiblemente no comprende una etapa de intercambio de regulador directamente antes de y/o directamente después de la cromatografía de exclusión de tamaño. En particular, si se realiza el proceso en el orden de (1) cromatografía de fase inversa, (2) cromatografía de exclusión de tamaño, opcional (3) cromatografía de intercambio de aniones y (4) cromatografía de interacción hidrófoba, preferiblemente no hay intercambio de regulador entre la cromatografía de fase inversa y la cromatografía de exclusión de tamaño y/o entre la cromatografía de exclusión de tamaño y la cromatografía de intercambio de aniones o la cromatografía de interacción hidrófoba.

Otras etapas

Antes de la primera etapa de cromatografía de cromatografía de fase inversa, puede ser deseable llevar a cabo una etapa de ultrafiltración, con el fin de concentrar la glucoproteína cruda. Adicionalmente, se puede realizar una etapa de diafiltración antes de la primera etapa de cromatografía con el fin de realizar un intercambio de regulador. La etapa de ultrafiltración y la etapa de diafiltración se pueden realizar simultáneamente o secuencialmente. La ultrafiltración y/o diafiltración se lleva a cabo preferiblemente utilizando una membrana que tiene un corte en o aproximadamente 3 -30 kD, más preferiblemente en o aproximadamente 10 kD. Sin embargo, la presente invención también abarca procesos de purificación en el que no se realiza etapa de ultrafiltración y/o etapa de diafiltración antes de la primera etapa de cromatografía.

En una realización preferida, después de una o más de las etapas de cromatografía (particularmente después de la última etapa de cromatografía), la muestra de glucoproteína se somete a una etapa de ultrafiltración y/o diafiltración. Preferiblemente la ultrafiltración y/o diafiltración se realiza con el fin de obtener un volumen que tiene la composición deseada. La ultrafiltración (y/o diafiltración) se lleva a cabo preferiblemente utilizando una membrana que tiene un corte en o aproximadamente 3 -30 kD, más preferiblemente en o aproximadamente 10 kD. Se prefiere realizar durante ultrafiltración y/o diafiltración un intercambio de regulador a un regulador pre formulación, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste de fosfato de sodio, citrato de sodio, MES Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, BES, MOPS, TES, HEPES, preferiblemente fosfato de sodio, preferiblemente estabilizantes que contiene fosfato de sodio por ejemplo sacarosa y antioxidantes similares a L-metionina. El pH preferiblemente está en el rango de 6.5 a 7.5, más preferiblemente aproximadamente 7.0 a 7.1.

Etapas adicionales opcionales que se pueden realizar en el proceso de purificación de acuerdo con la invención incluyen una o más etapas de filtración estéril. Estas etapas se pueden utilizar para remover contaminantes biológicos tales como células eucariotas y/o procariotas, en particular bacterias y/o virus. Preferiblemente, estas etapas realizan en o cerca al final del proceso de purificación para evitar contaminación adicional después de la etapa de filtración estéril. Para eliminación de bacterias u otras células, el filtro utilizado para filtración estéril tiene preferiblemente un tamaño de poro de 0,22 µm o menos, preferiblemente 0.1 µm o menos. Para la eliminación de virus o partículas similares a virus, se puede realizar una etapa de nanofiltración como se describe a adelante.

Otra etapa adicional que se puede realizar en el proceso de purificación de acuerdo con la invención es una etapa de inactivación de virus a través de incubación de glucoproteína en un pH específico. Por ejemplo, la glucoproteína se incuba en un pH de 4.0 o menos, preferiblemente aproximadamente pH 3.6. El tiempo de incubación preferiblemente es por lo menos 15 min, por lo menos 30 min, por lo menos 60 min, por lo menos 90 min, por lo menos 2 h, por lo menos 3 h o por lo menos 6 h. La incubación se puede realizar a una temperatura baja tal como 10 °C o menos o 4 °C o menos, o aproximadamente a temperatura ambiente. Por ejemplo, el material de glucoproteína se puede incubar en un pH de aproximadamente 3.6 durante por aproximadamente 90 min en aproximadamente temperatura ambiente. Esta etapa de inactivación de virus se puede realizar en cualquier momento durante el proceso de purificación y preferiblemente se realiza después de la última etapa de cromatografía.

10 En una realización preferida, el proceso de la presente invención comprende las siguientes etapas en el orden mostrado adelante:

(0) Ultrafiltración (opcionalmente una etapa diafiltración adicional; preferiblemente con una membrana que tiene un corte de en o aproximadamente 10 kD);

(1) Cromatografía de fase inversa (RPC) (preferiblemente utilizando una columna Source 30 RPC);

15 (1a) Ultrafiltración (preferiblemente con una membrana que tiene un corte de en o aproximadamente 10 kD);

(2) Cromatografía de exclusión de tamaño (preferiblemente utilizando una columna Superdex 200);

(3) Cromatografía de intercambio de aniones (preferiblemente utilizando una columna CaptoQ);

(4) Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (preferiblemente utilizando una columna butil HP);

(5) Ultrafiltración y/o diafiltración (preferiblemente con una membrana que tiene un corte de 10 kD).

20 Puede ser deseable someter la muestra de glucoproteína a una etapa de nanofiltración, en particular como una etapa de depuración de virus; es decir, reducir el riesgo de contaminación de la preparación de glucoproteína con virus o partículas similares a virus que se originan de cultivos de células. La nanofiltración se puede realizar en cualquier etapa del proceso de purificación, sin embargo, se prefiere particularmente llevar a cabo nanofiltración después del final del procedimiento cromatográfico. La nanofiltración se puede realizar más de una vez, por ejemplo, se puede realizar dos veces. Dispositivos de nanofiltración preferidos tienen un tamaño de poro aproximadamente 15 y 20 nm.

En otra realización preferida, el método de la invención comprende de esta manera las siguientes etapas en los órdenes mostrados adelante:

(0) Ultrafiltración (preferiblemente con una membrana que tiene un corte de en o aproximadamente 10 kD);

(1) Cromatografía de fase inversa (RPC) (preferiblemente utilizando una columna Source 30 RPC);

30 (1a) Ultrafiltración (preferiblemente con una membrana que tiene un corte en o aproximadamente 10 kD);

(2) Cromatografía de exclusión de tamaño (preferiblemente utilizando una columna Superdex 200);

(3) Cromatografía de intercambio de aniones (preferiblemente utilizando una columna CaptoQ);

(4) Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (preferiblemente utilizando una columna butil HP);

(5) Ultrafiltración y/o diafiltración (preferiblemente con una membrana que tiene un corte de 10 kD).

35 (6) Nanofiltración (preferiblemente que incluye depuración de virus).

Los procesos de purificación específica descritos anteriormente se realizan preferiblemente sin incluir ninguna etapa de cromatografía adicional, etapas de ultrafiltración y/o etapas de diafiltración. Sin embargo, en realizaciones particulares, el proceso de purificación descrito anteriormente puede comprender etapas adicionales, en particular una o más etapas adicionales descritas, por ejemplo, aquellas utilizadas para eliminar o inactivar sustancias peligrosas y/o indeseadas.

Se prefiere que un antioxidante o un aminoácido o dipéptido con un antioxidante y un efecto secuestrante se incluyan en algunas o todas las etapas del método de purificación de acuerdo con la presente invención. Más específicamente el antioxidante está presente en cualquiera de los reguladores utilizados para purificar y/o concentrar y/o filtrar la glucoproteína tal como FSH. El antioxidante previene la oxidación de las glucoproteínas tal como FSH. El antioxidante evita la oxidación de la glucoproteína tal como FSH durante proceso. Un antioxidante preferido es L-metionina. Preferiblemente, se utiliza L-metionina en una concentración de o aproximadamente 0.1 a 10 mM. Ejemplos adicionales de un antioxidante incluyen t-butil-4-metoxi-fenol, 2, 6-bis(1,1-dimetil-4-metil fenol); bimetab-sulfito de potasio o sodio, bisulfito de sodio. Ejemplos de aminoácidos y dipéptidos libres con antioxidantes y efecto secuestrante son histidina, taurina, glicina, alanina, carnosina, anserina, 1-metilhistidina o combinaciones de los mismos.

Una ventaja de la presente invención es que el proceso de purificación es altamente efectivo, reduce el número de etapas cromatográficas a un mínimo de 3 etapas cromatográficas o incluye un enriquecimiento de moléculas de glucoproteína altamente sialilada a un mínimo de 4 etapas cromatográficas. En particular, utilizando el proceso de purificación de acuerdo con la invención, las etapas de purificación problemáticas e intensivas en costes tal como en particular etapas de purificación de afinidad, especialmente etapas de purificación de inmutafinidad, llegan a ser innecesarias y se pueden evitar. El proceso proporciona un alto grado de pureza de glucoproteína y bioactividad específica > 90%, preferiblemente > 98%, más preferiblemente > 99% p/p, cada uno basado en la proteína total según se mide, por ejemplo, por HCP-ELISA. Adicionalmente, los procesos de purificación de acuerdo con la invención proporcionan una recuperación sorprendentemente alta de la glucoproteína de interés presente en el material de partida.

Glucoproteínas

Las glucoproteínas son proteínas que contienen cadenas de oligosacáridos (glucanos) unidos covalentemente a cadenas laterales de polipéptidos. Las glucoproteínas pueden comprender uno o más glucanos que preferiblemente se acoplan a un átomo de nitrógeno (N-glucosilación) o un átomo de oxígeno (O-glucosilación) del polipéptido. De esta manera, la glucoproteína puede ser N-glucosilada o O-glucosilada. Preferiblemente, las glucoproteínas comprenden glucanos naturales. Sin embargo, el término "glucoproteína" comprende proteínas o polipéptidos que tienen glucanos naturales y/o glucanos no naturales, en particular glucanos producidos sintéticamente y/o glucanos que comprenden unidades de monosacáridos no naturales o modificadas.

La glucoproteína que se va a purificar se selecciona preferiblemente del grupo de gonadotropinas tales como FSH (hormona de estimulación de folículo), LH (hormona luteinizante), CG (gonadotropina coriónica) y TSH (hormona de estimulación de tiroides) que incluye todas las isoformas y variantes de las mismas. Los términos "glucoproteína", "FSH", "CG", "LH" y "TSH" como se utiliza en esta solicitud siempre incluye todas las isoformas y variantes de la glucoproteína, especialmente aquellas descritas adelante y bajo la etapa (d) (AEX) anterior. El término "gonadotropina" de acuerdo con la invención se refiere preferiblemente a gonadotropinas naturales como FSH, CG, LH, y TSH, pero también a versiones recombinantes de las mismas, así como a cualquier isoforma, variante y análogos de la mismas. Preferiblemente, las isoformas, variantes y análogos de gonadotropinas presentan una o más actividades biológicas de las gonadotropinas naturales. Sin embargo, el proceso de purificación de una glucoproteína de acuerdo con la invención también es adecuado para purificar otras glucoproteínas tal como, por ejemplo, eritropoyetina, diversos anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, factores de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos, y activadores de plasminógeno de tejidos.

Almacenamiento/liofilización

La composición líquida resultante del proceso de purificación como se describe anteriormente y que contiene glucoproteínas purificadas se puede congelar para almacenamiento como es, o después de purificación, el eluato se puede someter a liofilización ("secado por congelamiento") para retirar el disolvente. El producto liofilizado o líquido resultante se denomina "volumen de glucoproteína".

Formulaciones

La glucoproteína de la invención o purificada de acuerdo con el método de la invención se puede formular para cualquier tipo de administración, preferiblemente para inyección, ya sea intramuscular o subcutánea, preferiblemente subcutánea. La formulación de glucoproteínas se puede secar por congelamiento, en cuyo caso se disuelve en agua para inyección justo antes de inyección. La formulación de glucoproteína también puede ser una formulación líquida, en cuyo caso se puede inyectar directamente, sin disolución previa. La formulación puede contener excipientes conocidos y estabilizantes y puede comprender adicionalmente antioxidantes y/o surfactantes. La formulación de glucoproteína puede ser de una sola dosis o múltiples dosis. Si es de múltiples dosis, preferiblemente debe contener un agente bacteriostático, tal como, por ejemplo, alkilparabeno, alcohol bencílico, meta-cresol, timol o fenol, preferiblemente metilparabeno o meta-cresol. Las formulaciones de dosis única también pueden comprender un agente bacteriostático. Formulaciones adecuadas se describen por ejemplo en los documentos WO 2004/087213, WO 00/04913, WO 2007/092829 y EP 0 853 945, incorporadas aquí por referencia.

La glucoproteína de la invención se puede formular sin excipientes y estabilizantes conocidos, por ejemplo, sacarosa y manitol. También puede comprender un antioxidante, tal como metionina. Adicionalmente puede comprender un surfactante, tal como TWEEN (preferiblemente TWEEN 80), Pluronic (preferiblemente Pluronic F68).

En una formulación multidosis particularmente preferida, la glucoproteína producida por el método de la invención se formulada al disolverla en agua para inyección con sacarosa, regulador de fosfato (pH 6.5 a 7.5), Pluronic F68, la metionina y un agente bacteriostático.

Indicaciones

La glucoproteína de la invención es adecuada para uso en todos los tratamientos en donde la glucoproteína se indica. Por ejemplo, el FSH es particularmente adecuado para la administración subcutánea en inducción de ovulación, hiperestimulación ovárica controlada para tecnologías reproductivas asistidas, y en el tratamiento de oligospermia. Se

puede utilizar en conjunto con otras gonadotropinas, tal como LH y CG. También se puede utilizar con compuestos adicionales que aumentan la respuesta al FSH, tal como citrato de clomifeno, inhibidores de aromataza, tal como anastrozol, letrozol, Fadrozol y YM-511. Adicionalmente, también se puede utilizar LH y CG solos en el tratamiento de fertilidad.

5 Glucoproteínas recombinantes

El uso del término “recombinante” se refiere a preparaciones de glucoproteínas tal como FSH que se producen a través del uso de tecnología de ADN recombinante. Un ejemplo de un método para expresar una glucoproteína que utiliza tecnología recombinante es la transfección de una célula anfitriona adecuada, preferiblemente una célula anfitriona eucariota, con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica la glucoproteína de interés. Usualmente, el vector de expresión lleva un promotor fuerte que dirige la expresión de la glucoproteína, por ejemplo, CMV o SV40 y un marcador de selección adecuado para la seleccionar las células anfitrionas que tienen incorporado el vector. La transfección puede ser estable o transitoria. Los sistemas de expresión recombinante adecuados son bien conocidos en la técnica y de esta manera no necesitan descripción detallada. Preferiblemente, la célula anfitriona eucariótica se selecciona de células de primate, preferiblemente células de humanas y células de roedores, preferiblemente células CHO. Para expresión recombinante de FSH, las células anfitrionas eucarióticas se transfectan con secuencias de ADN que codifican una subunidad alfa y beta de FSH, ya sea proporcionada en un vector o en dos vectores con cada subunidad que tiene un promotor separado, como se describe en las patentes Europeas No. EP 0 211 894 y EP 0 487 512. El ADN que codifica el FSH puede ser un cADN o puede contener intrones.

Otro ejemplo del uso de la tecnología recombinante para producir FSH es mediante el uso de recombinación homóloga para insertar un segmento regulador heterólogo en conexión operativa a secuencias endógenas que codifican una o ambas de las subunidades de FSH, como se describe en la patente Europea No. EP 0 505 500 (Applied Research Systems ARS Holding NV). También se contemplan métodos tales como aquellos divulgados en el documento WO 99/57263 (Transkaryotic Therapies), en el que una de las subunidades es heterológamente insertada en una célula, y la otra subunidad se expresa mediante activación de secuencias genómicas por inserción de un segmento regulador heterólogo por recombinación homóloga. El método de la invención se puede utilizar para purificar FSH expresado utilizando cualquiera de estos métodos y otros métodos.

Los procesos de purificación de acuerdo con la invención son útiles para purificación glucoproteínas naturales, así como recombinantes, que incluyen isoformas y variantes de las mismas. Las isoformas de glucoproteínas se refieren preferiblemente a isoformas como se definió anteriormente. El término “variante” abarca preferiblemente glucoproteínas derivadas de una glucoproteína natural, tal como formas mutantes de las mismas, proteínas de fusión de las mismas, fragmentos de estas y/o glucoproteínas que tienen diferente patrón de glucosilación. También se comprenden compuestos imitadores de glucoproteínas, que incluyen proteínas que comprenden estructuras glucomiméticas y/o estructuras peptidomiméticas. Preferiblemente, las variantes de glucoproteínas y/o isoformas presentan una o más actividades que son cualitativamente y/o cuantitativamente similares o idénticas a aquellas de la glucoproteína natural.

La expresión “variante de glucoproteínas” tal como “variante FSH” significa que abarca aquellas moléculas que difieren en secuencia de aminoácidos, número de sitios de glucosilación (que incluyen sitios de glucosilación adicionales o eliminados) o en conexión de intersubunidad de una glucoproteína humana, pero que exhibe una o más de sus actividades. Ejemplos de variantes FSH incluyen CTP-FSH, un FSH recombinante modificado de larga duración, que consiste de la subunidad [alfa] tipo natural y la subunidad [beta] en la que el péptido de terminal de carboxi hCG se ha fusionado al terminal C de la subunidad [beta] del FSH, como se describe en LaPolt et al.; Endocrinology; 1992, 131, 2514-2520; or Klein et al.; Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist; Human Reprod. 2003, 18, 50-56]. También se incluye un CTP-FSH de cadena simple, una molécula de cadena simple, que consiste de la siguiente secuencia (del terminal N al terminal C):

[beta]FSH, [beta]hCG CTP (113-145), [alfa]FSH

En el que FSH [beta] significa la subunidad [beta] de FSH, hCG CTP [beta] (113-145) significa el péptido de terminal de carboxi de hCG y FSH [alfa] significa la subunidad [alfa] de FSH, como lo describe Klein et al [Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotrophin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey, Fertility & Sterility; 2002, 77, 1248-1255]. Otros ejemplos de variantes FSH incluyen moléculas FSH que tienen sitios de glucosilación adicionales incorporados en la subunidad [alfa] y/o [beta], como se divulga en el documento WO 01/58493 (Maxygen) y moléculas FSH con enlaces S-S de intersubunidad, como se divulga en el documento WO 98/58957. Ejemplos adicionales de variantes FSH incluyen moléculas quiméricas que comprenden secuencias de FSH y secuencias de hCG o LH, tal como aquellas descritas en los documentos WO 91/16922 y WO 92/22568.

Las variantes FSH referidas aquí también incluyen eliminaciones de terminal carboxi de la subunidad beta que son más cortas que la proteína madura de longitud completa. Se entiende que las variantes de terminal carboxi del complejo de forma de cadena beta con una subunidad alfa conocida forman un heterodímero variante FSH. Adicionalmente, las variantes FSH también incluyen proteínas de fusión en la cadena α y la cadena β o partes de las

mismas se combinan en una cadena de polipéptido, preferiblemente que comprende un ligador entre ambas cadenas. En otros ejemplos las proteínas de fusión FSH, una o ambas de las cadenas FSH, se fusionan a un anticuerpo o una parte del mismo tal como un fragmento Fc de un anticuerpo.

5 Las variantes FSH referidas aquí también incluyen FSH de diferentes especies como por ejemplo caballo (*Equus caballus*), cerdo (*Sus scrofa*), vaca (*Bos taurus*), gato (*Felis catus*), perros (*Canis familiaris*).

En una realización preferida, la FSH se produce en forma recombinante, ya sea en un suero o en un medio libre de suero. En otra realización preferida, el FSH purificada producido de acuerdo con el método de la invención es adecuado para administración subcutánea, que permite la auto administración por el paciente.

10 Las variantes de glucoproteína descritas anteriormente con respecto al FSH como glucoproteína de ejemplo en una forma similar también aplican a otras glucoproteínas, cuando es apropiado, en particular a otras gonadotropinas tal como LH, TSH y CG.

15 La expresión "glucoproteína recombinante cruda" se refiere al sobrenadante de cultivo celular de células recombinantes que expresan glucoproteínas, antes que experimente cualquier etapa cromatográfica. La expresión abarca la forma cruda del sobrenadante (como aislado de las células), así como concentrado y/o filtrado o supernadante ultrafiltrado.

Proceso para fabricar glucoproteínas

También se proporciona un proceso para fabricar una glucoproteína de interés al realizar el proceso para la purificación de una glucoproteína descrita aquí. La glucoproteína se puede obtener de fuentes naturales o recombinantemente.

20 En una realización preferida, se proporciona un proceso para fabricar una glucoproteína de interés, que comprende las siguientes etapas:

i) expresar recombinante la glucoproteína de interés;

II) purificar dicha glucoproteína de interés expresada recombinante al someter un líquido que contiene dicha glucoproteína por lo menos a las etapas formadas en la secuencia de:

a) cromatografía de fase inversa,

25 b) cromatografía de exclusión de tamaño, y

c) cromatografía de interacción hidrófoba.

El proceso de fabricación respectivo conduce a la producción de glucoproteínas muy puras que en particular son adecuadas en uso en formulaciones farmacéuticas.

30 Dicho proceso de fabricación comprende preferiblemente por lo menos una o más etapas como se describió anteriormente en conjunto con los procesos de purificación. La divulgación respectiva también aplica al proceso de fabricación de acuerdo con la presente invención y se refiere a la divulgación anterior para evitar repeticiones.

35 Adicionalmente, el proceso de fabricación de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa de formular la glucoproteína de interés en la forma de una formulación farmacéutica. Las formulaciones líquidas o liofilizadas adecuados se conocen en la técnica anterior y se describieron anteriormente, nos referimos a la divulgación respectiva.

Preferiblemente, la glucoproteína de interés que se produce mediante el método de fabricación de acuerdo con la presente invención se selecciona de gonadotropinas, seleccionadas preferiblemente de FSH CG, LH, y TSH.

Sección experimental

El siguiente experimento ilustra el proceso de la presente invención.

40 Etapa 0: ultrafiltración

El FSH crudo forma el material de partida que se deriva de sobrenadantes de cultivo celular que contienen FSH recombinante.

45 Antes de la etapa de ultrafiltración se clarifica el sobrenadante mediante filtración a temperatura ambiente a través de un filtro de profundidad de 2 µm. La ultrafiltración luego se realiza con una membrana que tiene un corte de o aproximadamente 10 kD, con una presión de transmembrana que no excede 1.2 bar.

Etapa 1: Cromatografía de fase inversa (columna Source30 RPC)

Regulador de carga

[0109]: 20 mM Na-fosfato pH 7.5/10% v/v isopropanol (que contiene metionina) regulador de elución: 20 mM Na-fosfato pH 7.5/18% v/v isopropanol (que contiene metionina)

- 5 El material obtenido a partir de la concentración y ultrafiltración (etapa 0) se complementó con isopropanol a una concentración equivalente al regulador de carga. La columna Source30 se equilibra con regulador de carga. Después de cargar el material en la columna se lava el material no unido durante aproximadamente 15CV mediante regulador de carga. El FSH se eluye al aumentar la concentración de isopropanol hasta 18% v/v en el Regulador de Elución (aproximadamente 8CV). El grupo de elución se concentra mediante ultrafiltración para proceder a la siguiente etapa. La etapa se realiza a temperatura ambiente.

RCP	
Columna	Source30 RPC Poliestireno/divinil benceno
Fase unida	ninguno
Forma de glóbulo	Rígido, esférico, poroso, monodisperso
Tamaño de partícula	30 µm
Residencia [min]	1.3
Máximo Flujo lin [cm/h]	500

10 Etapa 1a: ultrafiltración

El eluado de la etapa 1 (RPC) se somete a ultrafiltración a temperatura ambiente con una membrana que tiene un corte de o aproximadamente 10 kD en una presión de transmembrana no excede 1.2 bar y que concentra el eluado a hasta aproximadamente 10% del volumen de columna de SEC.

Etapa 2: Cromatografía de exclusión de tamaño (columna Superdex 200)

15 Regulador de serie: acetato de amonio 15 mM pH 8.5 (que contiene metionina)

El material agrupado de la etapa 1a una se sometió a columna SEC, se equilibró con regulador de serie. El FSH se eluye bajo condiciones isocráticas en un tiempo de retención distinto (aproximadamente 0.6 - 0.7 CV). Esta etapa de cromatografía proporciona purificación y un intercambio de regulador antes de la siguiente etapa. La etapa SEC se realiza a temperatura ambiente.

SEC	
Columna	Superdex 200 Compuesto esférico de agarosa Entrecruzada y dextrano
Altura de lecho	60 cm
Límite de exclusión (M_r)	1.3×10^6 proteínas globulares
Rango de separación (M_r)	10 000-600 000 proteínas globulares
Flujo lin max [cm/h]	120

20

Etapa 3: Cromatografía de intercambio de aniones (columna CaptoQ)

Regulador de carga: 15 mM de acetato amonio pH 8.5 (que contiene metionina)

Regulador de elución A: 15 mM acetato de amonio pH 5 (que contiene metionina)

Regulador de elución B: 15 mM acetato de amonio pH 8.5 (que contiene metionina) – NaCl 0.25 M.

- 25 El material obtenido de la etapa 2 (SEC) se aplica luego a una resina de intercambio de aniones equilibrada con regulador de carga. El material no unido se lava con regulador de carga (aproximadamente 10 CV). El FSH se eluyó

parcialmente mediante regulador de elución A (que contiene menos moléculas FSH cargadas) antes de la segunda etapa de elución con regulador de elución B (que contiene las moléculas FSH cargadas mayores). Ambas etapas de elución se realizan en una forma de etapas. El AEX se realiza a temperatura ambiente.

AEX	
Matriz	CaptoQ
Tipo de intercambio de ion	Anión fuerte, Q
Grupo cargado	-N+(CH ₃) ³
Capacidad iónica total	0.16-0.22 mmol Cl-/ml medio
Tamaño de partícula*	90 µm (d50v)
Flujo Lin Max.	700 cm/h
Capacidad de unión dinámica	> 100 mg BSA/ml medio

5

Etapas 4: Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (columna butil HP)

Regulador de carga: 20 mM Na fosfato pH 7.5-1.5 M-sulfato de amonio (que contiene metionina)

Regulador de elución: 20 mM Na fosfato pH 7.5 (que contiene metionina)

10

El material de elución con regulador B obtenido de la columna de cromatografía de intercambio de anión (mayores moléculas de FSH ácidas) se ajusta con regulador de carga a sulfato de amonio 1.5 M y se carga en una columna butil HP Sepharose equilibrado con regulador de carga. Después de lavar el material no unido, se eluye el FSH de la columna al reducir la concentración de sulfato de amonio en una forma lineal a bajo cero. La etapa HIC se realiza a temperatura ambiente.

HIC	
Matriz	Butil Cefarosa HP
Ligando	Butilo
Densidad de ligando	50 µmol/ml
Tamaño de partícula promedio	34 µm
Flujo lin máximo	600 cm/h

15

Etapas 5: Diafiltración (membrana que tiene un corte de 10 kD)

Regulador de preformulación: 9-10 mM sodio-fosfato pH 7.0-7.1

0.1g/l metionina

50 mg/ml de sacarosa

20

EL eluado de la etapa 4 (HIC) se aplica luego a temperatura ambiente a diafiltración. Mediante este regulador de etapa se intercambia al regulador de preformulación y se ajusta a la concentración deseada.

Etapa 6: nanofiltración

El producto de la etapa de diafiltración se aplica directamente a un dispositivo de nanofiltración de 20 nm a una presión de aprox. 2 bar. La etapa se realiza a temperatura ambiente.

- 5 El proceso de las etapas (-1) a (6) produce FSH en una pluralidad de > 99.99% p/p con base en la proteína total como se determina mediante el ensayo HCP (nivel de proteína de célula anfitrion < 0.01% p/p).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la purificación de una glucoproteína que comprende someter un líquido que contiene dicha glucoproteína a las etapas de:
 - a) cromatografía de fase inversa,
 - 5 b) cromatografía de exclusión de tamaño, y
 - c) cromatografía de interacción hidrófoba;en el que las etapas se realizan en la secuencia de cromatografía de fase inversa, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de interacción hidrófoba.
- 10 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa a) de cromatografía de fase inversa el regulador de elución contiene un disolvente orgánico, preferiblemente isopropanol.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que en la etapa b) de cromatografía de exclusión de tamaño se realiza intercambio de regulador.
- 15 4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una o más etapas seleccionadas del grupo que consiste de etapas de cromatografía, etapas de filtración y etapas de inactivación de virus.
- 20 5. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las etapas adicionales se seleccionan del grupo que consiste de cromatografía de intercambio de iones tal como cromatografía de intercambio de anión y cromatografía de intercambio de catión; cromatografía de afinidad tal como cromatografía de afinidad de tinte, cromatografía de afinidad inmunitaria, cromatografía de afinidad lectinas y cromatografía de afinidad perborato; filtración tal como diafiltración, ultrafiltración y nanofiltración; e inactivación de virus.
6. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente una etapa d) de cromatografía de intercambio de anión y/o una etapa de cromatoenfoque.
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la etapa d) de cromatografía de intercambio de anión se lleva a cabo posterior a la etapa b) de cromatografía de exclusión de tamaño.
- 25 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que la etapa d) de cromatografía de intercambio de anión en el que se utiliza por lo menos un regulador de elución que contiene sal, y/o se separan isoformas cargadas de la glucoproteína.
9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la glucoproteína se selecciona del grupo que consiste de FSH, CG, LH y TSH, preferiblemente FSH.
- 30 10. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la glucoproteína se produce recombinantemente.
11. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende realizar secuencialmente las etapas de
 - (0) Ultrafiltración;
 - 35 (1) cromatografía de fase inversa;
 - (1) opcionalmente ultrafiltración;
 - (2) cromatografía de exclusión de tamaño;
 - (3) cromatografía de intercambio de aniones;
 - (4) cromatografía de interacción hidrófoba;
 - 40 (5) ultrafiltración y/o diafiltración;
 - (6) nanofiltración.
12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el proceso
 - (i) no comprende una etapa de intercambio de regulador entre la cromatografía de fase inversa y la cromatografía de exclusión de tamaño; y/o

(ii) no comprende una etapa de intercambio de regulador entre la cromatografía de exclusión de tamaño y la cromatografía de intercambio de anión o la cromatografía de interacción hidrófoba; y/ o

(iii) no comprende una cromatografía de inmunofinidad y/o una cromatografía de intercambio de cationes;

- 5 (iv) Comprende solo tres etapas cromatográficas, es decir, una cromatografía de fase inversa, una cromatografía de exclusión de tamaño, y una cromatografía de interacción hidrófoba; o sólo cuatro etapas cromatográficas, es decir, una cromatografía de fase inversa, una cromatografía de exclusión de tamaño, una cromatografía de intercambio de aniones o etapa de cromatografía de enfoque y una cromatografía de interacción hidrófoba.

13. Un proceso para de fabricación de una glucoproteína de interés, que comprende las siguientes etapas:

i) expresar recombinantemente la glucoproteína de interés;

- 10 II) purificar dicha glucoproteína de interés expresa recombinantemente al someter un líquido que contiene dicha glucoproteína en por lo menos las etapas de:

a) cromatografía de fase inversa,

b) cromatografía de exclusión de tamaño, y

c) cromatografía de interacción hidrófoba;

- 15 en el que las etapas se realizan en la secuencia de cromatografía de fase inversa, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de interacción hidrófoba.

14. El proceso de fabricación de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende por lo menos una de las siguientes etapas:

i) uno o más etapas como se define en las reivindicaciones 1 a 12; y/o

- 20 II) una etapa para formular la glucoproteína de interés en forma de una formulación farmacéutica.

15. El proceso de fabricación de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en el que la glucoproteína se selecciona de las gonadotropinas, preferiblemente seleccionadas de FSH, CG, LH, y TSH.