

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 518**

51 Int. Cl.:

C07K 14/59 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2015 PCT/EP2015/053691**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124759**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2015 E 15710723 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 3110839**

54 Título: **Proceso de extracción para obtener hCG que tiene una alta actividad biológica**

30 Prioridad:

24.02.2014 IT MI20140274

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

26.09.2018

73 Titular/es:

**ALTERGON S.A. (100.0%)
Via Dogana Vecchia 2
6900 Lugano, CH**

72 Inventor/es:

**SECONDI, ROBERTO y
CACCIA, PAOLO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 683 518 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 de extracción para obtener hCG que tiene una alta actividad biológica

5 **Técnica anterior**

Junto con la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), la gonadotropina coriónica forma el grupo de hormonas estimuladoras de las gónadas, mencionadas en general como gonadotropinas.

10 La hCG se produce por la membrana exterior de un óvulo fertilizado y posteriormente por la placenta. Realiza la función de prolongar el efecto de la hormona luteinizante en el cuerpo lúteo durante el embarazo; cuando se estimula adecuadamente, el útero adopta la consistencia típica del cuerpo lúteo de embarazo, y secreta altas cantidades de progesterona, una hormona que es necesaria para el desarrollo del embarazo.

15 La molécula de hCG es un heterodímero que consiste en dos subunidades (α y β). La subunidad α tiene una estructura idéntica a la de las otras gonadotropinas (LH y FSH), mientras que la subunidad β es específica para cada hormona. La hCG puede dosificarse en líquidos biológicos con métodos inmunométricos (método radioinmunológico, método inmunoenzimático, quimioluminiscencia). La presencia de hCG en orina implica que el embrión se ha implantado: por esta razón se usa como indicador diagnóstico en la mayoría de pruebas de embarazo habituales.

20 En la industria farmacéutica, la hCG se usa para estimular la ovulación y para tratar la infertilidad femenina. Tiene efectos sobre los hombres también, ya que estimula el desarrollo testicular.

25 Se divulgan métodos cromatográficos para purificar hCG en el documento CN101792481A, Fellegvari et al. (Chromatographia, 27(11-12), 1989, 601-4), Prasad et al. (J Immunoassay Immunochem, 26(4), 2005, 325-44) o Qazi et al. (J Biochem, 47(2), 1974, 219-23).

30 La calidad de las preparaciones de hCG para uso farmacéutico se caracteriza basándose en la actividad biológica específica que mide la potencia real del producto; este valor no depende únicamente de la cantidad absoluta de la hCG en la preparación, sino también de la composición de hCG en sus diversas isoformas. De hecho, la hCG es un producto compuesto, es decir, una mezcla de isoformas que tienen diferentes grados de actividad: una preparación puede contener más hCG que otra, y aún tener una actividad biológica inferior si es rica en isoformas inactivas; viceversa, una preparación puede contener menos hCG que otra, y aún tener una mayor actividad biológica si es más rica en isoformas activas.

35 La hCG disponible en el mercado puede obtenerse por extracción de orina de una gestante o se produce por recombinación. La técnica recombinante proporciona un producto que tiene características reproducibles de una actividad media-alta, y está libre de contaminantes (alérgenos), pero presenta altos costes de producción. Por tanto, hay un interés aún muy importante actualmente, en mantener/mejorar los métodos de extracción.

40 Los métodos de extracción se basan sustancialmente en una primera fase de purificación de orina sin analizar, para retirar cualquier componente no proteínico de bajo peso molecular, y reducir cualquier carga bacteriana y posiblemente vírica presente en la orina. Esta fase implica importantes operaciones de purificación (varias extracciones selectivas y precipitaciones, mediante las que el material se pone en contacto con diferentes niveles de alcohol, se precipita con filtro, se resuspende, etc.). Al final de esta fase, se obtiene una fracción de hCG de un grado intermedio de pureza y que aún tiene una actividad específica muy baja. La segunda fase se basa en separaciones cromatográficas con elución y recuperación de fracciones específicas enriquecidas con hCG. Sin embargo, normalmente la actividad específica de la hCG así obtenida no resulta ser elevada - aunque cumple los requisitos mínimos de uso farmacéutico - ya que el producto puede experimentar una degradación parcial durante las fases de procesamiento. Además, a veces el rendimiento cuantitativo del proceso es bajo, ya que la extracción de hCG a partir del material sin analizar de partida no siempre es óptima.

55 Como causan una degradación parcial de la estructura glucoproteínica, los procesos de extracción actuales aumentan el porcentaje de isoformas poco activas o inactivas. Por lo tanto, para mantener un rendimiento del proceso suficientemente elevado, es necesario recuperar la mayor parte de la hCG, incluyendo de ese modo las fracciones poco activas y reduciendo, por tanto, la actividad específica del producto final; viceversa, si se recoge únicamente la hCG con actividad suficientemente elevada, entonces se ve forzado el rechazo de todas las fracciones de hCG poco activas/inactivas, reduciendo fuertemente, por tanto, el rendimiento del proceso.

60 Por tanto, hay una fuerte demanda de procesos novedosos para la extracción - producción de hCG que da lugar a un producto de calidad farmacéutica que tiene una alta actividad biológica específica, que permita al mismo tiempo un alto rendimiento del proceso.

65 **Sumario**

El solicitante ahora ha desarrollado un proceso novedoso para la extracción de hCG de orina - muy respetuoso con

la hCG natural - mediante el que se obtiene hCG de calidad farmacéutica con alto rendimiento cuantitativo, evitando o reduciendo mucho al mismo tiempo la degradación que se produce con los procesos de extracción conocidos.

El proceso de la invención se caracteriza por las siguientes fases:

- (a) separación de orina de mujeres embarazadas, o fracción sin analizar de la misma, por cromatografía en resina de intercambio iónico que tiene un tamaño de partícula entre 50 y 500 micrómetros;
- (b) separación del producto obtenido en (a), mediante cromatografía de afinidad por tinte;
- (c) ultra/nanofiltración de la solución obtenida en (b);
- (d) recuperación del producto final de la solución obtenida en (c).

Este proceso novedoso permite trabajar directamente sobre orina natural, de modo que la fase preliminar de purificación de orina sin analizar antes de la cromatografía pasa a ser opcional; si esta se implementa opcionalmente en el presente proceso, también (por ejemplo, en el caso de instalaciones de producción no diseñadas para el tratamiento de altos volúmenes de orina), puede tener un impacto mínimo, es decir, puede ser significativamente más "suave" (más corto, más simple) que los procedimientos habitualmente usados; en particular, se puede producir mediante una única etapa de precipitación de material proteínico de orina, obteniéndose dicha precipitación típicamente con ácido benzoico, o sal del mismo. De hecho, gracias a la alta potencia de discriminación de las etapas cromatográficas implementadas en la invención, una purificación inicial escasa o ausente de la orina de partida realmente no afecta al rendimiento cuantitativo del proceso; en su lugar, esta circunstancia contribuye a proteger a las isoformas activas naturales de hCG, evitando o reduciendo, por tanto, su degradación en isoformas inactivas, y permitiendo, por tanto, la recuperación de hCG que tiene una alta actividad específica (más de 12 000 UI/mg, que corresponde a las mejores preparaciones de hCG actualmente disponibles en el mercado), en un alto rendimiento cuantitativo. La eliminación de los largos procesos precromatográficos de purificación de orina, actualmente requeridos en la técnica anterior, también contribuye a la simplicidad y el ahorro de costes del proceso.

Descripción detallada

Material de partida

El material de partida para el presente proceso puede ser orina de mujeres embarazadas, o una fracción sin analizar de la misma.

La orina de mujeres embarazadas puede usarse tal cual, excepto por un posible aclarado preliminar por filtración del material en suspensión y ajustando los pH de los lotes de orina dentro de un intervalo de trabajo convencional, típicamente entre 4 y 6.

Como alternativa, como material de partida el proceso puede usar una fracción sin analizar de la propia orina. De forma ventajosa, en el presente proceso, dicha fracción sin analizar puede obtenerse por medio de una única precipitación del componente proteínico, por la que preferiblemente el último puede obtenerse tratando la orina con un ácido orgánico adecuado, o sal del mismo, típicamente ácido benzoico o benzoato de sodio; típicamente, la precipitación se realiza a una temperatura comprendida entre 4 y 12 °C, por ejemplo, a 8 + 2 °C, a un pH comprendido entre 3 y 5, por ejemplo, entre 3,6 y 4,0; el precipitado de proteína se recupera, se seca y se lava con disolventes adecuados, por ejemplo, etanol, acetona, éter etílico. La fracción sin analizar así obtenida muestra baja actividad biológica específica de hCG, generalmente comprendida entre 1 y 10 UI/mg.

En la preparación para la fase (a) del presente proceso, la fracción de hCG sin analizar se extrae en un disolvente adecuado, preferiblemente una solución hidroalcohólica que tiene un pH entre 4 y 6, y después de la separación de la materia particulada insoluble a través de centrifugación, el sobrenadante se aplica a la columna cromatográfica usada en la fase (a).

Fase a)

Esta primera separación cromatográfica se realiza en una resina de intercambio iónico que tiene un tamaño de partícula comprendido entre 50 y 500 micrómetros, preferiblemente entre 100 y 300 micrómetros; la resina está preferiblemente reticulada y contiene agarosa; además, tiene capacidad de unión comprendida entre 0,05 y 0,50 mmol de proteína/ml de resina. Una resina particularmente preferida es SP Sepharose Big Beads, GE Healthcare.

En la fase (a), la orina de partida, o la fracción sin analizar de la misma como se especifica anteriormente, se aplica a la columna. Después de un lavado preliminar, la columna se eluye con una solución hidroalcohólica que tiene un pH comprendido entre 4 y 6, preferiblemente entre 4,8 y 5,4; dicho pH se determina por la presencia de una sal adecuada en solución, típicamente acetato de amonio. El eluido se recoge en fracciones recuperando aquellas que contienen hCG. La cantidad de hCG presente en las fracciones puede detectarse midiendo el valor inmunoenzimático.

La combinación de fracciones recuperadas entonces experimenta un tratamiento posterior de diafiltración

convencional, seguido de precipitación con etanol.

Si el material de partida usado fuera una fracción de orina sin analizar, en esta fase el producto tiene una actividad específica de hCG generalmente en exceso de 4000 UI/mg, con un factor de purificación (entendido como la relación entre la actividad específica del producto antes y después de la etapa cromatográfica en consideración) mayor de 400. Por el contrario, si el material de partida fuera orina natural, en esta ocasión el producto tiene una actividad específica de hCG generalmente no inferior a 500 UI/mg, con un factor de purificación no inferior a 3000.

Fase (b)

El precipitado obtenido al final de la fase (a) se disuelve en un disolvente adecuado, preferiblemente una solución acuosa que tiene un pH entre 4 y 6, y se aplica a la columna.

La columna usada en la fase (b) usa una resina de afinidad por tinte, preferiblemente que contiene agarosa; una resina particularmente preferida es Blue Sepharose 6 Fast Flow.

Después de un lavado preliminar, la columna se eluye con un gradiente lineal tanto de la concentración salina como del pH; el gradiente de concentración salina (por ejemplo, obtenido con KCl) preferiblemente varía entre 0,1 y 3,0 M, más preferiblemente entre 0,3 y 2,2 M de KCl; y el pH varía entre 11 y 8, más preferiblemente entre 10 y 9. El eluido se recoge en fracciones, recuperando aquellas que contienen hCG, que puede detectarse determinando el valor inmunoenzimático.

Fase (b1)

El proceso de producción puede comprender opcionalmente una separación cromatográfica adicional también, realizada en una resina de intercambio iónico. En este caso, una resina preferida es DEAE Sepharose Fast Flow. Para este fin, en la columna se aplica la solución que contiene hCG, resultante de la fase (b). Después de un lavado preliminar, la columna se eluye con una solución hidroalcohólica que tiene un pH de aproximadamente 7, con un gradiente lineal de concentración salina; el gradiente - generalmente obtenido con fosfato de sodio - varía entre 10 y 100 mM, más preferiblemente entre 25 y 75 mM. El eluido se recoge en fracciones, recuperando aquellas que contienen hCG, que puede determinarse midiendo el valor inmunoenzimático.

Fase (c)

Esta fase implica un conjunto de etapas de ultrafiltración - necesarias para concentrar las soluciones y retirar los componentes de bajo peso molecular - y etapas de nanofiltración - para eliminar cualquier virus posiblemente presente en solución. Preferiblemente se realiza una etapa de nanofiltración y al menos dos etapas de ultrafiltración. Las etapas de nano/ultrafiltración pueden realizarse en cualquier orden; preferiblemente, la nanofiltración es intermedia entre dos etapas de ultrafiltración.

Fase (d)

La fase (d) implica purificación final y recuperación de hCG. Implica una etapa de precipitación selectiva de hCG de la fase acuosa relacionada resultante de (c), obtenida por medio de alcoholes, base y sales adecuados, a un pH comprendido entre 8 y 10; los alcoholes, base y sales preferidos para esta precipitación selectiva son etanol, hidróxido de amonio, acetato de amonio, acetato de calcio y fosfato de sodio dodecahidrato tribásico, respectivamente.

El precipitado así obtenido se lava con alcohol, preferiblemente etanol, y se recupera a través de centrifugación; el sobrenadante puede tratarse adicionalmente para recuperar cualquier resto de hCG que haya quedado en la solución.

Si se usara una fracción de orina sin analizar como material de partida, el producto final así obtenido tiene una actividad biológica específica de hCG generalmente en exceso de 15 000 UI/mg, con un factor de purificación relacionado con esta fase del proceso mayor de 3,5.

Por el contrario, si el material de partida fuera orina natural, el producto así obtenido tiene una actividad biológica específica de hCG generalmente en exceso de 12 000 UI/mg, con un factor de purificación mayor de 20.

Se puede apreciar que la actividad final específica de hCG es elevada y tiene el mismo orden de magnitud (12 000-15 000 UI/mg), aunque el material de partida sea orina natural o una fracción sin analizar de la misma, siendo ambas altamente impuras; esto puede atribuirse a la alta capacidad de discriminación del sistema cromatográfico usado, que puede separar de manera muy eficaz toda la hCG presente, de una manera que es muy independiente del grado de pureza del material de orina de partida.

El proceso de la invención se ilustra a continuación en este documento a través de los siguientes ejemplos no

limitantes.

Ejemplo 1: Proceso realizado en una fracción de orina sin analizar

5 **Preparación de la fracción "A" (hCG sin analizar 5-10 UI/mg) y extracción de la misma**

Se recibe orina en las instalaciones de producción y se transfiere a los tanques de proceso. Se añade un 2 % (p/v) de benzoato de sodio y el pH se ajusta entre 3,6 y 4,0 añadiendo HCl al 20 % en agitación. El precipitado de proteína así obtenido se recupera a través de filtración.

10

El precipitado entonces se lava con disolventes adecuados y se seca al vacío. (Fracción A)

15 Para llevar la hCG a una fase líquida aplicable a cromatografía, se vierten 100 kg de fracción "A" - en agitación continua - en 1000 litros de una solución - previamente refrigerada (5 °C) - de acetato de amonio 0,1 M a un pH de 5,0 - 5,2 con etanol al 10 %, y la suspensión resultante se agita durante 3 horas. La suspensión entonces se centrifuga durante 30 minutos a > 4000 rpm. El sobrenadante que contiene hCG se separa y se recoge.

Fase (a) Cromatografía en SP Sepharose Big Beads

20 Resina: SP Sepharose Big Beads, GE Healthcare;
Composición: agarosa al 6 % altamente reticulada/sulfopropilo
Tamaño de partícula: 100-300 µm (micrómetros).
Capacidad iónica (capacidad de unión): 0,18-0,25 mmol/ml de medio
Estabilidad en pH (de trabajo) 4-13
25 Estabilidad en Cip (corto plazo) 3-14
Presión espec. /caudal 1200-1800 cm/h.
Tampón de equilibrado: acetato de amonio 0,1 M a un pH de 5,0 - 5,2, EtOH al 10 %

30 El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se aplica a la columna de SP Sepharose Big Beads a un caudal de 80 l/h. La columna entonces se lava con las siguientes soluciones:

- n.º 1) acetato de amonio 0,1 M, pH: 5,0-5,2, etanol al 40 % (v/v), caudal: 80 l/h.
- n.º 2) acetato de amonio 0,3 M, pH: 5,0-5,2, etanol al 40 % (v/v), caudal: 80 l/h.

35 La columna entonces se eluye con una solución de acetato de amonio 0,7 M, pH: 5,0-5,2, con etanol al 40 % (v/v), caudal: 60 l/h.

40 El eluido se recoge en fracciones; el contenido de hCG se evalúa por ensayo inmunoenzimático y la concentración total de proteína por medición espectrofotométrica.

Después, las fracciones que contiene hCG se recogen y se mezclan, y después se concentran y se diafiltran a través de un cartucho que tiene un punto de corte de 10 kDa, obteniendo de ese modo una solución final de proteína en agua purificada. El contenido de hCG se evalúa por ensayo inmunoenzimático y la concentración total de proteína por medición espectrofotométrica.

45 Después, se añaden cuatro volúmenes de etanol al 96 % previamente refrigerado a cada volumen de solución de hCG, y se dejan reposar durante al menos 3 horas a 5 + 3 °C.

50 Posteriormente, el precipitado se recupera a través de centrifugación, se disuelve en agua purificada y se evalúa la cantidad de hCG por ensayo inmunoenzimático. La concentración total de proteína se mide por determinación espectrofotométrica. La solución se almacena a 5 + 3 °C.

55 La actividad específica de la solución resulta ser no inferior a 4000 UI/mg, con un factor de purificación no inferior a 400.

Fase (b) Cromatografía en Blue Sepharose 6 Fast Flow.

60 La solución se equilibra en acetato de sodio 20 mM, pH 5,5, y se aplica en una columna cromatográfica que contiene la resina Blue-Sepharose 6 Fast Flow.

La columna entonces se lava con los siguientes tampones:

- Tampón 1) glicina 50 mM - NaOH, pH 10
- Tampón 2) KCl 0,2 M en glicina 50 mM - NaOH, pH 9

65

Después, la columna se eluye con un gradiente lineal de:

KCl 0,3 M en glicina 50 mM - NaOH, pH 10 (20 l) hasta:
KCl 2,2 M en glicina 50 mM - NaOH, pH 9 (20 l)

5 El eluido se recoge en fracciones. El contenido de hCG se evalúa por ensayo inmunoenzimático y la concentración total de proteína por medición espectrofotométrica. Las fracciones que contiene hCG entonces se recogen y se reúnen en una única combinación.

Fase (b1) Cromatografía en DEAE Sepharose Fast Flow

10 Opcionalmente, la combinación de fracciones resultante de la cromatografía en Blue Sepharose 5 Fast Flow se diafiltra y se equilibra en un tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,3, etanol al 10 % (v/v).

15 La solución así obtenida se aplica en una columna cromatográfica que contiene la resina DEAE Sepharose Fast Flow. Después, la resina se lava con el siguiente tampón: fosfato de sodio 22 mM, pH 7,3, etanol al 10 % (v/v) y las proteínas se eluyen con un gradiente lineal de:
fosfato de sodio 25 mM, pH 7,3, etanol al 10 % (v/v), 50 litros hasta:
fosfato de sodio 75 mM, pH 7,3, etanol al 10 % (v/v), 50 litros

20 Después, el eluido se recoge en fracciones.

El contenido de hCG se evalúa por ensayo inmunoenzimático y la concentración total de proteína por medición espectrofotométrica. Las fracciones que contiene hCG entonces se recogen y se reúnen en una única combinación.

Fase (c) Ultrafiltración/nanofiltración

25 Las combinaciones que provienen de las fracciones recogidas de las cromatografías descritas anteriormente (b y b1) se ultrafiltran en una membrana de 10 KDa y se equilibran en una solución de KCl 0,2 M en glicina 50 mM, pH 7,5; después, la solución se filtra a través de una unidad de filtración desechable de 0,22 micrómetros.

30 Posteriormente, la solución resultante se nanofiltra usando un sistema adecuado, a una presión constante de 200 kPa (2 bar). El filtrado se recoge y la solución se ultrafiltra para obtener una solución de proteína final en agua purificada. El contenido de hCG se evalúa por ensayo inmunoenzimático y la concentración total de proteína por medición espectrofotométrica.

Fase (d) Aislamiento por precipitación selectiva y recuperación de hCG final

35 Por cada 100 ml de solución ultrafiltrada se añaden: 19,4 g de acetato de amonio, 83,3 ml de etanol al 96 % (previamente refrigerado a -20 °C), 4,4 ml de una solución de fosfato de sodio dodecahidrato tribásico al 7,6 %, 5,0 ml de una solución de acetato de calcio al 4,9 %, 12 ml de hidróxido de sodio 5 M a pH 9,4. Después de agitar durante una hora, la solución se centrifuga durante 30 minutos a 7000 rpm y se recoge el sobrenadante.

40 Después, se añaden dos volúmenes de etanol al 96 % - previamente refrigerado - a cada volumen del sobrenadante recogido. La suspensión resultante se deja reposar durante al menos 12 horas a -20 ± 5 °C y después se centrifuga durante 30 minutos a 7000 rpm.

45 El precipitado obtenido se disuelve en agua para inyección (WFI) y se añaden cuatro volúmenes de etanol al 96 % por cada volumen de la solución para precipitar las proteínas, dejando después reposar la suspensión durante dos horas a -20 ± 5 °C.

50 Después, la suspensión se centrifuga como se describe anteriormente.

El precipitado obtenido se vuelve a disolver en WFI, y consiste en hCG con una actividad biológica específica > 15 000 UI/mg y con un factor de purificación mayor de 3,5.

Ejemplo 2: Proceso realizado en orina natural

55 Se recibe orina en las instalaciones de producción y se transfiere a los tanques de proceso, y se añade acetato de amonio a la misma hasta una concentración de 0,1 M. El pH de la orina se valora entre 4,6 y 5,2 con ácido acético, y la orina se filtra a través de una unidad de filtración de 10 micrómetros.

60 La solución obtenida se aplica en una columna de SP Sepharose Big Beads, y desde este punto se sigue el mismo procedimiento que el de las fases (a)-(d) mostradas en el ejemplo 1.

65 El precipitado obtenido al final de la fase (d), redisolto en WFI, consiste en hCG con una actividad biológica específica > 12 000 UI/mg y con un factor de purificación ≥ 20.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la preparación de gonadotropina coriónica humana (hCG) de calidad farmacéutica, que comprende las fases:
- 5 (a) separación de orina de mujeres embarazadas, o una fracción sin analizar de la misma, por cromatografía en resina de intercambio iónico que tiene un tamaño de partícula entre 50 y 500 micrómetros;
- (b) separación del producto obtenido en (a), por medio de cromatografía de afinidad por colorante;
- 10 (c) ultra/nanofiltración de la solución obtenida en (b);
- (d) recuperación del producto final de la solución obtenida en (c).
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la resina usada en la fase (a) está reticulada.
3. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la resina usada en la fase (a) tiene capacidad de unión comprendida entre 0,05 y 0,50 mmol de proteína/ml de resina.
- 15 4. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en el que en la fase (a) se usa un eluyente hidroalcohólico que tiene pH entre 4 y 6.
- 20 5. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en el que la fracción de orina sin analizar se obtiene mediante una única etapa de precipitación del material proteínico de dicha orina.
6. Proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la precipitación se realiza por medio de un ácido orgánico adecuado o sal del mismo.
- 25 7. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, en el que en la fase (b) se usa un eluyente con un gradiente de concentración salina y de pH.
8. Proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho gradiente de concentración salina varía entre 0,1 y 3,0 M y dicho gradiente de pH varía entre pH 11 y 8.
- 30 9. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, en el que las resinas usadas en las fases (a) y/o (b) contiene agarosa.
- 35 10. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, en que la fase (c) comprende al menos dos etapas de ultrafiltración y una etapa de nanofiltración, que pueden realizarse en cualquier orden.
11. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-10, en el que la fase (b) incluye además una etapa (b1) de separación cromatográfica en una resina de intercambio iónico.
- 40 12. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-11, en el que la fase (d) comprende una precipitación selectiva de hCG de dicha solución en presencia de alcohol, base y sales adecuados, a un pH entre 8 y 10, y en el que el precipitado así obtenido se disuelve opcionalmente y se vuelve a precipitar.