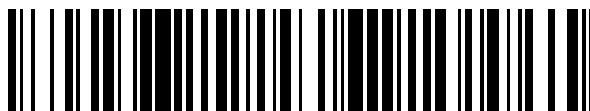


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 748**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/24** (2006.01)

**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: **21.05.2015 PCT/IB2015/053745**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177751**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2015 E 15732948 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3145950**

54 Título: **Proceso para obtener HMG-UP (gonadotropina menopáusica humana con grado de ultrapureza) y una composición libre de contaminantes**

30 Prioridad:

**23.05.2014 US 201462002671 P**

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

**12.07.2019**

73 Titular/es:

**INSTITUTO MASSONE S.A. (50.0%)**

**Arias 4431**

**C1430CSE Buenos Aires, AR y**

**MASSONE, RAÚL ENRIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BALANIÁN, LILIANA;**

**CANCELA, MARIANA;**

**WOLFENSON, CLAUDIO y**

**GROISMAN, JOSÉ**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 719 748 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 obtener HMG-UP (gonadotropina menopáusica humana con grado de ultrapureza) y una composición libre de contaminantes.

5

### Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de purificación de HMG (gonadotropina menopáusica humana) por cromatografía multimodal para obtener una composición de HMG-UP (gonadotropina menopáusica humana con grado de ultrapureza).

10

### Antecedentes de la invención

El término "menotropinas" se aplica a una combinación hormonal de gonadotropinas obtenidas a partir de la orina de mujeres menopáusicas y posmenopáusicas que comprende dos hormonas glucoproteínicas: hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH); son secretadas por la glándula hipofisaria, y posteriormente se metabolizan y excretan en la orina.

15

Las gonadotropinas urinarias se han utilizado con éxito para estimular los ovarios en los ciclos de inducción de la ovulación o durante la reproducción asistida durante varias décadas.

20

Desde su introducción hasta el momento, se han producido mejoras significativas en la tecnología de fabricación y los procesos de purificación. Debido a la aplicación apropiada de la tecnología avanzada en la purificación, ha resultado posible obtener gonadotropinas con un alto grado de pureza, como por ejemplo HMG-HP.

25

El documento WO 00/63248 se refiere a composiciones de gonadotropina, en particular a composiciones de FSH (hormona foliculoestimulante: folitropina) y menotropina de alta actividad biológica y a un método para preparar estas composiciones a partir de orina humana en bruto de mujeres menopáusicas y posmenopáusicas. El procedimiento permite obtener composiciones de HMG-HP que comprenden potencias de FSH de 3700 UI/mg de proteína y 4300 UI/mg de proteína en los ejemplos 1 y 2 respectivamente.

30

El documento WO 2011/150110 proporciona unos métodos para purificar un polipéptido a partir de una composición que comprende el polipéptido y por lo menos un contaminante y formulaciones que comprenden el polipéptido purificado por los métodos, en los que se utiliza Capto-adhere™ en dichos métodos.

35

Basset et al., 2009, divulgan un método para la identificación de proteínas no gonadotropinas en preparaciones de FSH humana (u-hFSH) urinaria y gonadotropina (u-HMG) urinaria humana como inhibidor de proteasa, afamina, proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina 7, alfa-2-glicoproteína de cinc y albúmina. A pesar de esta divulgación, los productos urinarios todavía contienen algunas proteínas no gonadotropinas como contaminantes. A pesar de esta divulgación, los productos urinarios todavía contienen algunas proteínas no relacionadas con las gonadotropinas como contaminantes.

40

Algunos de los principales contaminantes de la composición de gonadotropina HMG-HP comprenden inhibidor de serina proteasa, afamina, proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina 7, alfa-2-glicoproteína de cinc y albúmina; todos ellos identificados en la publicación Bassett et al, 2009).

45

El desafío para la mejora de la purificación de HMG-HP urinaria era eliminar aquellas proteínas que son copurificadas con principios activos, pero preservando la integridad de las bioactividades de FSH y LH utilizando un proceso sencillo con alto rendimiento.

50

Para alcanzar este objetivo se introdujo una nueva etapa de purificación para optimizar la purificación de la HMG-HP de la técnica anterior.

Brevemente, durante el proceso de fabricación de la HMG-HP como se presenta en la patente anterior (patente europea EP1169349 B1), se obtienen dos fracciones importantes en la última etapa cromatográfica (cromatografía de interacción hidrófoba, HIC): una de ellas con bioactividad de FSH (fracción J2) y la otra con bioactividad de LH (fracción J3).

55

La menotropina es una preparación que requiere presentar una relación de bioactividad FSH:LH de aproximadamente 1: 1.

60

Para lograr una relación de FSH:LH de 1:1, existe una etapa de equilibrado para ajustar el contenido de ambas hormonas. En el caso de la HMG-HP, esta etapa de equilibrado se realiza mediante la mezcla de la bioactividad de FSH de fracción J2 con la bioactividad de LH de la fracción J3.

65

Como se describe a continuación, la fracción J3 fracción está usualmente contaminada con proteínas no activas.

Por lo tanto, para obtener el material de HMG-UP (HMG ultrapura) sin casi ninguna contaminación de proteínas detectable, la fracción bioactiva de LH (fracción J3) se purificó con éxito por cromatografía multimodal, específicamente un intercambiador aniónico fuerte multimodal, Capto-adhere™ (fracción J3-UP).

Como es bien conocido (ASRM Practice Committee; Fertility and Sterility, 90, Suppl. 3, S13, 2008) una pequeña cantidad de hCG presente en la preparación contribuye a proporcionar la mayor parte de la bioactividad de LH de la menotropina. En consecuencia, la purificación de la fracción J3 implicó la purificación de la gonadotropina coriónica humana (hCG) presente en esta fracción para obtener una fracción J3-UP.

Finalmente, para producir la HMG-UP, la etapa de equilibrado involucraba en este caso la mezcla en cantidad equivalente de bioactividad de FSH de la fracción J2 con bioactividad de LH de la fracción J3-UP entonces mucho más purificada que la fracción J3 anterior más contaminada.

Para obtener una composición de HMG-UP, la solución obtenida después de la etapa de equilibrado se somete a las etapas de filtración estéril, nanofiltración y precipitación.

### Sumario de la invención

La presente invención comprende un proceso para obtener una composición de HMG-UP (gonadotropina menopáusica humana con grado de ultrapureza) libre de contaminantes no relacionados con la gonadotropina, como se describe en las siguientes reivindicaciones

El presente proceso para obtener una composición de HMG-UP (gonadotropina menopáusica humana con grado de ultrapureza) mediante la eliminación del inhibidor de serina proteasa, afamina, proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina 7, alfa-2-glicoproteína de cinc y albúmina comprende las etapas de:

- i) realización de un tratamiento inicial de una orina menopáusica/posmenopáusica humana con caolín en el que las proteínas que incluyen gonadotropinas presentes en la orina se adsorben en caolín;
- ii) elución de las gonadotropinas adsorbidas en caolín por elución alcalina;
- iii) precipitación de la elución alcalina con acetona para obtener la fracción A;
- iv) extracción de la fracción bioactiva a partir de esta fracción A precipitada con solución al 10% p/v de acetato de amonio en etanol (70%) y precipitación con 10% de acetato de amonio en etanol (90%) para obtener la fracción B;
- v) realización de una purificación de la fracción B por cromatografía de intercambio iónico para obtener la fracción C (material fuente HMG o equivalente);
- vi) realización de una purificación de la fracción C por cromatografía de intercambio catiónico utilizando una resina catiónica fuerte, eluyendo con acetato de amonio;
- vii) precipitación en medio ácido para obtener una fracción F de la fracción eluida obtenida anteriormente;
- viii) purificación de la fracción F por cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina aniónica fuerte, eluyendo con acetato de amonio para la obtención de la fracción G;
- ix) purificación de las gonadotropinas obtenidas en la fracción G utilizando cromatografía de interacción hidrófoba por adición secuencial de amortiguadores que contienen concentración decreciente de sulfato de amonio para obtener las fracciones J2 y J3, en el que la fracción J2 presenta principalmente una bioactividad de FSH y la fracción J3 presenta una bioactividad de LH;
- x) purificación de la gonadotropina de la fracción J3 utilizando un intercambiador aniónico fuerte con funcionalidad multimodal, eluyendo con un amortiguador a un pH constante pero modificando la conductividad para obtener una fracción J3-UP que únicamente presenta bioactividad de LH;
- xi) obtención de una HMG-UP en una etapa de equilibrado mediante la mezcla de actividades equivalentes de FSH de la fracción J2 y LH de la fracción J3-UP;
- xii) someter dicha solución de HMG-UP a las etapas de:
  - 1) filtración estéril,

- 2) nanofiltración, y
- 3) precipitación;

5 para obtener un composición de HMG-UP (gonadotropina menopáusica humana con grado de ultrapureza) libre de contaminantes de proteínas no relacionadas con las gonadotropinas tales como inhibidor de proteasa, afamina, proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina 7, alfa-2-glucoproteína de cinc y albúmina.

### Breve descripción de los dibujos

10 FIGURA 1: representa el diagrama de flujo para obtener HMG-UP.

FIGURA 2: representa la obtención de la fracción J3-UP por cromatografía multimodal utilizando Capto-adhere™.

15 FIGURA 3: representa la caracterización de la fracción J3-UP por SDS-PAGE (electroforesis en dodecil sulfato de sodio-gel de poliacrimamida).

20 FIGURA 4: representa la caracterización de la fracción J3-UP por SDS-PAGE (electroforesis en dodecil sulfato de sodio-gel de poliacrilamida).

FIGURA 5: representa la caracterización de fracción J3 y fracción J3-UP en gel 2D gel. La identificación de alfa y beta hCG se realizó por MALDI-MS (desorción/ionización láser asistida por matriz - Espectro de masa).

25 FIGURA 6: representa la caracterización de HMG-HP y HMG-UP mediante gel 2D. La identificación de los diferentes puntos se realiza por MALDI-MS (desorción/ionización láser asistida por matriz - Espectro de masa).

### Descripción detallada de la invención

30 El estudio presentado en la presente memoria muestra que es posible obtener una HMG ultrapura con una pureza superior a la de la HMG-HP mediante la adición de una etapa cromatográfica nueva más al proceso de fabricación existente.

35 Esta nueva etapa consiste en la eliminación de impurezas que coeluyeron con la fracción de LH por cromatografía de modo mixto utilizando específicamente un intercambiador aniónico fuerte multimodal.

Soportes de cromatografía de modo mixto o multimodal:

40 La cromatografía de modo mixto o multimodal se refiere a la cromatografía que implica sustancialmente una combinación de dos o más mecanismos de interacción entre los ligandos y las moléculas diana. En algunas formas de realización, la combinación produce una selectividad única tal que puede lograr el fraccionamiento de los anticuerpos, que no se puede alcanzar por un soporte de modo único. En ciertas formas de realización, la resina de modo mixto comprende una parte cargada negativamente y una parte hidrófoba. En una forma de realización, la parte cargada negativamente es un grupo carboxilato aniónico o un grupo sulfo aniónico para el intercambio de cationes. Los ejemplos de tales soportes incluyen, pero sin limitación Capto-MMC™ (GE Healthcare).

45 Otros medios diversos de cromatografía de modo mixto están disponibles en el comercio tales como Carboxi-Sulfon™, fluoroapatita (CFT), MEP-Hypercel™, Capto-adhere™, Bakerbond™, y Bakerbond™ ABx™.

50 El ligando Capto-adhere™, N-Bencil-N-metil etanol amina, que presenta muchas funcionalidades para la interacción. Las interacciones más pronunciadas son la interacción iónica, enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba. El ligando se acopla a una matriz de agarosa de alto flujo modificada químicamente. La matriz de agarosa proporciona rigidez a las partículas sin comprometer el tamaño de poro.

55 Estas propiedades de la matriz de agarosa permiten la transferencia de masa rápida, lo que produce capacidades de unión dinámica altas del Capto-adhere™ con alto flujo.

La matriz de base de agarosa altamente reticulada proporciona un medio de alta estabilidad química y física.

60 Materiales y métodos:

Fuente de material:

65 La actividad de LH de la fracción J3 se obtuvo como se describe en la patente europea EP1169349 B1 por HIC (cromatografía de interacción hidrófoba).

La fracción J3 se dializó contra el amortiguador tris 40 mM pH 8.5 y a continuación se concentró en la celda Amicon, utilizando el filtro de polietersulfona Código PM10, valor de corte 10000 Catálogo N.º 13122 (Millipore).

5 El contenido de proteína de la muestra fue 75 mg de proteína/ml de solución

Cromatografía multimodal

Se realizó la cromatografía multimodal utilizando un sistema purificador ÄKTA.

10 La columna XK 16/40 se preparó con Capto-adhere™ Código N° 17-5444-99 siguiendo las instrucciones del inserto.

Propiedades de Capto-adhere:

15 Esta resina se recomienda principalmente para la eliminación de contaminantes en las etapas posteriores a la proteína A para eliminar dímeros y agregados durante la fabricación de anticuerpos y asimismo proteínas y ácidos nucleicos de la célula hospedadora.

20 Capto-adhere™ es un intercambiador aniónico fuerte con funcionalidad multimodal. La funcionalidad multimodal proporciona una selectividad diferente en comparación con intercambiadores aniónicos tradicionales.

25 El ligando Capto-adhere™, N-Bencil-N-metil etanol amina, presenta muchas funcionalidades para la interacción. Las interacciones más pronunciadas son la interacción iónica, enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba. El ligando se acopla a una matriz de agarosa.

La matriz de agarosa proporciona rigidez a las partículas sin comprometer el tamaño de poro.

30 Estas propiedades de la matriz de agarosa permiten la transferencia de masa rápida, lo que produce capacidades de unión dinámica altas del Capto-adhere™ con alto flujo.

La matriz de base de agarosa altamente reticulada proporciona un medio de alta estabilidad química y física.

35 En la presente divulgación, la cromatografía multimodal se realizó a temperatura ambiente, con un caudal de flujo de 3 ml/min y el modo de elución seleccionado fue unión-elución.

La elución se realizó manteniendo el pH constante pero modificando la conductividad del amortiguador.

40 Se seleccionó un 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 y se realizó un gradiente en etapas usando NaCl.

La bioactividad de LH se eluyó a bajas conductividad. Por otra parte, los contaminantes se desorbieron a conductividad alta.

45 La detección se llevó a cabo a 280 nm.

Sumario de las condiciones cromatográficas seleccionadas:

- Columna XK 16/40: volumen 24 ml.
- 50 - Carga: 50 mg de proteína de actividad de la fracción de LH Lote 4625/51-1.
- Flujo: 3 ml/min
- Detección: 280 nm
- 55 - Tampones de elución:
- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 0 mM NaCl
- 60 - 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 50 mM NaCl
- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 100 mM NaCl
- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 225 mM NaCl

65

- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 300 mM NaCl
- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 1000 mM NaCl

5 Métodos analíticos:

Contenido de proteína total:

10 El contenido de proteína total se determinó de acuerdo con el método de Lowry [Lowry et al 1951] modificado por Hartree [Hartree, 1972]. La albúmina sérica bovina se utilizó como estándar.

Bioensayo:

15 La bioactividad de LH y FSH de las muestras se evaluó usando el bioensayo *in vivo*.

a) Ensayo biológico de la hormona foliculoestimulante (FSH)

Método: Método de aumento del peso de los ovarios (USP XXXV, British Pharmacopeia 2015, volumen III).  
20 Estándar de referencia primario: Estándar internacional para FSH urinaria y LH urinaria (NIBSC, WHO-ECBS).  
Estándar de referencia de trabajo: Menotropinas (HMG) fabricadas por Instituto Massone S.A., calibrado contra el estándar de referencia primario.  
Animales: Ratas hembra de la cepa Wistar, 21 - 24 días, en grupos de 6 animales por jaula con pesos que difieren en no más de 10 gramos dentro del grupo.  
25 Dosis: prueba 3 x 3, es decir, 3 dosis del estándar de trabajo y 3 dosis de la muestra, una dosis analizada por jaula. Dosis baja: 2.4 UI; Dosis media: 4.3 UI; Dosis alta: 7.7 UI.  
Amortiguador: Solución salina tamponada con fosfato-albúmina pH 7.2 que contiene 28 UI hCG/ml.

b) Ensayo biológico de la hormona luteinizante (LH)

Método: Método de aumento del peso de la vesícula seminal (USP XXXV, British Pharmacopeia 2015, volumen III).  
30 Estándar de referencia primario: Estándar internacional para FSH urinaria y LH urinaria (NIBSC, WHO-ECBS).  
Estándar de referencia de trabajo: Menotropinas (HMG) fabricadas por Instituto Massone S.A., calibrado contra el estándar de referencia primario.  
Animales: Ratas hembra de la cepa Wistar, 21 - 24 días, en grupos de no menos de 6 animales por jaula con pesos que difieren en no más de 10 gramos dentro del grupo.  
35 Dosis: prueba 3 x 3, es decir, 3 dosis del estándar de trabajo y 3 dosis de la muestra, una dosis analizada por jaula. Dosis baja: 7 UI; Dosis media: 14 UI; Dosis alta: 28 UI.  
40 Amortiguador: Solución salina tamponada con fosfato-albúmina pH 7.2.

SDS-PAGE:

45 Las diferentes fracciones se caracterizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras como se describe en el manual del usuario de PhastSystem (archivo N.º 110).

Las muestras se tomaron en amortiguador de muestra con agente reductor y se calentaron durante 5 min a 95-100°C.

50 Se usó la tinción de plata para visualizar el perfil de proteína.

Todos los materiales usados para realizar SDS-PAGE se pueden resumir de la siguiente manera:

- 55
- La separación por electroforesis se realizó utilizando: PhastSystem (GE Healthcare).
  - Las imágenes de los geles se procesaron utilizando ImageScanner (PowerLook 1120 "UMAX") con Software LabScan 5,0, GE Healthcare. Image Quant TL versión 2005, Amersham Biosciences.

60

  - Aplicador de muestra 8/1 (1 µl), GE Healthcare Código N.º 18-1618-01.
  - Mezcla de calibración LMW de GE Healthcare Código N.º 17-0446-01.

65

  - Estándar de referencia HMG HP.

- Estándar de referencia HCG HP.
- Gradiente Phastgel 8-25% SDS GE Healthcare Código N.º 17-0542-01.
- 5 - Sistema amortiguador en los geles: acetato 0.112 M (ion guía) y Tris 0.112 M, pH 6.5.
- Tiras de amortiguador Phastgel SDS 2 - 3% agarosa GE Healthcare Código N.º 17-0516-01.
- TRIS/HCl p.a.
- 10 - EDTA-Na<sub>2</sub> p.a.
- β-Mercaptoetanol p.a.
- 15 - Amortiguador de muestra: 10 mM de Tris/HCl, 1 mM de EDTA, pH 8.0 + 2.5% SDS, + 5% beta-mercaptoetanol + 0.01% azul de bromofenol.

#### Electroforesis bidimensional:

20 Las muestras de HMG-UP y HMG-HP, y las fracciones intermedias J3 y J3-UP también se caracterizaron por una técnica muy sensible como electroforesis bidimensional que puede separar la muestra de acuerdo con el peso molecular de las diferentes especies presentes en la preparación y también por su pI.

25 En efecto, las proteínas se separaron en una primera dimensión de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI) y a continuación en una segunda dimensión de acuerdo con su peso molecular.

Las muestras se prepararon en amortiguador IEF (7 M de urea, 2 M de Tiourea, 2% de CHAPS, 2% de Triton X-100, 20 mM de DTT, 1% p/v de anfólitos portadores pH 3-10). El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford.

30 Las tiras IPG (7 cm pH 3-10) se rehidrataron durante la noche con 125 µl de amortiguador IEF que contiene 200 µg de proteína.

35 Los geles de dimensión sometieron a prueba inicialmente en un sistema Ettan IPGphor 3 IEF (GE Healthcare) a 20°C con etapas de 500 V durante 30 min, 1000 V durante 30 min, y 5000 V durante 1h 40 min.

40 Después del enfoque, las proteínas se redujeron mediante la incubación de las tiras IPG con 4 ml de amortiguador de equilibrado (EB; 50 mM de Tris-HCl pH 8,8, 6 M de urea, 30% de glicerol, 2% de SDS y 0.01% de azul de bromofenol) y 1% p/v de DTT durante 1 h a RT. Inmediatamente, las proteínas se alquilaron con yodoacetamida 5.5% p/v en 4 ml de amortiguador de equilibrado durante 1 h.

La electroforesis en la segunda dimensión se llevó a cabo en gel de poliacrilamida 15%.

45 Después de la separación 2D los geles se tiñeron con coloración de plata o azul Coomassie.

Los geles se escanearon usando el Image Scanner III (GE Healthcare). La cuantificación de las manchas de proteínas se llevó a cabo usando el software Image Master 2D Platinum versión 7.0.

#### Mapa proteómico

50 Las manchas de muestras obtenidas por electroforesis bidimensional se analizaron por MALDI-TOF MS y se identificaron a partir de bases de datos.

55 Para el análisis por MALDI-TOF MS las proteínas presentes en el gel se digirieron con tripsina (grado de secuencia, Promega) como se describió anteriormente [Hellman, 2000].

60 Los péptidos se extrajeron de los geles usando acetonitrilo acuoso 60% (ACN) que contiene TFA 0.1% y se concentraron por secado al vacío, 1 µl de mezcla de péptidos se mezcló con 1 µl de solución de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en ACN 60% que contiene TFA 0.1%) en la placa de muestra de MALDI. Los espectros de masas de las mezclas de péptidos se obtuvieron en un instrumento 4800 MALDI TOF/TOF (ABi Sciex) en el modo reflector positivo y se calibraron externamente usando una mezcla de estándares de péptidos (Applied Biosystems). Se obtuvieron los espectros MS/MS de disociación inducida por colisión de los iones de péptidos seleccionados.

65 Las proteínas se identificaron con los valores m/z medidos en los modos de adquisición de MS y MS/MS y

utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>). (Los parámetros de búsqueda para cada búsqueda individual se incluyen en el informe de los resultados).

5 Las puntuaciones de proteína significativas ( $p < 0.05$ ) y por lo menos una puntuación significativa de ion péptido ( $p < 0.05$ ) por proteína se utilizaron como criterios para la identificación positiva.

## Resultados

### Producción de la fracción J3-UP por cromatografía multimodal:

10 La cromatografía multimodal se realizó usando un intercambiador aniónico fuerte. Se usó Capto-adhere™ para purificar la bioactividad de LH presente en la fracción J3 que se obtuvo por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Se cargaron 50 mg de fracción J3 en una columna XK 16/40 preparada con Capto-adhere™ (Vol 24 ml) usando un sistema purificador ÄKTA. El gradiente en diferentes etapas se usó para eliminar impurezas.

15 La secuencia de los amortiguadores usados fue:

- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 0 mM NaCl
- 20 - 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 50 mM NaCl
- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 100 mM NaCl
- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 225 mM NaCl
- 25 - 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 300 mM NaCl
- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 1000 mM NaCl

30 La fracción de LH purificada (fracción J3-UP) se obtuvo con 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + amortiguador 225 mM NaCl (figura 2). Como en la figura 2, el área mayor bajo la curva del cromatograma corresponde a la proteína inactiva de LH que eluye tarde en la cromatografía cuando se utiliza un amortiguador de alta molaridad (NaCl 1000 mM). La bioactividad de LH que se recupera en un pequeño pico de proteína eluida con NaCl 225 mM sugiere fuertemente un logro de alta purificación. La bioactividad de LH específica se determinó por bioensayo (ver la tabla 1).

35 El análisis biológico para la bioactividad de LH realizada en las fracciones J3-UP se muestra a continuación. Para el fin comparativo el análisis biológico realizado en el material de partida, fracción J3, se presenta también en la tabla 1.

40 Tabla 1

Fracción	Biopotencia específica de LH (UI LH/mg proteína)	Purificación
J3-UP	58.300	Más de 6 veces
J3	9.400	

45 El rendimiento del proceso determinado por la biopotencia de LH recuperada en la fracción J3-UP fue aproximadamente 80%.

La fracción J3-UP se caracterizó adicionalmente por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) y también por electroforesis bidimensional (figuras 3, 4 y 5).

### SDS-PAGE:

50 El patrón de proteínas de la fracción J3 y la fracción J3-UP se analizaron en un gel de 8-25% en condiciones reductoras y se tiñeron con plata.

55 Como se muestra en la figura 3, la fracción J3 es una fracción muy impura (carril 2). La fracción J3 se purificó



con éxito mediante el Capto-adhere™. En efecto, se obtuvo una fracción muy limpia, fracción J3-UP (carril 4). La fracción J3-UP presenta un patrón electroforético típico que corresponde a hCG (figura 4, carril 2 y carril 3). En efecto, las 2 bandas que aparecen en el SDS-PAGE de la fracción J3-UP corresponden a la cadena alfa y beta de la hCG.

Electroforesis bidimensional

El análisis de la fracción J3-UP de material purificado (figura 2) por electroforesis bidimensional muestra que Capto-adhere™ puede proporcionar un producto solo con las señales de tinción correspondientes a alfa y beta hCG (figura 5) como se determina por espectrometría de masas por *Desorción/ionización láser asistida por matriz* MALDI MS. Por otra parte, la gran cantidad de impurezas presentes en el material de partida (fracción J3) incluso dificulta asignar las bandas correspondientes al componente activo (alfa y beta hCG).

Preparación HMG-UP

La fracción J3-UP purificada por Capto-adhere™ que contiene la bioactividad de LH se utilizó en la etapa de equilibrado para ajustar las actividades de FSH y LH en una relación de aproximadamente 1:1 para obtener HMG-UP. Esta etapa de equilibrado se realizó mediante la mezcla de una cantidad equivalente de la actividad de FSH de la fracción J2 con la bioactividad de LH de la fracción J3-UP.

Las fracciones J2 y J3-UP se descongelaron y se mezclaron en una cantidad de aproximadamente 10.000 UI de FSH y LH, respectivamente, para obtener una preparación de aproximadamente 1:1.

La actividad biológica de FSH y LH de la HMG-UP se determinó como se muestra a continuación. Los resultados para HMG-HP se muestran con fines comparativos.

Tabla 2

Producto	Biopotencia específica de FSH (UI FSH/mg proteína)	Biopotencia específica de LH (UI LH/mg proteína)	Purificación
HMG-UP	8.300	8.200	Aproximadamente 175% más puro
HMG-HP	4.800	4.600	

Aunque el método utilizado en la patente europea EP1169349 B1 permite obtener composiciones de HMG-HP que comprenden potencias de FSH de 3700 UI/mg de proteína y 4300 UI/mg de proteína respectivamente (ver los ejemplos 1 y 2), el método descrito obtiene un valor superior a 8000 UI/mg de proteína IU para ambas hormonas (FSH y LH).

Como se puede apreciar, la HMG-UP presenta una biopotencia de FSH y LH sustancial mayor que la HMG-HP.

Caracterización de HMG-UP por electroforesis bidimensional

La HMG-UP se caracterizó adicionalmente mediante electroforesis bidimensional. Esta técnica es muy sensible y presenta una excelente resolución. En efecto, resulta apta para separar proteínas de acuerdo con sus puntos isoeléctricos en una dimensión y de acuerdo con sus pesos moleculares en la segunda. La HMG-UP y la HMG-HP se sometieron a prueba con fines comparativos.

Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la figura 6.

Como se muestra en la figura 6, en el material de HMG-HP, la electroforesis bidimensional resulta apta para detectar las impurezas que eluyen a un peso molecular de aproximadamente 45.000. Estas manchas están ausentes en la HMG-UP, lo que confirma el mayor grado de pureza de esta preparación. De acuerdo con la identificación por MALDI-TOF MS y los datos de la bibliografía (Bassett, 2009; Kuwabara, 2009), las otras manchas compartidas corresponden a las proteínas bioactivas de la preparación de gonadotropina: beta HCG (MW de aproximadamente 27.000), beta de FSH (MW de aproximadamente 20.000) y la cadena alfa común de FSH/HCG (MW de aproximadamente 17.000). La electroforesis bidimensional confirma que las impurezas se eliminaron con éxito por la cromatografía Capto-adhere™.

La identificación por MALDI-TOF MS de las proteínas de no gonadotropina indicó que la mayoría de las impurezas que se eliminaron corresponden al inhibidor de serina proteasa.

Por último, también se realizaron estudios de proteómica para caracterizar las impurezas que se eliminaron durante la cromatografía Capto-adhere™. Para aumentar la sensibilidad de la identificación, las fracciones de NaCl 300 mM y NaCl 1000 mM enriquecidas en impurezas obtenidas durante la purificación por Capto-adhere™ (figura 2) se analizaron por electroforesis en gel bidimensional seguido por espectrometría de masas. Las principales impurezas que se eliminaron además de inhibidor de serina proteasa plasmática fueron afamina, proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 7, alfa-2-glucoproteína de cinc y albúmina. Este patrón de contaminación no relacionado con las gonadotropinas concuerda con los datos publicados [Bassett; 2009; van der Weijer 2003]. Todas estas impurezas son indetectables en la fracción J3-UP y el producto de HMG-UP final.

Haciendo referencia al diagrama de flujo de la figura 1, considerando las etapas comunes descritas en EP1169349 B1; dicha forma de realización se realiza de la siguiente manera:

El material de partida, en adelante el "material fuente HMG", que se puede utilizar en la presente invención para la obtención de menotropinas ultrapurificadas, constituye la especialidad menotropinas, como se especifica en las farmacopeas (USP XXXV, British Pharmacopeia 2015, volumen III) o cualquier otro material estrechamente relacionado con esta especialidad como se ha descrito en la patente europea EP 1169349 B1. Por lo tanto se entiende que este proceso de preparación también es aplicable a otros materiales que no cumplen estrictamente los requerimientos aplicables a las menotropinas. En efecto, se obtuvieron resultados satisfactorios utilizando la fracción C obtenida en los ejemplos de la patente europea EP 1169349 B1.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para ajustar la relación de FSH: LH cuando sea necesario, por tanto, puede proporcionar la especialidad menotropinas ultrapurificadas incluso cuando se usan materiales de partida que están fuera de la relación de FSH:LH correcta. Así, es posible obtener un producto compuesto de FSH y LH en la relación apropiada 1:1 necesaria para producir la preparación farmacéutica. Las etapas divulgadas se pueden utilizar siguiendo un orden diferente del que se describe en la presente memoria. Igualmente se obtuvieron resultados satisfactorios mediante la inserción de, por ejemplo, la resina de interacción hidrófoba entre las dos etapas de cromatografía de intercambio iónico descritas a continuación.

La orina, el material de partida utilizado en la presente invención para producir menotropinas ultrapurificadas se obtiene esencialmente mediante un método muy bien conocido que utiliza caolín para adsorber las gonadotropinas de la orina de mujer menopáusica/posmenopáusica (BP 1980). Brevemente, la fracción bioactiva se extrae de la orina acidificada con caolín, se eluye con un álcali y se precipita con 2 volúmenes de acetona. A continuación, la fracción bioactiva se extrae de este precipitado con solución al 10% p/v de acetato de amonio en etanol (70%) y precipita con 10% de acetato de amonio en etanol (90%). Se realiza la purificación adicional por cromatografía de intercambio iónico. El material purificado obtenido por este proceso constituye la composición de menotropinas o alguna otra preparación equivalente, como la fracción C obtenida en la patente europea EP 1169349 B1.

#### Etapas de purificación

- 1) purificación de dichas gonadotropinas brutas diluidas en acetato de amonio 0.05-0.15 M, pH 5.0-6.0 en una columna de intercambio iónico con una resina catiónica fuerte del tipo de sulfopropilo, eluyendo las bioactividades de FSH y LH con soluciones de acetato de amonio 0.05-0.5 M, pH 5.0-7.0; y
- 2) purificación de esta fracción diluida en acetato de amonio 0.01-0.05 M, pH 5.0-7.0 en una columna de intercambio iónico con una resina aniónica fuerte del tipo amonio cuaternario, eluyendo FSH y LH con soluciones de acetato de amonio 0.05-0.2 M, pH 5.0-7.0; y
- 3) purificación de gonadotropinas en una columna con una resina de interacción hidrófoba mediante la adición secuencial de las siguientes soluciones: a) amortiguador de fosfato de sodio 50-200 mM, y sulfato de amonio 0.8-1.2 M, pH 5.0-6.0 (impurezas); b) amortiguador de fosfato de sodio 50-200 mM, y sulfato de amonio 0.4-0.6 M; pH 5.0-7.0 (fracción J2) y c) amortiguador de fosfato de sodio 50-200 mM (50-70% v/v), y etanol 96% (50-30 %v/v) (fracción J3).
- 4) purificación de la fracción J3 de gonadotropina con un intercambiador aniónico fuerte con funcionalidad multimodal. La elución se realizó manteniendo el pH constante pero modificando la conductividad del amortiguador. Se seleccionó un amortiguador tris 40 mM a pH en un intervalo de 7 a 10, preferentemente pH 8.5, y se realizó un gradiente en etapas usando NaCl. La bioactividad de LH se eluyó con conductividad baja. Por otra parte, los contaminantes se desorbieron a alta conductividad.

Las resinas del tipo de SP-sefarosa, Q-sefarosa y las resinas de interacción hidrófobas se pueden utilizar en estas etapas. Una resina de interacción hidrófoba preferida es una resina de fenil sefarosa y la resina multimodal es Capto-adhere™.

El proceso comprende además las etapas secundarias de precipitación, centrifugación, ultrafiltración, diálisis, lavado, secado al vacío, y enfriamiento. Descripción del método:

Preparación de la fracción F:

5

La fracción C se somete a cromatografía en una columna cromatográfica que contiene 10 litros de resina de intercambio catiónico fuerte del tipo sulfopropilo.

10

La fracción C (110-140 g) se disuelve en 1600-1800 ml de una solución de acetato de amonio 0.05-0.15 M, pH 5.0-7.0. La columna se somete a prueba y eluye con la cantidad necesaria de solución de acetato de amonio 0.05-0.15 M para llevar el volumen a 20 litros. La elución continúa con soluciones de acetato de amonio 0.15-0.20 M, pH 5.0-7.0 (20 litros) y acetato de amonio 0.2-0.5 M, pH 5.0-7.0 (20 litros). La fracción activa eluida con esta última solución se añade con agitación a 4 volúmenes de etanol 96% y suficiente ácido acético para alcanzar un pH de la mezcla de 5.5-5.7. Se forma un precipitado, se separa por centrifugación, se lava con etanol y se seca al vacío hasta que se elimina el etanol y la humedad es inferior a 5% (fracción F).

15

Preparación de la fracción G

20

La fracción F se somete a cromatografía en una columna cromatográfica que contiene 4 litros de resina de intercambio aniónico fuerte de tipo amonio cuaternario.

25

La fracción F (40 - 60 g en 650 ml) se disuelve en solución de acetato de amonio 0.01 -0.05 M, pH 5.0-7.0, la columna se somete a prueba y eluye con la misma solución para llevar el volumen a 7 litros. La elución continúa con 12 litros de acetato de amonio 0.05-0.07 M, pH 5.0-7.0. A continuación con 10 litros de acetato de amonio 0.07-0.2 M, pH 5.0-7.0. La fracción activa eluida con esta última solución se somete a un proceso de ultrafiltración usando una membrana PM 10 (10000 D) Ultrafilters (Amicon-Millipore). La solución se concentra y se dializa contra amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, pH 5.5-5.7 a una concentración de 2-4 g de proteína en 100-150 ml de amortiguador. A continuación se congela a -75°C (fracción G).

30

Preparación de las fracciones J

35

La fracción G se somete a cromatografía en una columna cromatográfica que contiene 400 ml de una resina de interacción hidrófoba (Phenil Sepharose HP, Amersham-Pharmacia Biotech).

Una cantidad suficiente de sulfato de amonio se añade a la solución de la fracción G para obtener una concentración de 0.8-1.2 M.

- Poner la solución de la fracción G en la columna cromatográfica.

40

- Eluir con 2 volúmenes de amortiguador fosfato de sodio 50-200 mM, sulfato de amonio 0.8-1.2 M, pH 5.0-7.0.

45

- Continuar la elución con 2 volúmenes de amortiguador fosfato de sodio 50-200 mM, sulfato de amonio 0.4-0.6, pH 5.0-7.0 y finalmente con 2 volúmenes de amortiguador fosfato 50-200 mM (50-70% v/v) y etanol 96% (50-30 %v/v).

La fracción activa eluida con amortiguador fosfato de sodio 50-200 mM, sulfato de amonio 0.4-0.6 M (fracción J2) se congela a -75°C. Esta fracción tiene principalmente actividad FSH.

50

La fracción activa eluida con amortiguador fosfato 50-200 mM (50-70 % v/v) y etanol 96% (50-30 % v/v) (fracción J3) se congela a -75°C. Esta fracción únicamente presenta una bioactividad de LH.

Preparación de la fracción J3-UP

55

La fracción J3 se somete a cromatografía en una columna cromatográfica que contiene 24 ml de un intercambiador aniónico fuerte con funcionalidad multimodal (Capto-adhere™, GE). Se seleccionó un amortiguador tris 40 mM a pH 7 a 10, preferentemente pH 8.5, y se realizó un gradiente en etapas usando NaCl.

60

La bioactividad de LH se eluyó a conductividad baja. Por otra parte, los contaminantes se resorbieron a conductividad alta. Se realizó una elución escalonada usando menos de 30 mM, preferentemente 0 mM; 30 mM a 75 mM, preferentemente 50 mM; 75 mM a 180 mM, preferentemente 100 mM; 180 mM a 250 mM, preferentemente 225 mM; 250 mM a 700 mM, preferentemente 300 mM y 700 mM a 1500 mM, preferentemente 1000 mM de NaCl en amortiguador tris 40 mM a pH 7 a 10, preferentemente pH 8.5.

65

La fracción bioactiva de LH (J3-UP) se eluyó con NaCl 225 mM.

La fracción J3-UP se congela a  $-75^{\circ}\text{C}$ . Esta fracción únicamente presenta bioactividad de LH.

Etapa de equilibrado:

5 La HMG-UP se obtiene mediante la mezcla de actividades equivalentes de FSH (fracción J2) y LH (fracción J3-UP) para presentar una relación 1:1 de ambas hormonas.

#### Ejemplos de lotes producidos por la técnica descrita

10 1.1 Preparación de la fracción F

Se dividieron 231.2 g de la fracción C en dos porciones iguales y se sometieron a cromatografía en dos procesos equivalentes en una columna cromatográfica como se describió anteriormente.

15 Se disolvieron 115.6 g de la fracción C (en cada proceso) en 1700 ml de amortiguador acetato de sodio 0.05 M, pH 5.0 La columna se sometió a prueba y eluyó con 18.7 litros adicionales del mismo amortiguador cromatográfico. La elución se continuó con 20 litros de amortiguador de acetato de amonio 0.15 M, pH 5.0 y finalmente con 20 litros de amortiguador de acetato de amonio 0.5 M, pH 5.0 La fracción activa obtenida por elución con acetato de amonio 0.5 M (22 litros) se añadió con agitación a una solución de 88 litros de etanol 96% y 2400 ml de ácido acético. El pH de la mezcla fue 5.7. El precipitado obtenido se dejó en el refrigerador ( $2.8^{\circ}\text{C}$ ) durante la noche. El precipitado se centrifugó, se lavó con etanol 96% y se secó al vacío durante 17 h.

25 En cada uno de los dos procesos equivalentes, se obtuvieron dos fracciones F de 20.7 g y 19.5 g, respectivamente.

1.2 Preparación de la fracción G

30 Las dos fracciones F obtenidas en la etapa anterior se juntaron y se sometieron a cromatografía en la columna de acuerdo con la técnica descrita.

35 Se disolvieron 40.2 g de la fracción F en 650 ml de amortiguador de acetato de amonio 0.01 M, pH 5.0. La columna se sometió a prueba con esta solución y se eluyó con 6350 ml del mismo amortiguador de dilución. La elución continuó posteriormente con 12 litros de acetato de amonio 0.05 M, pH 5.0 y a continuación con 10 litros de acetato de amonio 0.2 M, pH 5.0. La fracción activa (4500 ml) eluida con esta última solución se sometió a un proceso de ultrafiltración utilizando una membrana PM 10 (10000 D) Diaflo Ultrafilters (Amicon-Millipore). La solución se concentra y dializa contra fosfato de sodio 50 mM, pH 5.7 para obtener una concentración de 2-4 g de proteína en 150 ml de amortiguador. La solución final (400 ml) se congeló a  $-75^{\circ}\text{C}$ .

40 La fracción G se analiza biológicamente en los animales y se detecta una potencia de FSH de 42.000 UI/ml y potencia de LH de 33.780 UI /ml. Con este resultado, una porción de la solución (80 ml) de la fracción G se procesó en condiciones para separar FSH y LH (fracciones J2 y J3 respectivamente).

1.3 Preparación de las fracciones J

45 1) Preparación de las fracciones J2 (bioactividad de FSH) y J3 (bioactividad de LH)

50 El sulfato de amonio se añadió a una alícuota de la fracción G (80 ml) hasta una concentración 1 M. Esta solución se sometió a prueba en una columna cromatográfica de fenil-sefarosa HP y se eluyó con 2 volúmenes de amortiguador, fosfato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 1 M, pH 5.1. La elución continuó con 2 volúmenes de amortiguador, fosfato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0.5 M, pH 5.1, y finalmente con 2 volúmenes de amortiguador fosfato de sodio 50 mM (60% v/v) y etanol 96% (40% v/v)

55 La fracción bioactiva de FSH se eluyó con amortiguador, fosfato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0.5 M, pH 5 (fracción J2) se dializó y concentró usando ultrafiltración en membrana PM 10 (Diaflo Ultrafilters, Amicon-Millipore), contra un amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, pH 5.7, y a continuación se congeló a  $-75^{\circ}\text{C}$ .

60 La fracción bioactiva de LH se eluyó con amortiguador fosfato de sodio 50 mM (60% v/v) y etanol 96% (40% v/v) (fracción J3) se dializó y concentró utilizando ultrafiltración en membrana PM 10 (Diaflo Ultrafilters, Amicon-Milhpore), contra un amortiguador de fosfato de sodio 50 mM amortiguador, pH 5.7, y a continuación se congeló a  $-75^{\circ}\text{C}$ .

Fracción J3-UP

65 Se dializaron 50 mg de la fracción J3 contra el amortiguador tris 40 mM, pH 8.5 y se cargaron en una columna

XK 16/40 preparada con Capto-adhere™ (Vol 24 ml) utilizando un sistema purificador ÄKTA. El gradiente en diferentes etapas se utilizó para eliminar las impurezas.

La secuencia de los amortiguadores y volúmenes de elución fueron:

- 5
- 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 0 mM NaCl: 1 volumen
  - 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 50 mM NaCl: 3 volúmenes

10

  - 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 100 mM NaCl: 3 volúmenes
  - 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 225 mM NaCl: 5 volúmenes

15

  - 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 300 mM NaCl: 5 volúmenes
  - 40 mM amortiguador tris a pH 8.5 + 1000 mM NaCl: 3 volúmenes

20 La fracción de LH purificada (fracción J3-UP) se obtuvo con 40 mM de amortiguador tris a pH 8.5 + 225 mM de amortiguador NaCl (figura 2). El área principal bajo la curva del cromatograma corresponde a la proteína inactiva de LH que eluye con 1000 mM de NaCl. La bioactividad de LH que se recupera en un pico de proteína pequeño eluida con 225 mM de NaCl sugiere fuertemente un logro de purificación alta. La bioactividad de LH específica se determinó con un bioensayo (ver tabla 1). Se obtuvo una purificación de más de 6 veces de la biopotencia (de 9.400 UI LH/mg proteína a 58.300 UI LH/mg proteína).

25 El rendimiento del proceso determinado por la biopotencia de LH recuperada en la fracción J3-UP fue aproximadamente 80%.

Etapas de equilibrado para obtener HMG-UP:

30 Finalmente, para producir HMG-UP que requiere una relación de FSH: LH de 1:1, se realizó una etapa de equilibrado para ajustar el contenido de ambas hormonas. Se mezclaron cantidades equivalentes de bioactividad de FSH de la fracción J2 y bioactividad de LH de la fracción J3-UP. La solución mixta se filtró de manera estéril, nanofiltró y precipitó.

### 35 Conclusiones

La HMG-HP urinaria aún contiene proteínas no relacionadas con las gonadotropinas como contaminantes.

40 La cromatografía multimodal realizada con una resina Capto-adhere™ se introdujo para eliminar eficientemente las proteínas contaminantes de la fracción J3 que produce una fracción llamada fracción J3-UP. Las proteínas no gonadotropinas tales como el inhibidor de serina proteasa en plasma, afamina, proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 7, alfa-2-glicoproteína de cinc y albúmina durante el método de purificación anterior. Estas impurezas se adsorben fuertemente a la columna eluyendo a continuación en la cromatografía. Curiosamente, la fracción J3-UP muestra un área menor bajo la curva en el cromatograma, lo que indica el alto grado de purificación de la bioactividad LH.

45

50 La fracción J3-UP obtenida por Capto-adhere™ se analizó para determinar su biopotencia LH. La bioactividad de LH específica confirma la purificación con éxito de esta hormona. La biopotencia de esta fracción fue aproximadamente 58.300 UI de LH por mg de proteína que representa un aumento de más de 6 veces de este parámetro cuando se compara con la actividad de la fracción J3 (9.400 UI LH por mg de proteína). De la misma manera, la electroforesis bidimensional confirma el alto grado de pureza de la fracción J3-UP obtenida con Capto-adhere™.

55 La HMG-UP se obtuvo en una etapa de equilibrado mediante la mezcla de la fracción J2 (fracción de bioactividad de FSH) y fracción J3-UP (fracción de bioactividad de LH).

60 El material de HMG-UP muestra un aumento significativo en la biopotencia específica de FSH y LH. En efecto, los valores de hasta 8.200 UI por mg de proteína para la FSH y LH que se obtuvieron representan un aumento de casi 175% en comparación con los mismos parámetros determinados en el material de HMG-HP.

La caracterización del patrón cromatográfico por una técnica sensible como gel 2D confirma el mayor grado de pureza de la HMG-UP sin otras impurezas detectables.

65 Finalmente, el proceso de fabricación propuesto introduce un método cromatográfico único y simple que se puede utilizar en una escala industrial para aumentar la pureza de las gonadotropinas urinarias.

Referencias

- 5 ASRM Practice Committee, *Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives*, Fertility and Sterility, 90, Suppl. 3, S13, (2008).
- Bradford MM., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54 (1976).
- 10 Basset R, Lispi M, Ceccarelli D, Grimaldi L, Mancinelli M, Martelli F, Van Dorsselaer A., *Analytical identification of additional impurities in urinary-derived gonadotrophins*, Reproductive BioMedicine Online Vol 19. No.3, 300-313(2009).
- 15 Hartree EF, *Determination of Proteins: A modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response*, Anal Biochem 48: 422-427, (1972).
- Hellman U. *Sample preparation by SDS-PAGE and in-gel digestion*, In Jollès P, Jörnvall H (Eds). *Proteomics in functional genomics. Protein structure analysis*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag. 43-54 (2000).
- 20 Kuwabara Y, Mine K, Katayama A, Inagawa T, Akira S, Takeshita T., *Proteomic analyses of recombinant human follicle-stimulating hormone and urinary-derived gonadotropin preparations*, J Reprod Med. Aug;54(8):459-66 (2009).
- 25 Lispi M, Basset R, Crisci C et al. *Comparative assessment of the consistency and quality of a highly purified FSH extracted from human urine (urofollitropin) and a recombinant human FSH (follitropin alpha)* Reproductive BioMedicine Online 13, 179-193, (2006).
- 30 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R.J., *Protein Measurement with the Folin Fenol Reagent*, J Biol Chem. 193(1):265-75(1951).
- 35 Van de Weijer Berthm, Mulders John, Bos Ebo, Verhaert Peter, Van den Hooven Henno W., *Compositional analyses of human menopausal gonadotrophin preparation extracted from urine (Menotropin). Identification of some of its major impurities*, Reproductive BioMedicine Online Vol 7. No. 5, 547-557, (2003).
- EP1169349 B1, Instituto Massone S.A., 28/03/2007.

## REIVINDICACIONES

1. Proceso para obtener una composición de HMG-UP (gonadotropina menopáusica humana con grado de ultrapureza) mediante la eliminación de contaminantes no gonadotropina como inhibidor de serina proteasa plasmática, afamina, proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina 7, alfa-2-glicoproteína de cinc y albúmina, caracterizado por que comprende las etapas de:
- i) realizar un tratamiento de una orina menopáusica/posmenopáusica humana acidificada con caolín en el que las gonadotropinas y las proteínas no gonadotropina presentes en la orina se adsorben en caolín;
  - ii) eluir las gonadotropinas adsorbidas en caolín por elución alcalina que se separan en una fracción;
  - iii) precipitar la fracción con acetona para obtener la fracción A;
  - iv) una fracción bioactiva se extrae de esta fracción A precipitada con una solución a 10% p/v de acetato de amonio en etanol (70%) y precipita con acetato de amonio a 10% en etanol (90%) para obtener la fracción B;
  - v) realizar una purificación de la fracción B por cromatografía de intercambio iónico para obtener una fracción C (material fuente de HMG o equivalente);
  - vi) realizar una purificación de la fracción C por cromatografía de intercambio catiónico utilizando una resina catiónica fuerte, eluyendo con acetato de amonio;
  - vii) precipitar en un medio ácido para obtener una fracción F a partir del eluido obtenido anteriormente;
  - viii) purificación de la fracción F por cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina aniónica fuerte, eluyendo con acetato de amonio para obtener una fracción G;
  - ix) purificar las gonadotropinas obtenidas en la fracción G utilizando una cromatografía de interacción hidrófoba por adición secuencial de amortiguadores que contiene una concentración decreciente de sulfato de amonio, fracciones J2 y J3, en el que la fracción J2 presenta principalmente una bioactividad de FSH y la fracción J3 presenta una bioactividad de LH;
  - x) purificar la gonadotropina de la fracción J3 utilizando un intercambiador aniónico fuerte con funcionalidad multimodal, eluyendo con un amortiguador a un pH constante pero modificando la conductividad obteniendo una fracción J3-UP que presenta únicamente una actividad de LH;
  - xi) obtener una fracción HMG-UP en una etapa de equilibrado mezclando las bioactividades equivalentes de FSH en la fracción J2 y LH en la fracción J3-UP;
  - xii) someter dicha solución de fracción HMG-UP a las etapas de:
    - 1) filtrar de manera estéril,
    - 2) nanofiltrar, y
    - 3) precipitar;

para obtener una composición de HMG-UP (gonadotropina menopáusica humana con grado de ultrapureza) libre de contaminantes no gonadotropina inhibidor de proteasa, afamina, proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina 7, alfa-2-glicoproteína de cinc y albúmina.

Diagrama de flujo para obtener gonadotropinas ultrapurificadas

Figura 1

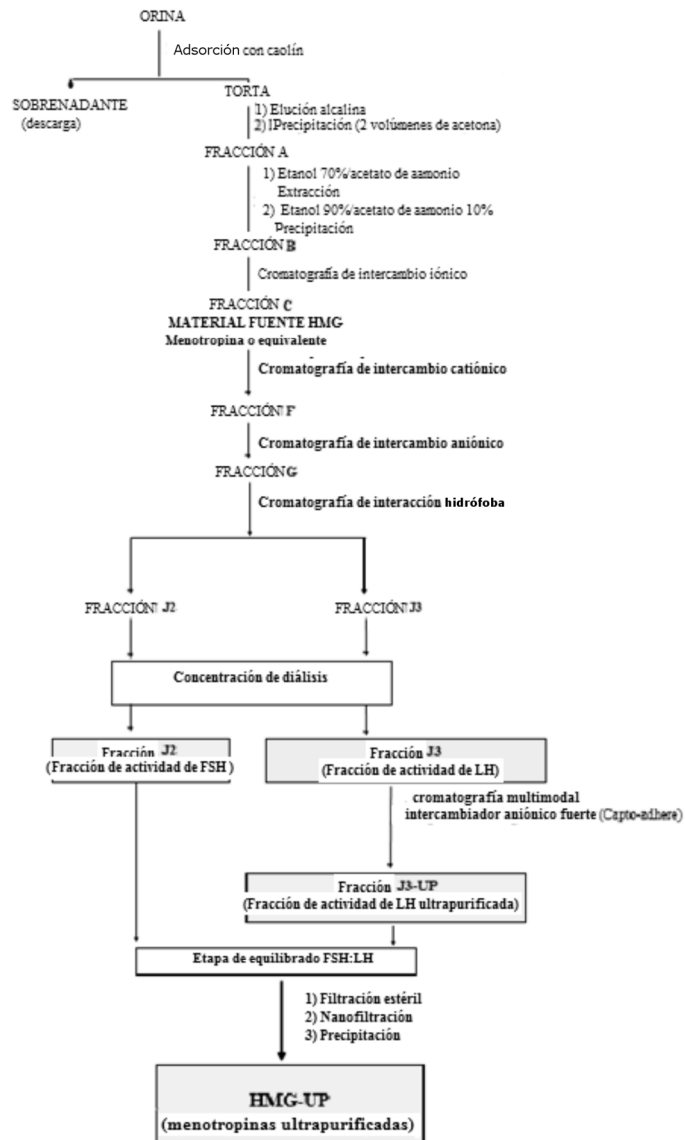




Figura 2

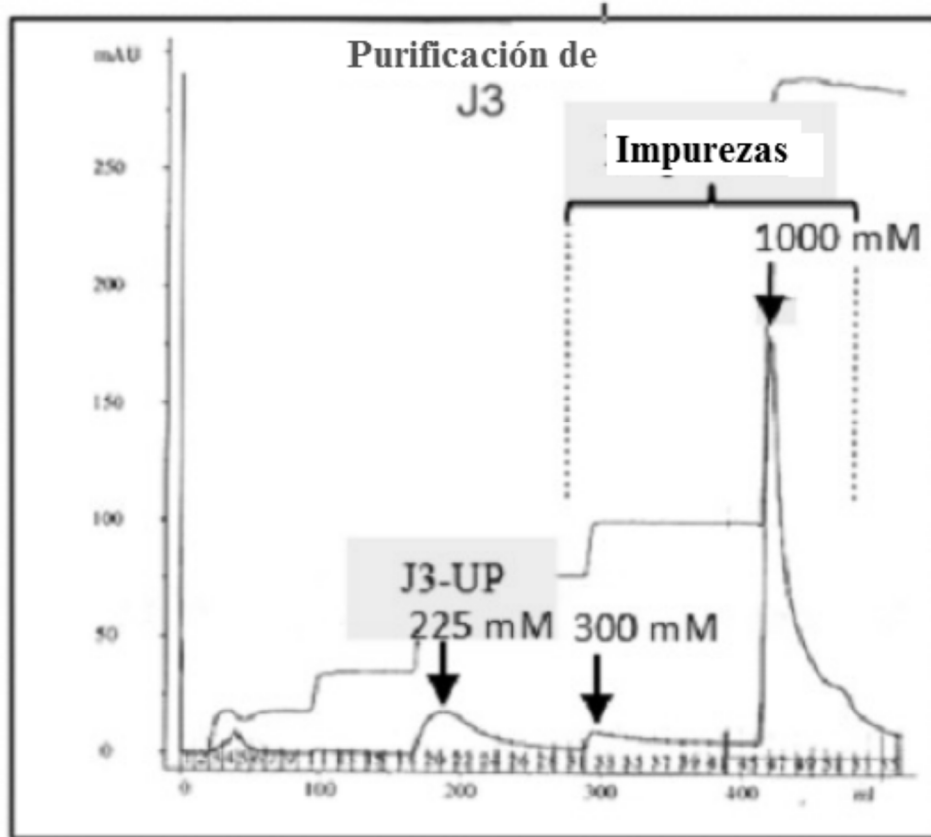
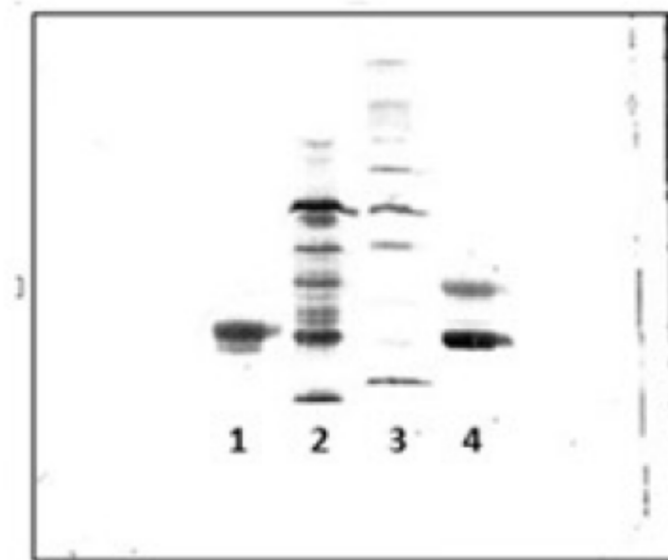


Figura 3



***Referencias:***

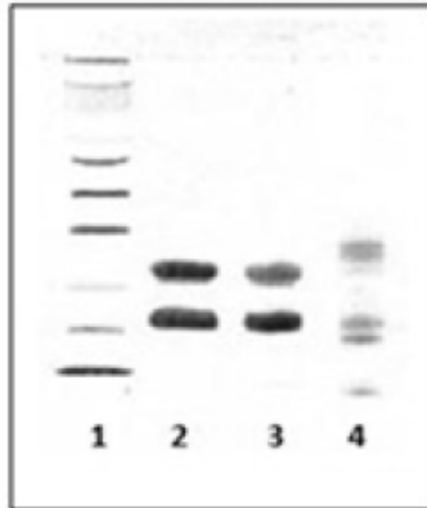
Carril 1: Est. Ref FSH-HP, 1,4 mg/ml

Carril 2: Fracción J3, 1,4 mg/ml

Carril 3: est. LMW

Carril 4: J3-UP, 1,4 mg/ml

Figura 4



**Referencias:**

**Carril 1: LMW GE Healthcare**

**Carril 2: Est. Ref HCG 2 mg/ml**

**Carril 3: Fracción I3-UP, 2 mg/ml**

**Carril 4: Fracción de impurezas obtenidas  
de capto-adhere, 2 mg/ml**

Figura 5

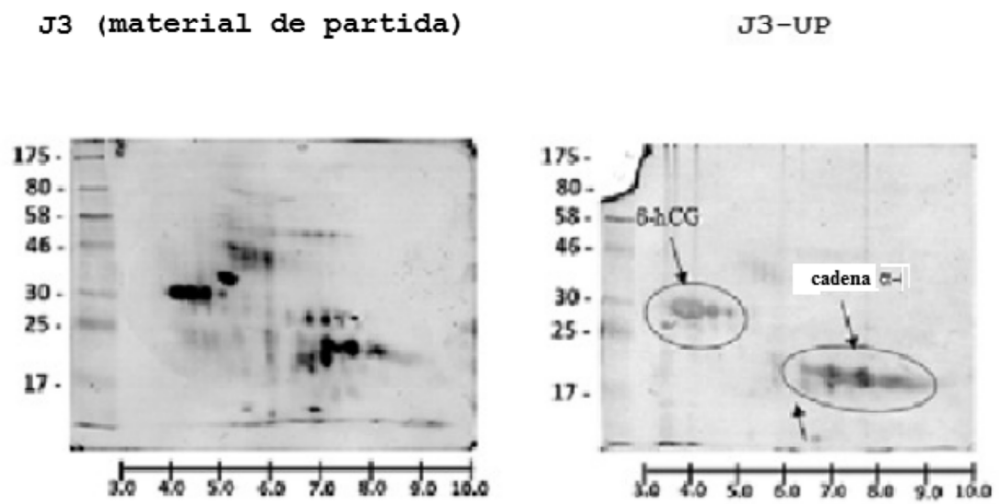


Figura 6

