

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 860**

51 Int. Cl.:

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 14/59 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2016 PCT/EP2016/064668**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16207353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2016 E 16734237 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3313859**

54 Título: **Métodos de purificación y/o inactivación viral**

30 Prioridad:

26.06.2015 EP 15174029

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

03.07.2020

73 Titular/es:

**FERRING BV (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL**

72 Inventor/es:

**AHARONOV, JENNY;
EREZ, ELINOR y
HAROSH, ELI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 770 860 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

Métodos de purificación y/o inactivación viral

La presente invención se refiere a métodos de purificación de glucoproteínas (o productos glucoproteicos) y/o métodos de desactivación viral de glucoproteínas (o productos glucoproteicos). Las proteínas/gucoproteínas pueden ser, por ejemplo, glucoproteínas recombinantes tales como FSH, hCG o LH, producidas en células hospedadoras. Las proteínas/gucoproteínas pueden obtenerse de la orina.

Brodsky *et al.* (2012) *Biotechnology and Bioengineering* 1009(10):2589-2598 divulgan un método de precipitación con ácido caprílico para reducir impurezas y eliminar virus durante la purificación de anticuerpos.

Se utilizan muchas glucoproteínas en los tratamientos terapéuticos. Por ejemplo, las gonadotropinas son una clase de glucoproteínas que son útiles para el tratamiento de la infertilidad. Las gonadotropinas son un grupo de hormonas glucoproteicas heterodiméricas que regulan la función de las gónadas en el sexo masculino y femenino. Incluyen la hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés), la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) y la gonadotropina coriónica (CG, por sus siglas en inglés).

Las FSH y hCG extraídas de la orina de mujeres embarazadas y posmenopáusicas se han utilizado durante muchos años en el tratamiento de la infertilidad. La producción de FSH y hCG extraídas de la orina conlleva la recogida de procesamiento de grandes cantidades de orina.

Como una alternativa a los productos obtenidos de la orina, hay disponibles versiones recombinantes de la FSH y hCG. Los productos aprobados en la actualidad (Gonal-F, Ovitrelle de Merck Serono; Puregon de MSD) se producen (expresan) en células de ovario de hámster chino (CHO).

Los presentes solicitantes han desarrollado una FSH recombinante y una hCG recombinante, y ambas de las cuales se expresan en una línea celular PER.C6®. El producto de tipo FSH obtenido a partir de la línea celular PER.C6®, y los métodos para su producción, se divulgan en la solicitud de patente internacional N.ºs PCT/GB2009/000978 (publicada como WO2009/127826A) y PCT/EP2012/065507 (publicada como WO2013/020996). Este producto (FE999049) ha completado los ensayos clínicos de fase III en Europa. El producto de tipo hCG recombinante obtenido a partir de la línea celular PER.C6®, y un método para su producción, se divulgan en el documento PCT/GB2010/001854 (publicado como WO2011/042688).

Los presentes solicitantes han desarrollado técnicas que se pueden utilizar para la purificación de, por ejemplo, FSH recombinante y hCG recombinante producidas en líneas de células de mamíferos (por ejemplo, la FSH recombinante divulgada en el documento WO2009/127826A y el documento WO2013/020996, y la hCG recombinante divulgada en el documento WO 2011/042688).

De acuerdo con la presente divulgación, en un primer aspecto se proporciona un método de purificación de una glucoproteína [por ejemplo, una glucoproteína recombinante, una gonadotropina (por ejemplo, recombinante), una FSH, hCG o LH (por ejemplo, recombinante)], comprendiendo el método un paso de tratamiento de la glucoproteína [por ejemplo, una glucoproteína recombinante, una gonadotropina (por ejemplo, recombinante), una FSH, hCG o LH (por ejemplo, recombinante)] con una combinación de ácido caprílico y etanol.

El método puede comprender tratar una solución de la glucoproteína [por ejemplo, en agua, tampón u otro medio (por ejemplo, un tampón; acetato de amonio 100 mM, NaCl 30-50 mM, pH 9-pH 9,5)] con una combinación de ácido caprílico y etanol. El método puede comprender tratar una solución de la glucoproteína en un tampón (por ejemplo, tampón de acetato de amonio) a pH de 6,5 a 12, por ejemplo, pH de 7,5 a 10, por ejemplo, pH de 9 a 9,5.

El paso de tratar la glucoproteína con una combinación de ácido caprílico y etanol puede tener lugar a pH ácido, por ejemplo, de pH 2 a pH 6,5, por ejemplo, de pH 3 a pH 6,5, por ejemplo, de pH 4 a pH 6 (por ejemplo, pH 5,5 ± 0,1) preferentemente, de pH 4,5 a pH 5,5]. El uso de condiciones ácidas (por ejemplo, pH 4 – pH 6) se debe a la actividad del ácido caprílico. El ácido caprílico puede inactivar los virus con envoltura al alterar la membrana del virus; esto es posible gracias a la forma no cargada del ácido caprílico, que puede penetrar en la membrana hidrófoba del virus. El ácido caprílico no está cargado a un pH que está cercano a su pKa (pH 4,9). Con un ΔpH de 1 unidad (~pH 5,9), un 100% de las moléculas de ácido caprílico tienen carga negativa y, por lo tanto, son menos eficaces para la inactivación viral.

La glucoproteína puede ser una proteína recombinante o una proteína procedente de la orina. La glucoproteína puede ser una gonadotropina, por ejemplo, FSH, hCG o LH. La glucoproteína puede ser una glucoproteína recombinante, por ejemplo, una gonadotropina recombinante, por ejemplo, FSH, hCG o LH recombinante. Preferentemente, la glucoproteína es una glucoproteína recombinante (por ejemplo, gonadotropina recombinante, por ejemplo, FSH, hCG o LH recombinante) producida en una célula (línea celular) mediante un método que comprende cultivar la célula (línea celular) en un medio adecuado y recolectar la glucoproteína recombinante de dicha célula (línea celular) y/o dicho medio (por ejemplo, recolectar la proteína recombinante del sobrenadante del

cultivo celular). La célula (línea celular) puede ser una célula (línea celular) de mamíferos, por ejemplo, una célula (línea celular) CHO, una célula (línea celular) PER.C6®, una célula (línea celular) HEK293, una célula (línea celular) HT1080, una célula (línea celular) COS, una célula (línea celular) NOS, una célula (línea celular) Sp20, etc. Preferentemente la una célula (línea celular) es una célula (línea celular) PER.C6®.

- 5 Las glucoproteínas (gonadotropinas, FSH, hCG, LH, etc.), ya sean urinarias o recombinantes, se encuentran por lo general en forma de una solución/suspensión en un medio. La glucoproteína puede estar presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas, como se sabe en la técnica. En la presente los términos proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc., engloban una solución o suspensión que comprende la proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc. En la presente, los términos proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc., engloban una solución o suspensión que comprende la proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc., donde la proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc. está presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas. Por lo tanto, el término FSH engloba una solución o suspensión que comprende FSH (por ejemplo, donde FSH está presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas).
- 10
- 15 En la presente, la frase "tratar la proteína (una glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc.) con una combinación de ácido caprílico y etanol" se refiere a la aplicación de tanto ácido caprílico como etanol a la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc.) de manera que la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc.) esté expuesta tanto al ácido caprílico como al etanol a la vez. Por lo tanto, esta frase engloba técnicas donde se añaden ácido caprílico y etanol, ya sea como una mezcla o como dos reactivos independientes, a una solución de la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc.), de manera que la solución se convierta en una mezcla de ácido caprílico, etanol y la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc.); esta frase también engloba otras técnicas en las que tanto el ácido caprílico como el etanol actúan a la vez en la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH, etc.).
- 20

- 25 Para los solicitantes resultado sorprendente observar que tratar una solución que contiene proteína/glucoproteína recombinante (por ejemplo, FSH recombinante, hCG recombinante) con etanol y ácido caprílico, por ejemplo, una combinación de ácido caprílico 20 mM/30% de etanol, a pH ácido, puede conllevar la desnaturalización de algunos virus (lo que provoca su inactivación) y/o precipitación de otros virus y proteínas de la célula hospedadora (impurezas). La solución se puede centrifugar o filtrar a continuación (para eliminar los virus y/o proteínas de la célula hospedadora que han precipitado, por ejemplo, utilizando un filtro de lecho profundo tal como un filtro de vidrio), de manera que el sobrenadante incluya la glucoproteína (por ejemplo, FSH recombinante, hCG recombinante) purificada para un posterior procesamiento y uso. Los solicitantes han observado que el tratamiento de una solución que contiene la glucoproteína recombinante (por ejemplo, FSH recombinante, hCG recombinante) con etanol y ácido caprílico puede (i) inactivar virus con envoltura; y/o (ii) eliminar virus sin envoltura por precipitación (el virus precipitado se puede retirar entonces mediante un paso posterior de centrifugación o filtración mediante, por ejemplo, un filtro de fibra de vidrio); y/o (iii) retirar las proteínas relacionadas con el hospedador mediante precipitación (las proteínas relacionadas con el hospedador precipitadas se pueden retirar mediante un paso posterior de centrifugación o filtración mediante, por ejemplo, un filtro de fibra de vidrio). Este tratamiento y proceso de filtración relativamente simple proporciona una retirada notable de impurezas (en este proceso se retiran de un 64% a un 79% de las impurezas relacionadas con el hospedador) con una pérdida mínima de glucoproteína producto (es decir, rendimiento elevado).
- 30
- 35
- 40

- 45 El uso de ácido caprílico y etanol (en, por ejemplo, purificación/inactivación viral de FSH recombinante y/o hCG recombinante) tiene otras ventajas. En primer lugar, la combinación de ácido caprílico y etanol puede acortar el proceso de purificación debido a que el paso único puede tener una función doble: inactivación viral y precipitación, así como también la precipitación de las proteínas de la célula hospedadora. En segundo lugar, tal como se ha descrito anteriormente, el ácido caprílico tiene su actividad máxima en lo que se refiere a la inactivación viral a un pH ~4,9, pero este pH bajo podría en teoría dañar el producto de tipo FSH recombinante (por la disociación de la molécula, etc.). De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch, a pH 5,5 aproximadamente un 20% del AC no tiene carga, lo que proporciona un buen equilibrio de inactivación viral y reducción del riesgo del daño a la FSH recombinante; la adición de EtOH (por ejemplo, 30% de EtOH) compensa la pérdida de actividad del ácido caprílico en estas condiciones, que son menos nocivas para la proteína. En último lugar, la combinación de ácido caprílico/EtOH permite el uso de una concentración menor de EtOH (por ejemplo, 30%), lo que es extremadamente importante en el proceso de producción, debido a problemas de seguridad.
- 50

- 55 La concentración de ácido caprílico puede ser ácido caprílico de 10 mM a 30 mM, por ejemplo, ácido caprílico de 18 mM a 25 mM, por ejemplo, ácido caprílico de 19 mM a 23 mM, por ejemplo, ácido caprílico 20 mM. El EtOH puede ser de un 20% a un 50% de EtOH, por ejemplo, de un 25% a un 50% de EtOH, por ejemplo, de un 30% a un 50% de EtOH, por ejemplo, un 30% de EtOH. El método puede comprender un paso de tratar la glucoproteína con de un 30% a un 50% de etanol y ácido caprílico de 18 mM a 25 mM, por ejemplo, ácido caprílico 20 mM y 30% de etanol.

El método puede comprender tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una incubación de 1 minuto a 6 h a una temperatura de 23 ± 2 °C con agitación (por ejemplo, para la inactivación viral, donde se observa

precipitación), por ejemplo, tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una incubación de 0,5 a 1 h a una temperatura de 23 ± 2 °C con agitación (por ejemplo, para la inactivación viral, donde se observa precipitación). El método puede comprender tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico a una temperatura de 4-8 °C durante una incubación de 1 minuto a 32 h, sin agitación (este paso puede continuar/permitir la precipitación de las proteínas de la célula hospedadora (PCH) y virus sin envoltura), por ejemplo, tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico a una temperatura de 4-8 °C durante una incubación de 14 h a 16 h, sin agitación (este paso puede continuar/permitir la precipitación de PCH y virus sin envoltura). En un ejemplo preferido, el método comprende tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una incubación de 0,5 a 1 h a una temperatura de 23 ± 2 °C con agitación, seguida por una reducción hasta una temperatura de 4-8 °C e incubación posterior durante 16 ± 2 horas, por ejemplo, de 14 h a 16 h, sin agitación.

El método puede comprender tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una duración de 1 h \pm 10 min a un pH de $5,5 \pm 0,1$ y a una temperatura de 23 ± 2 °C.

El método puede comprender un paso adicional de centrifugar o filtrar la (solución de) glucoproteína tras el tratamiento con ácido caprílico y etanol (por ejemplo, a través de un filtro de lecho profundo, por ejemplo, un filtro de fibra de vidrio).

El método puede comprender un paso adicional de concentrar la (solución de) glucoproteína hasta la concentración (de glucoproteína) deseada y/u otros pasos de purificación/formulación (por ejemplo, posteriores).

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona un método de inactivación viral de una glucoproteína [por ejemplo, una glucoproteína recombinante, una gonadotropina (por ejemplo, recombinante), una FSH, hCG o LH (por ejemplo, recombinante)], comprendiendo el método un paso de tratar la glucoproteína [por ejemplo, una glucoproteína recombinante, una gonadotropina (por ejemplo, recombinante), una FSH, hCG o LH (por ejemplo, recombinante)] con una combinación de ácido caprílico y etanol.

El método puede comprender tratar una solución de la glucoproteína [por ejemplo, en agua, tampón u otro medio (por ejemplo, un tampón; acetato de amonio 100 mM, NaCl 30-50 mM, pH 9-pH 9,5)] con una combinación de ácido caprílico y etanol. El método puede comprender tratar una solución de la glucoproteína en un tampón (por ejemplo, tampón de acetato de amonio) a un pH de 6,5 a 12, por ejemplo, pH de 7,5 a 10, por ejemplo, pH de 9 a 9,5.

El paso de tratar la glucoproteína con una combinación de ácido caprílico y etanol puede tener lugar a pH ácido, por ejemplo, de pH 2 a pH 6,5, por ejemplo, de pH 3 a pH 6,5, por ejemplo, de pH 4 a pH 6 (por ejemplo, pH $5,5 \pm 0,1$) preferentemente, de pH 4,5 a pH 5,5]. El uso de condiciones ácidas (por ejemplo, pH 4 – pH 6) se debe a la actividad del ácido caprílico. El ácido caprílico puede inactivar los virus con envoltura al alterar la membrana del virus; esto es posible gracias a la forma no cargada del ácido caprílico, que puede penetrar en la membrana hidrófoba del virus. El ácido caprílico no está cargado a un pH que está cercano a su pKa (pH 4,9). Con un Δ pH de 1 unidad (\sim pH 5,9), un 100% de las moléculas de ácido caprílico tienen carga negativa y, por lo tanto, son menos eficaces para la inactivación viral.

La concentración de ácido caprílico puede ser ácido caprílico de 10 mM a 30 mM, por ejemplo, ácido caprílico de 18 mM a 25 mM, por ejemplo, ácido caprílico de 19 mM a 23 mM, por ejemplo, ácido caprílico 20 mM. El EtOH puede ser de un 20% a un 50% de EtOH, por ejemplo, de un 25% a un 50% de EtOH, por ejemplo, de un 30% a un 50% de EtOH, por ejemplo, un 30% de EtOH. El método puede comprender un paso de tratar la glucoproteína con de un 30% a un 50% de etanol y ácido caprílico de 18 mM a 25 mM, por ejemplo, ácido caprílico 20 mM y 30% de etanol.

El método puede comprender tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una incubación de 1 minuto a 6 h a una temperatura de 23 ± 2 °C con agitación, por ejemplo, tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico durante una incubación de 0,5 a 1 h a una temperatura de 23 ± 2 °C con agitación. El método puede comprender tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico a una temperatura de 4-8 °C durante una incubación de 1 minuto a 32 h, sin agitación, por ejemplo, tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico a una temperatura de 4-8 °C durante una incubación de 14 h a 16 h, sin agitación. En un ejemplo preferido, el método comprende tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una incubación de 0,5 a 1 h a una temperatura de 23 ± 2 °C con agitación, seguida por una reducción hasta una temperatura de 4-8 °C e incubación posterior durante de 14 h a 16 h, sin agitación.

El método puede comprender tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una duración de 1 h \pm 10 min a un pH de $5,5 \pm 0,1$ y a una temperatura de 23 ± 2 °C.

El método puede comprender un paso adicional de centrifugar o filtrar la (solución de) glucoproteína tras el tratamiento con ácido caprílico y etanol (por ejemplo, a través de un filtro de fibra de vidrio).

El método puede comprender un paso adicional de concentrar la (solución de) glucoproteína hasta la concentración (de glucoproteína) deseada y/u otros pasos de purificación/formulación (por ejemplo, posteriores).

La glucoproteína puede ser una proteína recombinante o una proteína procedente de la orina. La glucoproteína puede ser una gonadotropina, por ejemplo, FSH, hCG o LH.

5 La glucoproteína puede ser una glucoproteína recombinante, por ejemplo, una gonadotropina recombinante, por ejemplo, FSH, hCG o LH recombinante. Preferentemente, la glucoproteína es una glucoproteína recombinante (por ejemplo, gonadotropina recombinante, por ejemplo, FSH, hCG o LH recombinante) producida en una célula (línea celular) mediante un método que comprende cultivar la célula (línea celular) en un medio adecuado y recolectar la glucoproteína recombinante de dicha célula (línea celular) y/o dicho medio (por ejemplo, recolectar la proteína recombinante del sobrenadante del cultivo celular). La célula (línea celular) puede ser una célula (línea celular) de mamíferos, por ejemplo, una célula (línea celular) CHO, una célula (línea celular) PER.C6®, una célula (línea celular) HEK293, una célula (línea celular) HT1080, una célula (línea celular) COS, una célula (línea celular) NOS, una célula (línea celular) Sp20, etc.

Preferentemente la una célula (línea celular) es una célula (línea celular) PER.C6®.

15 En la presente se divulga una proteína que ha sido purificada y/o sometida a inactivación viral mediante un método descrito anteriormente. La proteína puede ser una proteína recombinante o una proteína procedente de la orina. La proteína es una glucoproteína. La glucoproteína puede ser una glucoproteína recombinante, por ejemplo, una gonadotropina recombinante, por ejemplo, FSH, hCG o LH recombinante. Preferentemente, la glucoproteína es una glucoproteína recombinante (por ejemplo, gonadotropina recombinante, por ejemplo, FSH, hCG o LH recombinante) producida en una célula (línea celular) mediante un método que comprende cultivar la célula (línea celular) en un medio adecuado y recolectar la glucoproteína recombinante de dicha célula (línea celular) y/o dicho medio (por ejemplo, recolectar la proteína recombinante del sobrenadante del cultivo celular). La célula (línea celular) puede ser una célula (línea celular) de mamíferos, por ejemplo, una célula (línea celular) CHO, una célula (línea celular) PER.C6®, una célula (línea celular) HEK293, una célula (línea celular) HT1080, una célula (línea celular) COS, una célula (línea celular) NOS, una célula (línea celular) Sp20, etc. Preferentemente la una célula (línea celular) es una célula (línea celular) PER.C6®.

25 En la presente, se divulga además una composición farmacéutica [por ejemplo, para (su uso) en el tratamiento de la infertilidad] que comprende una glucoproteína (por ejemplo, una glucoproteína recombinante, por ejemplo, FSH recombinante, hCG recombinante) que se ha purificado y/o sometido a inactivación viral mediante un método descrito anteriormente.

30 En la presente, se divulga además un método de tratamiento (por ejemplo, de la infertilidad) que comprende un paso de administración a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica que comprende una glucoproteína (por ejemplo, una glucoproteína recombinante, por ejemplo, FSH recombinante, hCG recombinante) que se ha purificado y/o sometido a inactivación viral mediante un método descrito anteriormente.

35 El tratamiento de la infertilidad puede comprender tecnologías de reproducción asistida (TRA), inducción de la ovulación o inseminación intrauterina (IIU). La composición farmacéutica se puede utilizar, por ejemplo, en indicaciones médicas donde se han utilizado preparados conocidos de FSH, LH, hCG.

40 El producto o composición se puede formular en composiciones muy conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo, oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parches), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, ungüentos o gotas) o como un pulverizado bucal o nasal. Una composición típica comprende un portador farmacéuticamente aceptable, tal como se describe en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, decimoquinta edición (Matt Publishing Company, 1975) en las páginas 1405 a 1412 y 1461-87, y el Formulario Nacional XIV decimocuarta edición (American Pharmaceutical Association, 1975), entre otros.

45 Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen el agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales (tal como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Las composiciones también pueden contener aditivos tales como, sin carácter limitante, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, surfactantes y agentes de dispersión. Se pueden incluir agentes antibacterianos y antifúngicos para prevenir el crecimiento de microbios e incluyen, por ejemplo, *m*-cresol, alcohol bencílico, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Si se incluye un conservante, se prefieren el alcohol bencílico, fenol y/o *m*-cresol; sin embargo, el conservante no se limita a estos ejemplos de ninguna manera. Además, puede resultar deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. El producto o composición puede comprender además una sal que comprende un catión de un metal alcalino farmacéuticamente aceptable seleccionado a partir del grupo constituido por sales de Na⁺ o K⁺, o una combinación de estas. Preferentemente, la sal es una sal de Na⁺, por ejemplo, NaCl o Na₂SO₄.

Preferentemente, el producto o composición comprende una glucoproteína y uno o más de Polisorbato 20, L-

metionina, fenol, tampón de fosfato de sodio y sulfato de disodio, tampones de citrato y sacarosa.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retenga bacterias, o incorporando agentes estabilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Las formulaciones inyectables se pueden suministrar en cualquier recipiente adecuado, por ejemplo, vial, jeringuilla rellena previamente, cartuchos de inyección y similares.

La composición se puede formular para un único uso o para un uso múltiple (dosis múltiple). Si el producto o composición se formula para un uso múltiple, se prefiere que se incluya un conservante. Si se incluye un conservante, se prefieren el alcohol bencílico, fenol y/o *m*-cresol; sin embargo, el conservante no se limita a estos ejemplos de ninguna manera. La composición o producto formulados para un único uso o un uso múltiple puede comprender además una sal que comprende un catión de un metal alcalino farmacéuticamente aceptable seleccionado a partir del grupo constituido por sales de Na⁺ o K⁺, o una combinación de estas. Preferentemente, la sal es una sal de Na⁺, por ejemplo, NaCl o Na₂SO₄.

El producto o composición se puede incluir en un recipiente tal como un vial, cartucho relleno previamente (por ejemplo, para la administración única o uso múltiple) o un dispositivo de inyección tal como un "bolígrafo" para, por ejemplo, la administración de dosis múltiples.

Los viales se pueden empaquetar en un envase de tipo blíster o mediante otros medios para mantener la esterilidad. Cualquier producto puede contener opcionalmente instrucciones para utilizar las formulaciones de FSH (y, por ejemplo, hCG si está presente). El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con la práctica habitual en este campo. Remítase a GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7.^a ed. Preferentemente, las composiciones se suministran como composiciones para la administración parenteral. Existe constancia en la técnica de métodos generales para la preparación de las formulaciones parenterales y estos se describen en REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, mencionado anteriormente, en las páginas 780-820. Las composiciones parenterales se pueden suministrar en una formulación líquida o como un sólido que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de la administración. Preferentemente, las composiciones parenterales se suministran en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis.

A continuación, se describirá la presente invención haciendo referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

La Figura 1 muestra un esquema del proceso de purificación (desactivación viral) de FSH recombinante de acuerdo con una realización de la presente invención;

La Figura 2 muestra el patrón en gel tras la estimación cualitativa de la eliminación de impurezas para diversas muestras de FSH UF2-DD (ultrafiltración después de la diálisis) tratadas analizadas en PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) reducida al 12%, donde en el carril 1 están los marcadores BPM (bajo peso molecular), el carril 2 es el tampón de muestra, el carril 3 es UF2-DD, el carril 4 es UF2-DD + AC 10 mM, pH 5,5, el carril 5 es UF2-DD + AC 10 mM, 30% de etanol, pH 5,5, el carril 6 es tampón de muestra, el carril 7 es PM en el intervalo bajo, el carril 8 es UF2-DD, el carril 9 es UF2-DD + 20 mM AC, pH 5,5 y el carril 10 es UF2-DD + AC 20 mM, 30% de etanol, pH 5,5 (remítase al Ejemplo 3); y

La Figura 3 muestra el patrón en gel después de la estimación cuantitativa de la eliminación de impurezas para diversas muestras de hGC tratadas analizadas en PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) reducida al 12%, donde en el carril 1 están los marcadores de BPM (bajo peso molecular), el carril 2 es el Recolectado-DD que contiene hGC, el carril 3 es NR-No Relevante, el carril 4 es el sobrenadante de [Recolectado-DD + CA 15 mM pH 5,0] y el carril 5 es el sobrenadante de [Recolectado-DD + CA 20 mM + 10% de etanol pH 5,0], remítase al Ejemplo 4.

Ejemplo 1

La Figura 1 muestra un resumen de todo el proceso de purificación de FSH recombinante. Como se puede apreciar en la Figura 1, la FSH recombinante se expresa en una línea celular PER.C6® modificada mediante los métodos divulgados en el documento WO 2013/020996 y el documento WO 2009/127826A utilizando un biorreactor.

El biorreactor se siembra y se fomenta el crecimiento celular mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, y el reactor funciona en modo de perfusión para producir y recolectar de manera continua FSH recombinante, utilizando un sistema HoloFibre (ATF4) que se puede adquirir de Repligen. La siembra de al menos 1 x 10⁶ células/mL en un volumen total de 4 ± 1 litros tiene lugar en medio 6GRO. La producción tiene lugar en el medio ProPer-1, y el recolectado del biorreactor se recoge en bolsas de polietileno. Por ejemplo, en este ejemplo la proteína (glucoproteína) es una glucoproteína recombinante (FSH recombinante) producida en una línea celular PER.C6® mediante un método que comprende cultivar la línea celular en un medio adecuado (medio ProPer-1) y recolectar la glucoproteína recombinante del medio (recolectando la proteína recombinante del sobrenadante del

cultivo celular).

El recolectado del bioreactor se combina y se somete a un paso de ultrafiltración/diafiltración de 10 kDa (UF1) que reduce la concentración del recolectado, acondiciona el recolectado (en lo que se refiere al pH y conductividad) para la cromatografía Capto-Q y elimina pigmentos y componentes de bajo peso molecular del medio de cultivo. La fracción retenida se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,8 + 0,65 µm para aclarar la solución del proceso (remítase a la Fig. 1) y posteriormente se somete a una filtración de 0,2 µm como un control de la carga bacteriana. A continuación, se utiliza cromatografía de intercambio aniónico Capto-Q, mediante métodos muy conocidos en la técnica, para capturar la FSH recombinante y para eliminar el ADN, endotoxina, proteínas de la célula hospedadora e impurezas relacionadas con el proceso. Se realiza una filtración de 0,2 µm adicional como un control de la carga bacteriana.

El eluido de Capto-Q filtrado se somete a una ultrafiltración/diafiltración de 10 kDa adicional (UF2) con el objetivo de desalar y reducir el volumen antes de la purificación/inactivación viral, mediante métodos muy conocidos en la técnica.

Paso de AC/EtOH

La fracción retenida de UF2 es una solución de FSH recombinante en un tampón (acetato de amonio 100 mM, NaCl 30 mM, pH 9,3 – pH 9,7). El pH de la solución proteica se reduce en primer lugar desde pH 9,3 – pH 9,7 hasta pH 6,3 ± 0,3 a 32 ± 2 °C con agitación, a continuación se trata con una combinación de ácido caprílico 20 mM/30% de etanol (AC/EtOH) seguida por un ajuste adicional del pH hasta 4,5 – 5,6 (el pH se ajusta con HCl 1 M). Después de este tratamiento la solución proteica permanece durante una incubación de 0,5 a 1 h a 23 ± 2° con agitación (durante este tiempo tiene lugar la inactivación viral y se observa una precipitación blanca que se asemeja a copos). Al final de la 0,5 – 1 h, la temperatura de la solución proteica se reduce hasta 4 – 8 °C, y la solución se incuba durante de 14 h a 18 h más, por ejemplo, de 14 a 16 h, sin agitación (esto permite que continúe precipitación de PCH y virus sin envoltura). El paso de tratamiento con AC/EtOH tiene una actividad triple: (i) inactivación de los virus con envoltura; (ii) aclaramiento de virus en envoltura mediante precipitación seguido por un paso de aclaramiento que tiene como objetivo eliminar el precipitado; y (iii) eliminación por precipitación de proteínas relacionadas con el hospedador.

Las impurezas precipitadas (virus sin envoltura y proteínas relacionadas con el hospedador) se eliminan mediante un paso de filtración a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,8 + 0,65 micrómetros, un paso de filtración que también aclara la solución de FSH recombinante.

Se realiza una filtración de 0,2 µm adicional como un control de la carga bacteriana.

La solución se somete a continuación a cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropil-Sepharose (SP-FF) mediante métodos muy conocidos en la técnica para eliminar el ácido caprílico, etanol y más proteínas de la célula hospedadora. Se realiza una filtración de 0,2 µm adicional como un control de la carga bacteriana, seguida por un paso adicional de purificación utilizando cromatografía de interacción hidrófoba con fenil-Sepharose (PS-FF) para eliminar subunidades de FSH recombinantes libres y proteínas de la célula hospedadora.

El eluido de PS se somete a un tercer paso de ultrafiltración/diafiltración de 10 kDa (UF3) para eliminar la sal y acondicionar la solución para el siguiente paso. Se realiza una filtración de 0,2 µm adicional como un control de la carga bacteriana, antes de la cromatografía por adsorción con hidroxapatita (HyA) que tiene como objetivo eliminar subunidades de FSH disociadas y heterodímeros básicos, seguida por una filtración de 0,2 µm adicional realizada como un control de la carga bacteriana.

Se realiza un “paso de purificación final” por cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sepharose (QS-FF) en modo unir/eluir para eliminar proteínas del hospedador, ADN, endotoxinas y posibles virus. A continuación, tiene lugar una filtración de 0,2 µm adicional para el control de la carga bacteriana, antes de combinar los QS MP y nanofiltrar para eliminar posibles virus. El sobrenadante se somete a un cuarto paso de ultrafiltración/diafiltración de 10 kDa (UF4) para concentrar la FSH recombinante hasta de 0,5 a 1,1 mg/mL, seguido por la adición de polisorbato 20 hasta una concentración final de 0,005 mg/mL. Estos son pasos de diálisis y ajuste del tampón, que son muy conocidos en la técnica. La FSH recombinante se somete a un paso de filtración de 0,2 µm final antes de la división en alícuotas en un envase primario y almacenamiento a -20 °C hasta su envío.

Los solicitantes han observado que el tratamiento con ácido caprílico/etanol es capaz de reducir de manera notable las impurezas relacionadas con el hospedador. De acuerdo con diversos ciclos de producción (datos que no se muestran) de un 64 a un 79% de las impurezas relacionadas con el hospedador se eliminan con el paso de AC/EtOH (y filtración con fibra de vidrio posterior) descrito anteriormente, a la vez que se recupera un rendimiento elevado de aproximadamente un 90 a un 95% de la FSH. Esto es una reducción significativa de impurezas relacionadas con el hospedador que se consigue mediante un proceso simple, con una pérdida mínima de proteína producto (glucoproteína producto).

La notable eficacia de aclaramiento viral de este paso se resume en la Tabla 1, que muestra un resumen de los

factores de reducción log₁₀, que están en la región de ≥4,25 a ≥5,41. Un factor de reducción-log (FRL) ≥4 Log₁₀ (por ejemplo, hasta 8 Log₁₀ o superior) se considera por lo general elevado, robusto y eficaz.

Tabla 1 Resumen de los factores de reducción log₁₀ (rFSH)

Paso del proceso	Número del estudio	Virus con envoltura		Virus sin envoltura
		MuLV	PRV	EMCV ⁽¹⁾
Tratamiento con ácido caprílico/etanol (conc. proteica 2 mg/mL)	K1/B28/12 K1/B28/13 ⁽¹⁾	≥ 4,88 / ≥ 5,12	≥ 5,29 / ≥ 5,41	≥ 4,42 / ≥ 4,47
Tratamiento con ácido caprílico/etanol (conc. proteica 6 mg/mL)	K1/B28/12 K1/B28/13 ⁽¹⁾	≥ 4,94 / ≥ 4,58	≥ 5,11 / ≥ 5,29	≥ 4,25 / ≥ 4,36

⁽¹⁾El estudio con EMCV contiene filtración con fibra de vidrio después del tratamiento

5 El Ejemplo anterior se refiere a rFSH, pero los expertos en la técnica apreciarán que el proceso (por ejemplo el paso con AC/EtOH (y la posterior filtración con fibra de vidrio)) descrito anteriormente se puede aplicar fácilmente a la purificación/inactivación viral de otras proteínas (por ejemplo, glucoproteínas), por ejemplo, rhCG [por ejemplo, rhCG producida en una línea celular PER.C6® mediante el método del documento PCT/GB2010/001854 (publicado como WO2011/042688)].

10 **Ejemplo 2**

En otro ejemplo de un método de la invención, se proporciona un proceso de purificación de hCG/inactivación viral. Se utilizó un método similar al del Ejemplo 1 anterior (menos el paso de cromatografía por intercambio catiónico con sulfopropil-Sepharose (SP-FF)) para la purificación/inactivación viral de rhCG producida en una línea celular PER.C6 mediante el método del documento PCT/GB2010/001854 (publicado como WO2011/042688). Los solicitantes observaron que la inactivación química por ácido caprílico y etanol a pH ácido, es decir, utilizando el paso con AC/EtOH descrito en el Ejemplo 1, eliminó aproximadamente un 65% de impurezas que no son hCG (por precipitación), a la vez que se recuperó un rendimiento elevado de aproximadamente un 90% de la hCG.

15 La excelente eficacia de aclaración viral del paso con AC/EtOH en el Ejemplo se resume en la Tabla 2. La inactivación viral de MuLV fue eficaz tal como se determinó mediante el elevado FRL obtenido, en un intervalo de
20 ≥5,31 a ≥5,48. Se obtuvieron FRL entre ≥2,03 y ≥2,74 para el tratamiento con AC/EtOH y eliminación del precipitado.

Tabla 2. Resumen de los factores de reducción log₁₀ (rhCG)

Paso del proceso	Número del estudio	FRL	
		Virus con envoltura (MuLV)	Virus sin envoltura (PPV)
Tratamiento con ácido caprílico/etanol (conc. proteica 2 mg/mL)	KOP1-B01-15	≥ 5,43/ ≥ 5,31	≥ 2,03/ ≥ 2,21
Tratamiento con ácido caprílico/etanol (conc. proteica 6 mg/mL)	KOP1-B01-15	≥ 5,31/ ≥ 5,48	≥ 2,68/ ≥ 2,74

Ejemplo 3: Evaluación de las condiciones de precipitación para eliminar impurezas en una solución que contiene rFSH

25 **Descripción del experimento:**

El intermedio de UF2-DD (ultrafiltración después de la diálisis) obtenido utilizando el proceso de purificación de rFSH del Ejemplo 1 (hasta el paso con AC/EtOH) contuvo acetato de amonio 100 mM + NaCl 30 mM pH 9,50 ± 0,20, 11,00 ± 0,50 mS/cm. Este se dividió en alícuotas y cada alícuotas se sometió a diferentes condiciones de precipitación para eliminar impurezas (rFSH es soluble en la solución). Las condiciones de precipitación estudiadas

fueron las siguientes:

1. UF2-DD sin tratamiento (control)
2. UF2-DD + ácido caprílico (AC) 10 mM, pH 5,5
3. UF2-DD + CA 10 mM, 30% de etanol, pH 5,5
- 5 4. UF2-DD + CA 20 mM, pH 5,5
5. UF2-DD + CA 20 mM, 30% de etanol, pH 5,5

Todas las muestras tratadas se incubaron durante 30 min a TA con agitación a lo que siguió una incubación adicional de 30 min sin agitación. Se realizó una incubación adicional a 2-8 °C durante 16-20 h. Los precipitados generados se eliminaron por centrifugación mientras que los sobrenadantes se recogieron.

10 **Parámetros de desempeño del proceso de precipitación:**

Recuperación de rFSH

La concentración de rFSH en todas las muestras se determinó mediante ELISA FSH y los rendimientos de cada muestra después del tratamiento se calcularon y se exponen en la Tabla 3.

- 15 Tal como se aprecia en la Tabla 3, se recuperaron un 96%, 106%, 106% y un 98% de la rFSH en las soluciones del proceso UF2-DD tras la precipitación con AC 10 mM, CA 10 mM + 30% de etanol, AC 20 mM y AC 20 mM + 30% de etanol, respectivamente. Esto indica que la rFSH no precipita y sigue solubilizada en la solución.

Eliminación de impurezas

- 20 Se midió la absorbancia a 280 nm en UF2-DD no tratado y en cada uno de los sobrenadantes de los UF2-DD tratados y se calculó la eliminación de impurezas, tal como se expone en la Tabla 3. Un 33,9%, 64,9%, 65,9% y 68,8% de la impureza A₂₈₀ total en UF2-DD se eliminó después de la precipitación con AC 10 mM, CA 10 mM + 30% de etanol, AC 20 mM y AC 20 mM + 30% de etanol, respectivamente.

- 25 El UF2-DD no tratado y los sobrenadantes de los diversos UF2-DD tratados se analizaron en PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) reducida al 12% para la estimación cualitativa de la eliminación de impurezas. El patrón en gel se muestra en la Figura 2. El sobrenadante obtenido tras la precipitación con CA 10 mM + 30% de etanol (carril 5) y CA 20 mM + 30% de etanol pH 5,5 (carril 10) es sustancialmente más puro respecto al sobrenadante obtenido tras la precipitación con CA 10 mM pH 5,5 (carril 4) y AC 20 mM (carril 9), respectivamente. Esto muestra el efecto sinérgico de la adición de etanol al ácido caprílico en el paso de precipitación.

Conclusiones del experimento:

- 30 1. La precipitación de UF2-DD con etanol y ácido caprílico dio como resultado un producto más puro en comparación con el obtenido utilizando solo ácido caprílico.
2. La combinación de etanol y ácido caprílico no precipita la rFSH que sigue solubilizada en la solución, y esto significa un paso de purificación e inactivación viral con un rendimiento elevado.

Tabla 3. los Resultados obtenidos con las diferentes condiciones de precipitación para la eliminación de impurezas en una solución con rFSH intermedia

Sobrenadante de	Absorbancia a 280 nm			rFSH (por ELISA)		
	A ₂₈₀	A ₂₈₀ total	Eliminación (%)	µg/mL	µg totales	Recup (%)
1. UF2-DD	3,265	32,650	-----	677	6 770	-----
2. UF2-DD + CA 10 mM, pH 5,5	2,066	21,571	33,9	207,1	6 487	96
3. UF2-DD + CA 10 mM, 30% de etanol, pH 5,5	0,760	11,457	64,9	158,6	7 173	106
4. UF2-DD + CA 20 mM, pH 5,5	1,060	11,122	65,9	227,8	7 170	106

5. UF2-DD + CA 20 mM, 30% de etanol, pH 5,5	0,678	10,197	68,8	146,5	6 610	98
---	-------	--------	------	-------	-------	----

Ejemplo 4: Evaluación de las condiciones de precipitación para eliminar impurezas en el recolectado que contiene hCG

Descripción del experimento:

- 5 Se concentró el recolectado que contenía hCG ~40 veces y se dializó con tampón con glicina 100 mM, NaCl 50 mM pH 9,0, 6 mS/cm mediante un sistema de ultrafiltración (UF) de 10 kDa. Al final de la UF, la solución proteica recuperada, material del Recolectado-DD (después de la diálisis), se dividió en alícuotas y cada alícuota se sometió a condiciones de precipitación diferentes para eliminar impurezas (mientras que la hCG es soluble en la solución). Las condiciones de precipitación estudiadas fueron las siguientes (Tabla 4):
- 10 1. Recolectado-DD sin tratamiento como un control;
2. Recolectado-DD + AC 15 mM, pH 5,0
3. Recolectado-DD + AC 20 mM, pH 5,0
4. Recolectado-DD + AC 20 mM + 10% de etanol, pH 5,0.

15 Todas las muestras tratadas se incubaron durante 1 h a TA sin agitación. Los precipitados generados se eliminaron por centrifugación mientras que los sobrenadantes se recogieron.

Parámetros de desempeño del proceso de precipitación:

Recuperación de hCG

Se determinó la concentración de hCG en el recolectado no tratado y en cada uno de los sobrenadantes de los Recolectados DD y se calcularon las recuperaciones tal como se detalla en la Tabla 4.

20 **Eliminación de impurezas**

Se determinó la absorbancia a 280 nm (A_{280}) en el recolectado no tratado y en cada uno de los sobrenadantes de los Recolectados DD tratados y se calcularon las eliminaciones de impurezas tal como se detalla en la Tabla 4.

25 El recolectado no tratado y los sobrenadantes de los diversos Recolectados DD tratados se analizaron en PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) reducida al 12% para la estimación cualitativa de la eliminación de impurezas. El patrón en gel se muestra en la Figura 3.

Análisis:

1. Recuperación de hCG - Se recuperó un 91%, 86% y 83% de la hCG en el Recolectado-DD después de la precipitación con AC 15 mM, AC 20 mM y AC 20 mM + 10% de etanol, respectivamente.
- 30 2. Eliminación de impurezas según A_{280} - Se eliminó un 56,6%, 55,8% y un 63,0% de la A_{280} total en el Recolectado-DD después de la precipitación con AC 15 mM, AC 20 mM y AC 20 mM + 10% de etanol, respectivamente.
3. Eliminación de impurezas por gel - El sobrenadante obtenido tras la precipitación con CA 20 mM + 10% de etanol pH 5,0 (carril 5) es sustancialmente más puro respecto al sobrenadante obtenido tras la precipitación con CA 15 mM pH 5,0 (carril 4).

Conclusiones:

- 35 1. La precipitación de Recolectado que contiene hCG al que se le ha añadido etanol y ácido caprílico dio como resultado un producto más puro en comparación con el obtenido utilizando solo ácido caprílico.

Tabla 4. Resultados obtenidos a partir de diferentes condiciones de precipitación para eliminar impurezas en recolectado que contiene hCG

ES 2 770 860 T3

Sobrenadante de	Absorbancia a 280 nm			rFSH (por ELISA)		
	A ₂₈₀	A ₂₈₀ total	Eliminación (%)	µg/mL	µg totales	Recup (%)
1. Recolectado DD	4,295	107,375	-----	757,14	18,929	-----
2. Recolectado DD + CA 15 mM, pH 5,0	1,738	46,578	56,6%	639,72	17 144	91%
3. Recolectado DD + CA 20 mM, pH 5,0	1,792	47,488	55,8%	612,24	16 224	86%
4. Recolectado DD + CA 20 mM, 10% de etanol, pH 5,0	1,369	39,701	63,0%	543,8	15 770	83%

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de una glucoproteína, comprendiendo el método un paso de tratamiento de la glucoproteína con una combinación de ácido caprílico y etanol.
- 5 2. Un método de inactivación viral de una glucoproteína, comprendiendo el método un paso de tratamiento de la glucoproteína con una combinación de ácido caprílico y etanol.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende tratar una solución de la glucoproteína (por ejemplo, en un tampón) con una combinación de ácido caprílico y etanol.
4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde la glucoproteína es FSH, hCG o LH.
- 10 5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde la glucoproteína es una glucoproteína recombinante.
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde la glucoproteína es una glucoproteína recombinante producida en una célula mediante un método que comprende cultivar la célula en un medio adecuado y recolectar la glucoproteína recombinante de dicha célula y/o dicho medio.
- 15 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 donde la célula es una célula de mamífero.
8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde el tratamiento de la glucoproteína con una combinación de ácido caprílico y etanol tiene lugar de pH 2 a pH 6,5, por ejemplo, de pH 3 a pH 6,5, por ejemplo, de pH 4 a pH 6, por ejemplo, de pH 4,5 a pH 5,5.
- 20 9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde la concentración de ácido caprílico es ácido caprílico de 10 mM a 30 mM y/o el etanol es de un 20% a un 50% de EtOH.
10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende: (a) tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una incubación de 1 minuto a 6 h a una temperatura de 23 ± 2 °C con agitación; (b) tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico a una temperatura de 4-8 °C durante una incubación de 1 minuto a 32 h, sin agitación; (c) tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una incubación de 0,5 h a 1 h a una temperatura de 23 ± 2 °C con agitación, seguida por una reducción hasta una temperatura de 4-8 °C y una incubación posterior de 14 h a 18 h, sin agitación; o (d) tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico durante una duración de 1 h \pm 10 min a un pH de $5,5 \pm 0,1$ y a una temperatura de 23 ± 2 °C.
- 25 11. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende un paso adicional de filtrado de la glucoproteína tras el tratamiento con ácido caprílico y etanol.
- 30 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 donde la glucoproteína se filtra utilizando un filtro de fibra de vidrio.
13. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende un paso adicional de concentración de la glucoproteína hasta la concentración deseada y/o pasos posteriores de formulación.

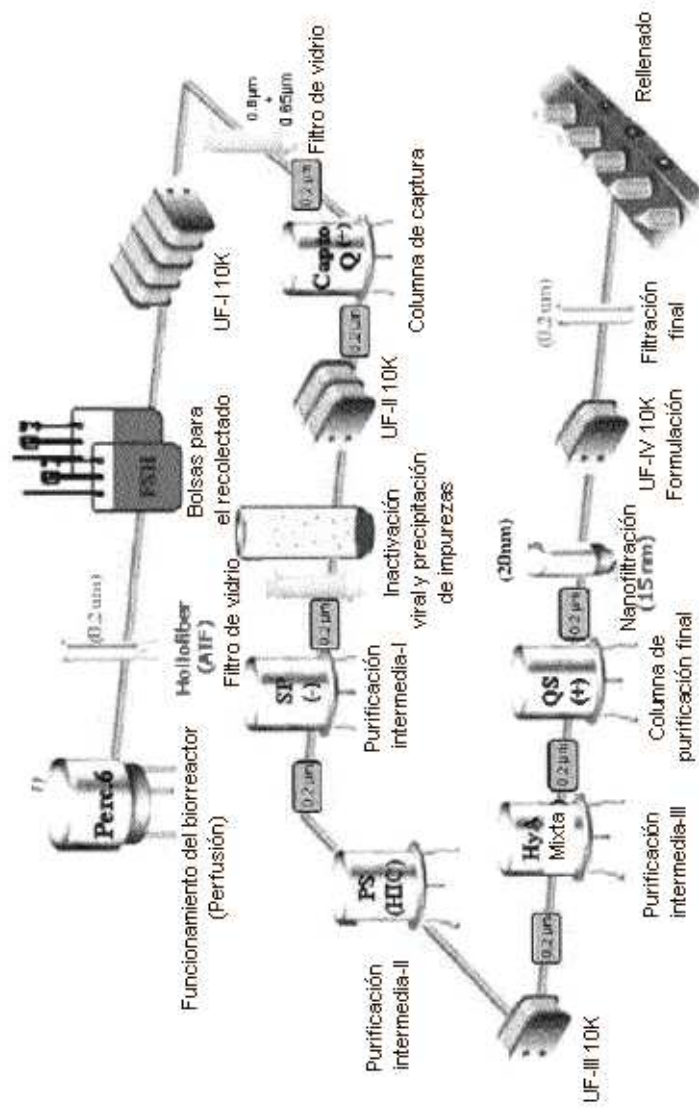


Fig 1

Fig 2

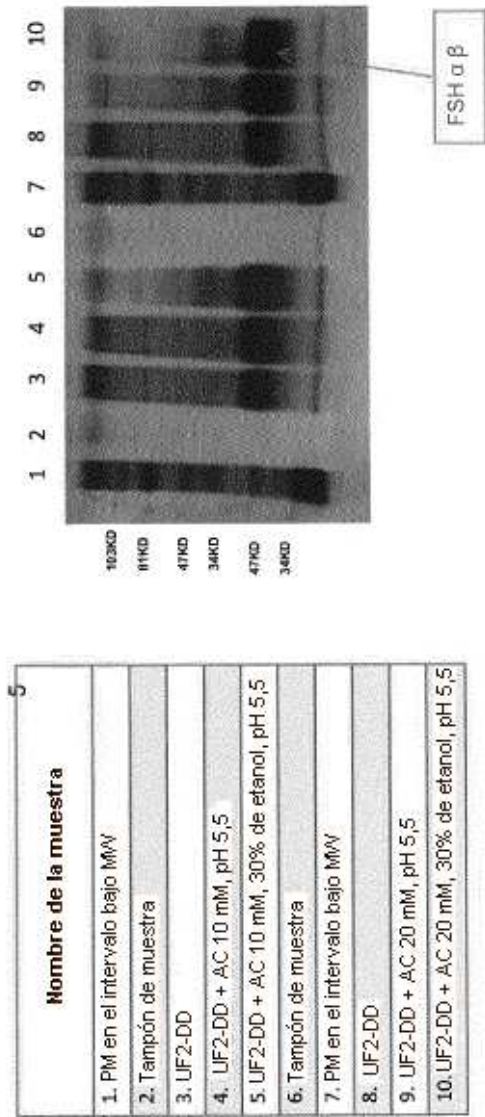
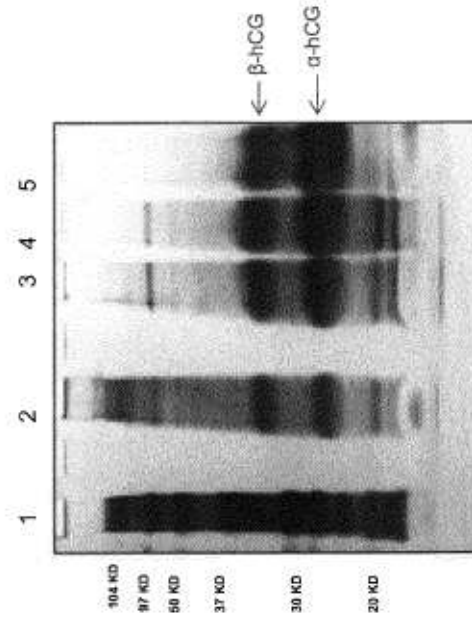


Fig 3



Nombre de la muestra	5
1. Marcador de bajo peso molecular	
2. Recolectado-DD que contiene hCG	
3. No relevante	
4. Recolectado-DD + AC 15 mM pH 5,0	
5. Recolectado-DD + AC 15 mM + 10% de etanol pH 5,	10