

(11) Número de Publicação: **PT 2414380 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07K 1/18** (2015.01) **C07K 1/20** (2015.01)  
**C07K 14/59** (2015.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2010.04.01**

(30) Prioridade(s): **2009.04.01 EP 09157133**

(43) Data de publicação do pedido: **2012.02.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.08.26**  
**223/2015**

(73) Titular(es):

**RATIOPHARM GMBH**  
**GRAF-ARCO-STRASSE 3 89079 ULM** DE

(72) Inventor(es):

**STEFAN ARNOLD** DE  
**CHRISTIAN SCHECKERMANN** DE  
**DIETMAR EICHINGER** DE

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS**  
**RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA** PT

**(54) Epígrafe: MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DE FSH RECOMBINANTE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE UMA HORMONA RECOMBINANTE FOLÍCULO-ESTIMULANTE (FSH) OU UMA VARIANTE DE FSH RECOMBINANTE. O MÉTODO COMPREENDE OS PASSOS DE SUJEIÇÃO DE UM LÍQUIDO CONTENDO A FSH RECOMBINANTE OU A VARIANTE DE FSH RECOMBINANTE A UMA CROMATOGRAFIA DE PERMUTA ANIÓNICA, A UMA CROMATOGRAFIA DE INTERACÇÃO HIDROFÓBICA, E A UMA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM CORANTE, EM QUE ESTAS CROMATOGRAFIAS PODEM SER REALIZADAS EM QUALQUER ORDEM, E EM QUE O MÉTODO NÃO COMPREENDE CROMATOGRAFIA DE PERMUTA ANIÓNICA FRACA NEM UMA CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA. O MÉTODO DE PURIFICAÇÃO RESULTA NUM RENDIMENTO ELEVADO DE FSH RECOMBINANTE COM UM GRAU DE PUREZA DESEJADO. A FSH OBTIDA É ESPECIALMENTE ÚTIL PARA A PROFILAXIA E TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS E INDICAÇÕES MÉDICAS EM QUE AS PREPARAÇÕES DE FSH SÃO CONSIDERADAS COMO MEDICAMENTOS ÚTEIS.

**RESUMO****"MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DE FSH RECOMBINANTE"**

A presente invenção refere-se a um método de purificação de uma hormona recombinante folículo-estimulante (FSH) ou uma variante de FSH recombinante. O método compreende os passos de sujeição de um líquido contendo a FSH recombinante ou a variante de FSH recombinante a uma cromatografia de permuta aniónica, a uma cromatografia de interacção hidrofóbica, e a uma cromatografia de afinidade com corante, em que estas cromatografias podem ser realizadas em qualquer ordem, e em que o método não compreende cromatografia de permuta aniónica fraca nem uma cromatografia de fase reversa. O método de purificação resulta num rendimento elevado de FSH recombinante com um grau de pureza desejado. A FSH obtida é especialmente útil para a profilaxia e tratamento de distúrbios e indicações médicas em que as preparações de FSH são consideradas como medicamentos úteis.

**DESCRIÇÃO****"MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DE FSH RECOMBINANTE"**

A presente invenção refere-se a um método de purificação de uma hormona recombinante folículo-estimulante (FSH) ou uma variante de FSH recombinante. O método compreende as etapas de sujeição de um líquido contendo a FSH recombinante ou uma variante de FSH recombinante a uma cromatografia de permuta aniónica, a uma cromatografia de interacção hidrofóbica, e a uma cromatografia de afinidade com corante, em que estas cromatografias podem ser realizadas em qualquer ordem, e em que o método não compreende cromatografia de permuta aniónica fraca nem uma cromatografia de fase reversa. O método de purificação resulta num rendimento elevado de FSH recombinante com um grau de pureza desejado. A FSH obtida é especialmente útil para a profilaxia e para o tratamento de distúrbios e indicações médicas em que as preparações de FSH são consideradas como medicamentos úteis.

A hormona folículo-estimulante (FSH) é produzida pelas células gonadotrópicas da pituitária anterior e libertada para a circulação. A FSH actua juntamente com a hormona luteinizante (LH) no controlo da maturação de óócitos em fêmeas e da espermatogénese em machos. Tanto a FSH como a LH pertencem a uma família de glicoproteínas

heterodiméricas que consistem em duas cadeias  $\beta$  e  $\alpha$  não covalentemente ligadas as quais são codificadas por genes separados. Ambas as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são glicosiladas. A subunidade  $\alpha$  consiste em 92 resíduos de aminoácidos, enquanto que a subunidade  $\beta$  consiste em 111 resíduos de aminoácidos, cada um dos quais tem dois potenciais locais de glicosilação ligados a asparagina.

A FSH humana é usada para tratar mulheres sem ovulação, para a estimulação do desenvolvimento multifolicular (superovulação) e na preparação para uma concepção assistida, tal como, a IVF, ICSI, GIFT ou CIIFT. Além disso, a FSH humana é utilizada para estimular a maturação de folículos em mulheres com produção reduzida ou nula de FSH e para estimular a espermatogénese em homens que sofrem de oligoespermia.

Num regime de tratamento típico para a indução da ovulação, são administradas diariamente a um paciente injecções de FHS ou uma variante (cerca de 75 a 450 UI de FSH/dia) durante um período de cerca de 6 a cerca de 12 dias. Num regime de tratamento típico para hiperestimulação ovariana controlada, são administradas diariamente a um paciente injecções de FSH ou de uma variante (cerca de 150 a 600 UI de FSH/dia) por um período de cerca de 6 a cerca de 12 dias.

Para a estimulação da espermatogénese tem sido usado com sucesso um regime usando 150 UI de FSH três vezes

por semana em combinação com 2500 UI de hCG duas vezes por semana para se conseguir uma melhoria na contagem de esperma nos homens que sofrem de hipogonadismo hipogonadotrófico.

Até aos anos 80, uma fonte primária de FSH humana era a FSH derivada da urina isolada a partir de urina de mulheres em idade fértil. Uma forma adicional purificada de elevada pureza, da FSH derivada de urina foi introduzida nos anos 90, e, finalmente, uma FSH recombinante foi desenvolvida e tem sido amplamente utilizada desde o ano de 1998. Com o advento da tecnologia do ADN recombinante, tornou-se possível produzir FSH humana em culturas de células transfetadas com as sequências de ácidos nucleicos que codificam para a cadeia  $\alpha$  e  $\beta$ . As sequências de ADN que codificam para as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  e métodos para produzir a FSH recombinante foram descritos por exemplo em WO 88/10270, WO 86/04589 e EP 0 735 139.

Actualmente, existem dois produtos comerciais da FSH humana recombinante no mercado na Alemanha, GONAL-f® e Puregon®, ambos os quais são produzidos através da expressão das sequências de ADN que codificam para as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do tipo nativo humanas em células de ovário de hamster chinês (CHO).

Devido à importância da FSH no tratamento de distúrbios de fertilidade, é desejável a disponibilização da FSH recombinante de elevada pureza e de elevada

actividade específica. O tratamento com FSH requer injeções repetidas. As preparações de FSH altamente purificada podem ser administradas por via subcutânea, permitindo a auto-administração pelo paciente, melhorando assim a comodidade e o cumprimento da terapia pelo doente.

O pedido de patente internacional WO 2006/051070 A1 de Ares Trading S.A. descreve um método de purificação de FSH recombinante, compreendendo os seguintes passos: 1) cromatografia de afinidade com corante, 2) cromatografia de interacção hidrofóbica; e 3) cromatografia de fase reversa. Mais, o documento WO 2006/051070 A1 divulga um método de purificação de FSH compreendendo os passos de submeter a FSH a 1) cromatografia de permuta aniónica, 2) cromatografia de afinidade com corante, 3) cromatografia de interacção hidrofóbica, 4) cromatografia de fase reversa e 5) cromatografia de permuta aniónica.

O pedido internacional de patente WO 2005/063811 A1 de Ares Trading S.A. refere-se a um método de purificação de FSH humana recombinante compreendendo os passos de (1) cromatografia de permuta iónica; (2) cromatografia com ião metálico imobilizado; e (3) cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC).

O documento WO 2007/065918 A2 de Ares Trading S.A. descreve um método de purificação de FSH compreendendo o passo de cromatografia: cromatografia de afinidade com corante, cromatografia de permuta aniónica fraca,

cromatografia de interacção hidrofóbica, e chromatografia de permuta aniónica forte, que pode ser levada a cabo em qualquer ordem.

Existe uma necessidade contínua de novos métodos de purificação de FSH recombinante e variantes da FSH. Em particular, existe uma necessidade de métodos de purificação que evitam a utilização de passos de chromatografia de fase reversa. Mais, é desejável ter um método de purificação que não dependa de chromatografia de imunoafinidade, mas que possa ser realizado sem este passo de custo elevado.

De acordo com a presente invenção, este e outros problemas são resolvidos por meio das características da reivindicação principal. As concretizações vantajosas estão definidas nas reivindicações dependentes.

É um objecto da invenção proporcionar um método novo e vantajoso para a purificação da FSH recombinante ou uma variante de FSH recombinante.

Num primeiro aspecto, a invenção proporciona um método de purificação da FSH humana recombinante ou uma variante de FSH a partir de um líquido contendo a FSH em bruto, compreendendo os seguintes passos:

- uma chromatografia de permuta aniónica,
- uma chromatografia de interacção hidrofóbica, e

- uma cromatografia de afinidade com corante, que podem ser realizadas em qualquer ordem, em que o método evita qualquer cromatografia de permuta aniónica fraca, bem como qualquer cromatografia de fase reversa.

Numa outra forma de realização, os diferentes passos cromatográficos são realizados pela seguinte ordem: (1) cromatografia de permuta aniónica, (2) cromatografia de interacção hidrofóbica, e (3) cromatografia de afinidade com corante. A cromatografia de permuta aniónica (AEC) baseia-se em interacções carga-carga entre as proteínas na amostra e as cargas imobilizadas na resina. Na cromatografia de permuta aniónica, os iões de ligação das proteínas são negativos, e o grupo funcional imobilizado é positivo. As resinas de permuta aniónica vulgarmente utilizadas são a Q-resina, uma amina quaternária, e a resina DEAE (DiEtilAminoEtano). No entanto, em geral, o passo de cromatografia de permuta aniónica pode ser realizado com todas as resinas ou membranas de permuta aniónica comuns comercialmente disponíveis. As resinas de permuta aniónica podem ser utilizadas na forma de colunas previamente carregadas com enchimento. Alternativamente, as colunas podem ser auto-preparadas. Não existem limitações específicas quanto à capacidade e à geometria das colunas, além das habituais. O perito na técnica sabe que a quantidade de resina de permuta aniónica a ser utilizada depende do conteúdo total de proteínas do fluido de cultura celular ou qualquer outro fluido, por exemplo, o eluato de

um passo anterior de cromatografia, aplicado à coluna no passo de captura.

As resinas típicas de permuta aniónica fortes que podem ser utilizadas para o objectivo da invenção compreendem os grupos funcionais, tais como: fracções de aminoetilo quaternário (QAE), as resinas incluem, por exemplo, Toyopearl QAE (disponível da Tosoh Bioscience, Alemanha), Selectacel QAE (um derivado de celulose aminoetilo quaternário, disponível da empresa Polysciences Inc., Pensilvânia EUA) e outros; porções de amónio quaternário (Q), as resinas incluem, por exemplo, Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, Q-Sepharose HP (disponíveis da GE Healthcare, Alemanha), Resource Q (disponível da GE Healthcare, Alemanha), Macro Prep High Q (Bio-Rad, Califórnia, EUA), Toyopearl Super Q (disponível da Tosoh Bioscience, Alemanha), UNOsphere Q (disponível da Bio-Rad, Califórnia, EUA), e grupos trimetilamóniometilo (TMAE), as resinas incluem, por exemplo, Fractogel EMD TMAE (disponível da Merck, Alemanha).

A cromatografia de permuta aniónica é preferencialmente uma cromatografia de permuta aniónica forte que é realizada utilizando uma resina de permuta aniónica forte tendo grupos funcionais  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ , ou uma resina com características semelhantes.

Os exemplos preferidos de resinas de permuta aniónica fortes que podem ser usadas para o propósito da

invenção são resinas permutadoras aniónicas fortes de amónio quaternário conhecidas no estado da técnica como UNOsphere Q, Q Sepharose HP e outras resinas tendo porções de amónio quaternário (Q).

As características do permutador aniónico forte UNOsphere Q são as que se seguem:

Grupo funcional	-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Capacidade iónica total	120 µeq/mL
Capacidade de ligação dinâmica	
150 cm/h	180 mg/mL
600 cm/h	125 mg/mL
Contra-ião de envio	Cl <sup>-</sup>
Tamanho médio de partícula	120 µm
Gama de caudal linear recomendado	50-1200 cm/h
Estabilidade química	
1,0 M de NaOH (20°C)	até 2000 horas
1,0 M de HCl (20°C)	até 200 horas
Alterações de volume	
pH 4-10	<5%
0,01-1,0 M de NaCl	<5%
Estabilidade ao pH	1-14

As características do permutador aniónico forte Q Sepharose HP são com se segue:

Capacidade iónica	0,14-0,20 mmol Cl <sup>-</sup> /mL
Capacidade dinâmica	70 mg BSA/mL de meio
Caudal rec.	30-150 cm/h
Pressão máx. no leito empacotado durante a operação	3 bar (42 psi, 0,3 MPa)
Limite de pressão do material da coluna em carga elevada	5 bar (73 psi, 0,5 MPa)
Tamanho médio de partícula	34 µm
Limite de exclusão ( $M_r$ )	Aprox. $4 \times 10^6$ de proteína globular
Matriz	Agarose reticulada, 6%
Estabilidade ao pH	2-12 (em operação e longo prazo) 1-14 (curto prazo)
Estabilidade química	Estável em todos os tampões vulgarmente utilizados

É preferível evitar a utilização de resinas de permuta aniónica fracas, tais como as baseadas em dietil-aminoetilo (DEAE) ou dimetilaminoetilo (DMAE) como grupos funcionais.

O passo de cromatografia de permuta aniónica é realizado de preferência utilizando um tampão com um pH ligeiramente alcalino, por exemplo, a ou cerca de 7,0 a ou cerca de 9,0, ou a ou cerca de 7,5 a ou cerca de 8,5. Os tampões adequados incluem, por exemplo, tampão borato, ácido Tris iminodiacético/trietanolamina, acetato de amónio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. A utilização de um tampão Tris é preferida. A eluição da resina de permuta

aniónica é usualmente conseguida através do aumento da condutividade da fase móvel através da adição de sal, de preferência cloreto de sódio.

A cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC) do método da invenção pode ser realizada utilizando uma resina de HIC que tem uma superfície moderadamente hidrofóbica (em comparação com a superfície hidrofóbica muito mais forte de uma resina de fase reversa). As proteínas com propriedades de superfície hidrofóbicas são atraídas para estas resinas, que geralmente têm grupos éter, fenilo, butilo ou hexilo.

A HIC pode ser efectuada com todas as resinas de HIC vulgares disponíveis comercialmente. As resinas de HIC que podem ser utilizadas para a finalidade da invenção compreendem matrizes, tais como, Butil, Fenil, Propil ou Octil Sepharose, SOURCE 15 (todas disponíveis da GE Healthcare, Alemanha), suporte HIC Macro-Prep metilo ou t-butilo (bio-Rad, Alemanha) ou Fractogel EMD com ligandos propilo ou fenilo (Merck AG, Alemanha), as resinas de HIC Toyopearl, tal como butil Toyopearl 650 M e resinas de HIC semelhantes (Tosoh Bioscience).

Numa forma de realização preferida, a cromatografia de interacção hidrofóbica é realizada utilizando uma resina consistindo de esferas de agarose reticuladas derivatizadas com grupos fenilo, butilo ou octilo, ou uma resina com características semelhantes. As características

da Phenyl Sepharose 6 FF (disponível da GE Healthcare) são dadas abaixo.

## Densidade de ligando

Phenyl Sepharose™ 6 Fast 25 µmol/mL de meio

Flow (baixa sub)

Phenyl Sepharose™ 6 Fast 40 µmol/mL de meio

Flow (elevada sub)

## Capacidade ligante

Phenyl Sepharose™ 6 Fast 10 mg IgG/mL de meio

Flow (baixa sub) 24 mg HSA/mL de meio

Phenyl Sepharose™ 6 Fast 30 mg IgG/mL de meio

Flow (elevada sub) 36 mg HSA/mL de meio

Pressão/fluxo espec. 200-240 cm/h, coluna de 1 bar XK 50/60,  
altura de leito 25 cm

Estabilidade ao pH 2-14 (curto prazo), 3-13 (longo prazo)

Estabilidade química Estável em tampões vulgares, agentes caotrópicos, detergentes, e solventes orgânicos polares

Tamanho médio de partícula 90 µm

Armazenamento 20% de etanol

Temperatura de armazenamento 4°C a 30°C

A ligação na resina de HIC é conseguida num tampão com uma elevada condutividade, obtido através da adição de sal (NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  por exemplo). A eluição no passo de HIC é geralmente levada a cabo através

da redução da condutividade da fase móvel (isto é, reduzindo a concentração de sal), utilizando um tampão com um pH de ou cerca de 5 até ou cerca de 9, mais preferencialmente a ou cerca de 6 a ou cerca de 8, mais preferencialmente a ou cerca de 7 até ou cerca de 8.

Os tampões de equilíbrio, lavagem e eluição podem compreender todos os tipos de tampão vulgarmente utilizados para HIC. Assim, os agentes de tamponização compreendem fosfato de sódio, acetato de sódio, Tris/HCl, HEPES, ou outros agentes de tamponização. Além disso, os tampões podem conter entre 0,5 mM e 3 M de NaCl, KCl ou outros sais adequados, dependendo se o tampão é utilizado para atingir o equilíbrio, lavagem ou eluição. Os tampões de equilíbrio e de lavagem contêm concentrações mais elevadas dos sais acima mencionados que os tampões de eluição.

Um tampão particularmente preferido no passo de HIC é um tampão Tris/HCl contendo cloreto de sódio.

A cromatografia de afinidade com corante do método da invenção pode ser realizado utilizando uma resina tendo como um ligando imobilizado um composto corante que é bem conhecido para uma pessoa perita na técnica, isto é, Cibacron Blue F3G-A. O termo "imobilizado" é bem conhecido por uma pessoa perita na técnica e significa que o ligando é derivatizado no sentido em que está quimicamente ligado à resina.

Numa forma de realização preferida, a cromatografia de afinidade com corante é efectuada com Cibacron Blue F3G-A como ligando, covalentemente acoplado a qualquer matriz, por exemplo, uma matriz de agarose. Preferencialmente, a cromatografia de afinidade com corante é realizada utilizando a resina conhecida como Blue Sepharose FF (disponível da GE Healthcare, Alemanha). As características técnicas da resina Blue Sepharose FF são dadas abaixo:

Ligando	Cibacron Blue F3G-A
Método de acoplamento	Acoplamento com triazina do ligando
Capacidade ligante	> 18 mg de albumina de soro humana/mL de meio
Densidade do ligando	~ 7 µmol de Cibacron Blue/mL de meio
Matriz	Agarose de elevada reticulação, 6%
Tamanho médio de partícula	90 µm
Estabilidade ao pH	4-12 (longo prazo), 3-13 (curto prazo)
Armazenamento	20% de etanol, 0,1 M de tampão de fosfato de potássio, pH 8,0
Temperatura de armazenamento	4°C a 30°C
Estabilidade química	40°C durante 7 dias em: 70% de etanol, 6 M de hidrocloreto de guanidina, 8 M de ureia

Entende-se que a cromatografia de afinidade com corante do método da invenção pode ser realizada com

resinas alternativas, com características semelhantes. Exemplos de resinas alternativas incluem: Toyopearl AF-blue-HC-650M (Tosoh Biosciences), Blue Cellthru BigBead (Sterogene), SwellGel Blue (Pierce), Cibachrome blue 3GA-agarose 100 (Sigma), Affi-Gel Blue (Bio-Rad), cartuchos Econo-pac blue (Bio-Rad), Cibacron Blue 3GA (Sigma).

A eluição no passo de cromatografia de afinidade com corante imobilizado é preferencialmente realizada utilizando um tampão Tris/HCl ou um tampão fosfato. O mais preferido é um tampão Tris/HCl, contendo cloreto de sódio. O pH do eluente é preferencialmente igual a ou cerca de 7 até a ou cerca de 9, mas preferencialmente o pH está no intervalo entre 7 e 8.

Num outro aspecto, o método de purificação de uma FSH recombinante ou variante da FSH, de acordo com a invenção, compreende os passos de sujeição de um líquido contendo a referida FSH ou variante da FSH a

- uma cromatografia de permuta aniónica,
- uma cromatografia de interacção hidrofóbica,
- uma cromatografia de afinidade com corante, e para além de uma cromatografia de permuta catiónica, que podem ser realizadas em qualquer ordem, em que o método evita qualquer cromatografia de permuta aniónica fraca, bem como qualquer cromatografia de fase reversa.

Numa realização, os passos são realizados pela seguinte ordem: (1) cromatografia de permuta aniónica, (2) cromatografia de interacção hidrofóbica, (3) cromatografia de afinidade com corante, e (4) cromatografia de permuta catiónica.

A cromatografia de permuta catiónica (CEC) baseia-se em interacções de carga-carga entre as proteínas na amostra e as cargas imobilizadas na resina. Na cromatografia de permuta catiónica, os iões de ligação das proteínas são positivos e o grupo funcional imobilizado é negativo. As resinas de permuta de catiões vulgarmente utilizadas são resina-S, derivados de sulfato, e resinas de CM (carboximetilo) resinas, iões derivados carboxilados.

No entanto, em geral, o passo de cromatografia de permuta catiónica pode ser efectuado com todas as resinas ou membranas de permuta catiónica comuns comercialmente disponíveis. As resinas de permuta catiónica podem ser utilizadas sob a forma de colunas pré-empacotadas ou membranas em que o grupo funcional, por exemplo, ácido sulfónico, é fixo. Alternativamente, as colunas podem ser auto-preparadas. Não existem limitações específicas quanto à capacidade e à geometria das colunas, além das habituais. A pessoa perita na técnica sabe que a quantidade de resina de permuta catiónica a ser usada depende do conteúdo total de proteínas do fluido de cultura celular ou de qualquer outro fluido, por exemplo, o eluato de um passo de cromatografia anterior.

As resinas de permuta catiónica típicas que podem ser utilizadas para o objectivo da invenção são disponibilizadas pela GE Healthcare e outros fabricantes de acessórios e colunas de cromatografia iónica. Vulgarmente, a CEC é realizada utilizando tampões com valores de pH entre 4 e 7.

Numa forma de realização preferida, o passo do método de permuta catiónica da invenção é realizado como uma membrana de permuta catiónica. Preferencialmente, o passo de permuta catiónica é realizado com um permutador de catiões acídico forte de ácido sulfónico fixo numa membrana ou com um permutador com características semelhantes.

Adsorventes de membrana adequados para utilização no passo de permuta catiónica da invenção são conhecidos na técnica e estão disponíveis a partir de vários fornecedores. Por exemplo, a cromatografia de permuta catiónica do método da invenção pode ser realizada utilizando uma membrana feita a partir de celulose regenerada, e tendo uma matriz de cromatografia de ácido sulfónico formada na estrutura de celulose. Um exemplo de um adsorvente de membrana útil são os adsorventes de membrana Sartobind S vendidos pela Sartorius. Os dados técnicos do adsorvente de membrana Sartobind S são fornecidos abaixo.

Designação Sartobind SingleSep® (permutador catiónico S de ácido forte)

Ligando Ácido sulfónico ( $R-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ )

Capacidade de ligação estática  $\geq 0,8 \text{ mg/cm}^2$  (29 mg/mL) medido com albumina de soro bovino e lisozima de ovo de galinha

Capacidade iónica 4-6  $\mu\text{eq}/\text{cm}^2$

**Membrana**

Material de base celulose reforçada estabilizada

Espessura da membrana 275  $\mu\text{m}$

Tamanho de poro nominal > 3  $\mu\text{m}$

**Cápsula**

Desenho Cilíndrico, número de camadas nominal: 15

Altura de leito: 4 mm

Material da cápsula Polipropileno (FDA)

Pressão máx. 0,4 MPa (4 bar, 58 psi)

Estabilidade ao pH 3-14 (curto prazo)

Armazenamento Descartar após uma utilização

Estabilidade química Estável contra todos os tampões vulgares utilizados em cromatografia, 1 M NaOH (30-60 min a 20°C), 8 M de ureia, 8 M de hidrocloreto de guanidina, etanol, acetona, e 100% de acetonitrilo. Evitar agentes oxidantes.

O passo de CEC pode ser realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Por exemplo, um tampão de Tris-HCl pode ser utilizado a um pH de 7,0.

Verificou-se que o passo de CEC, preferencialmente o passo de adsorção da membrana catiónica, limpa proteínas da célula hospedeira de todos os tamanhos moleculares enquanto mantém tempos de processo curtos. O rendimento, em cerca de 95%, é muito favorável porque a FSH não se liga ao adsorvente a pH 7,0.

Em geral, verificou-se que a cromatografia de permuta catiónica na forma de uma membrana cromatográfica é muito útil para a purificação da FSH recombinante ou da variante da FSH. Assim, num outro aspecto, a invenção relaciona-se com a utilização de um adsorvente de membrana catiónica num método de purificação da FSH ou variante de FSH. Numa forma de realização preferida, o adsorvente de membrana catiónica é um adsorvente de permuta catiónica, preferencialmente um adsorvente de permuta catiónica forte, feito a partir de celulose regenerada, e tendo uma matriz cromatográfica de ácido sulfónico formado na estrutura de celulose.

Num outro aspecto, o método de purificação da FSH recombinante ou da variante de FSH, de acordo com a invenção, compreende os passos de sujeição de um líquido contendo a referida FSH ou variante de FSH a

- uma cromatografia de permuta aniónica,
- uma cromatografia de interacção hidrofóbica,
- uma cromatografia de afinidade com corante,
- uma cromatografia de permuta catiónica opcional, e

para além de uma cromatografia de permuta aniónica adicional,

que podem ser realizadas em qualquer ordem,

em que o método evita qualquer cromatografia de permuta aniónica fraca, bem como qualquer cromatografia de fase reversa.

Numa realização, os passos são levados acabo pela seguinte ordem: uma primeira cromatografia de permuta aniónica, uma cromatografia de interacção hidrofóbica, cromatografia de afinidade com corante, uma cromatografia de permuta catiónica opcional, e uma segunda cromatografia de permuta aniónica.

A segunda cromatografia de permuta aniónica pode ser realizada utilizando resinas de permuta aniónica típicas, como mencionado acima, em ligação com a primeira cromatografia de permuta aniónica. Além disso, a segunda cromatografia de permuta aniónica é preferencialmente uma cromatografia de permuta aniónica forte que é realizada utilizando uma resina de permuta aniónica forte com grupos funcionais  $-N^+(CH_3)_3$ , ou uma resina com características semelhantes. Os exemplos preferidos de resinas de permuta aniónica forte que podem ser utilizados para o propósito da invenção são resinas de permutadora aniónica fortes de amónio quaternário conhecidas no estado da técnica como UNOsphere Q, Q Sepharose HP e outras resinas tendo fracções de amónio quaternário (Q). As características do permutador aniónico forte UNOsphereQ e Q Sepharose HP são dadas

anteriormente em ligação com a primeira cromatografia de permuta aniónica. Também no segundo passo de cromatografia de permuta aniónica, é preferível evitar a utilização de resinas de permuta aniónica fracas, tais como as baseadas em dietilaminoetilo (DEAE) ou dimetilaminoetilo (DMAE) como grupos funcionais.

O passo de cromatografia de permuta aniónica é realizado preferencialmente utilizando um tampão com um pH ligeiramente alcalino, por exemplo, a ou cerca de 7,0 a ou cerca de 9,0, ou a ou cerca de 7,5 a ou cerca de 8,5. Os tampões adequados incluem, por exemplo, tampão borato, ácido Tris iminodiacético/trietanolamina, acetato de amónio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. A utilização de um tampão Tris é preferida. A eluição da resina de permuta aniónica é normalmente conseguida através do aumento da condutividade da fase móvel através da adição de sal, de preferência cloreto de sódio.

Numa forma de realização, a segunda cromatografia de permuta aniónica é realizada utilizando um tampão Tris-HCl/cloreto de sódio como eluente a um pH na gama entre 7,0 e 9,0.

Num outro aspecto, o método de purificação de uma FSH recombinante ou da variante da FSH, de acordo com a invenção, compreende os passos de sujeição de um líquido contendo a referida FSH ou variante da FSH a  
- uma cromatografia de permuta aniónica,

- uma cromatografia de interacção hidrofóbica, e  
- de uma cromatografia de afinidade com corante,  
que podem ser realizadas em qualquer ordem,  
em que o método evita qualquer cromatografia de permuta  
aniónica fraca, bem como qualquer cromatografia de fase  
reversa, e  
em que o método compreende ainda uma cromatografia de  
exclusão molecular.

Num outro aspecto, o método de purificação da FSH  
recombinante ou da variante da FSH, de acordo com a  
invenção, compreende os passos de sujeição de um líquido  
contendo a referida FSH ou variante da FSH a  
- uma cromatografia de permuta aniónica,  
- uma cromatografia de interacção hidrofóbica,  
- uma cromatografia de afinidade com corante,  
- uma cromatografia de permuta catiónica opcional,  
- uma cromatografia de permuta aniónica adicional opcional,  
e  
- uma cromatografia de exclusão molecular,  
que podem ser realizadas em qualquer ordem,  
em que o método evita qualquer cromatografia de permuta  
aniónica fraca, bem como qualquer cromatografia de fase  
reversa.

Numa forma de realização, os passos são reali-  
zados pela seguinte ordem: uma cromatografia de permuta  
aniónica, uma cromatografia de interacção hidrofóbica,  
cromatografia de afinidade com corante, uma cromatografia

de permuta catiónica opcional, uma cromatografia de permuta aniónica adicional opcional, e uma cromatografia de exclusão molecular.

Numa forma de realização preferida, o método da invenção comprehende os seguintes passos pela seguinte ordem: uma primeira cromatografia de permuta aniónica, uma cromatografia de interacção hidrofóbica, uma cromatografia de afinidade de corante, uma cromatografia de permuta catiónica opcional, uma segunda cromatografia de permuta aniónica opcional, e uma cromatografia de exclusão molecular.

A cromatografia de exclusão molecular (SEC), também conhecida como cromatografia de filtração em gel, é um método cromatográfico em que as partículas, por exemplo, proteínas e outras biomoléculas, são separadas com base no seu tamanho. Um meio de gel típico para a SEC é poliacrilamida, dextrano, agarose ou uma mistura destes. As matrizes da SEC estão disponíveis por vários fabricantes de acessórios cromatográficos e de colunas, por exemplo, da Tosoh Bioscience LLC ou GE Healthcare.

A cromatografia de exclusão molecular é preferencialmente realizada utilizando uma matriz de compósito esférico de dextrano e agarose reticulados.

Exemplos de matrizes cromatográficas de exclusão de tamanho úteis são matrizes conhecidas na técnica como Superdex 75 pg, disponíveis por exemplo, da GE Healthcare.

As colunas Superdex 75 pg permitem a separação de alta resolução de proteínas, péptidos, e outras biomoléculas de acordo com o tamanho. Geralmente, as colunas de exclusão de tamanho são ideais para o passo de polimento num procedimento de purificação.

Os detalhes técnicos da matriz Superdex 75 pg são como se segue:

Límite de exclusão     $1 \times 10^5$  proteína globular  
(M<sub>r</sub>)

Gama de separação    3000-7000 proteína globular  
(M<sub>r</sub>)

Matriz                Compósito esférico de agarose e dextrano  
                        reticulados

Tamanho médio de    34 µm  
partícula

Estabilidade química Estável em todos os tampões comuns:

1 M de ácido acético, 8M de ureia, 6 M de hidrocloreto de guanidina, 30% de álcool isopropílico, 70% de etanol,  
1 M de NaOH (para a limpeza no local)

Estabilidade ao pH    3-12 (em trabalho e longo prazo), 1-14 (curto prazo)

Colunas Superdex™ 10/300 GL (Tricorn)\*

Dimensões de leito    10 x 300 mm

Volume de amostra    25-250 µL  
recomendado

Volume de leito    24 mL

(continuação)

Pressão máx. 18 bar (261 psi, 1,8 MPa)

Caudal máx. (H<sub>2</sub>O a 1,5 mL/min  
25°C)Pratos teóricos > 30 000 m<sup>-1</sup>

Colunas Superdex™ PC

3,2/30

Dimensões de leito 3,2 x 300 mm

Volume de leito 2,4 mL

Volume de amostra 2-25 µL

recomendado

Pressão máx. 24 bar (348 psi, 2,4 MPa)

Caudal máx. (H<sub>2</sub>O a 0,100 mL/min  
25°C)Pratos teóricos > 30 000 m<sup>-1</sup>

Armazenamento 20% etanol

Temperatura de armazenamento 4°C a 30°C

O passo SEC pode ser realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Por exemplo, um tampão de fosfato de sódio pode ser utilizado a um pH de 6 a 8, preferencialmente a cerca de pH 7,0.

Numa forma de realização preferida da invenção, o método da invenção compreende os seguintes passos pela seguinte ordem: uma primeira cromatografia de permuta aniónica, uma cromatografia de interacção hidrofóbica, cromatografia de afinidade com corante, uma cromatografia

de permuta catiónica, uma segunda cromatografia de permuta aniónica, e uma cromatografia de exclusão molecular.

Numa forma de realização preferida, o passo de cromatografia de permuta catiónica do método da invenção é realizado como uma membrana de permuta catiónica. Preferencialmente, o passo de permuta catiónica é realizado com um permutador catiónico acídico forte de ácido sulfónico, fixado numa membrana ou num permutador com características semelhantes.

Além disso, o método da invenção compreende um ou mais passos de ultrafiltração e/ou de nanofiltração. A ultrafiltração é uma forma de filtração por membrana em que a pressão hidrostática força um líquido contra uma membrana semipermeável. Os sólidos e solutos em suspensão de elevado peso molecular são retidos, enquanto que a água e os solutos de baixo peso molecular passam através da membrana. A ultrafiltração é um método vulgarmente utilizado para a purificação e concentração de soluções macromoleculares, especialmente soluções de proteína. A ultrafiltração é semelhante à nanofiltração, diferindo no entanto em termos do tamanho das moléculas que retém. No âmbito da presente invenção, um peso molecular de "cut-off" de 10 kDa é preferido (UF de 10 kDa). As membranas de UF podem também ser utilizadas para diafiltração para remover sais e outras microespécies da solução através de diluição e reconcentração repetida ou contínua.

Numa forma de realização preferida da invenção, o processo de purificação compreende um ou mais passos de ultrafiltração/diafiltração e/ou nanofiltração. Estes passos de filtração podem ser realizados utilizando dispositivos de filtração comercialmente disponíveis, por exemplo, disponível da GE Healthcare ou da Sartorius.

A ultrafiltração é realizada preferencialmente utilizando as cassetes Sartocon e cassetes Sartocon Slice vendidos pela Sartorius.

Membrana	Polietersulfona (PESU) ou Hydrosart®
Peso molecular de "cut-off"	10 kDa
Área de filtração	0,02 a 0,7 m <sup>2</sup>
Pressão de alimentação	4 bar (58 psi) máximo
Estabilidade ao pH	1-14
Temperatura de operação	50°C máximo, a 20°C
Limpeza	1 M NaOH, 40°C
Desinfecção	1 M de NaOH, 40-50°C, 30 min
Armazenamento	0,1 M de NaOH

A membrana de polietersulfona (PESU), utilizada nas cassetes de filtração tangencial vendidas pela Sartorius é uma membrana de polímero estável que permite uma gama ampla de pH e de temperatura.

As cassetes de ultrafiltração Hydrosart® vendidas pela Sartorius podem também ser utilizadas. Hydrosart é uma membrana à base de celulose estabilizada que foi optimizada

para aplicações biotecnológicas. As membranas e cassetes de ultrafiltração Hydrosart estão disponíveis nos seguintes "cut-offs" de peso molecular nominal: 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, e 30 kDa.

Numa forma de realização preferida, o método de purificação inclui um passo de nanofiltração. A nanofiltração pode ser realizada utilizando qualquer dispositivo de nano-filtro útil. A nanofiltração é preferencialmente realizada utilizando filtros Planova, disponíveis pela Asahi Kasei Medical Co., Ltd.

Os filtros Planova são concebidos para remover vírus durante o fabrico de fármacos bioterapêuticos, tais como biofarmacêuticos. Baseiam-se numa membrana microporosa de fibras ocas construída por celulose regenerada de tertra-amino-cobre naturalmente hidrofílica com uma distribuição de poro estreita, os filtros Planova estão disponíveis como descartáveis, módulos auto-contidos em quatro tamanhos médio de poro de 15 nm, 19 nm, 35 nm e 72 nm (Planova 15N, 20N, 35N, e 75N, respectivamente). No processo da invenção, é preferida a utilização de um filtro Planova 15N, ou seja, um filtro com um tamanho médio de poro de 15 nm. O filtro é utilizado de acordo com o protocolo do fornecedor.

É preferível que o método de purificação da FSH, de acordo com a invenção, não compreenda uma cromatografia de afinidade com íões metálicos.

Além disso, é também preferido que o método da presente invenção evite uma cromatografia de imunoafinidade. A purificação da FSH sem passos de cromatografia de imunoafinidade elimina possíveis interferências resultantes de impurezas ou agentes infecciosos, derivada da preparação do anticorpo, com o composto de FSH.

A divulgação refere-se também a um método de purificação da FSH recombinante ou uma variante de FSH recombinante, compreendendo o passo de sujeitar um líquido contendo a referida FSH ou variante de FSH com um permutador catiónico de membrana.

Num aspecto preferido, o permutador catiónico de membrana é um permutador catiónico acídico de ácido sulfónico, fixo numa membrana, ou num permutador com características semelhantes.

Adsorventes de membrana adequados são conhecidos do estado da técnica e estão disponíveis de vários fornecedores. Por exemplo, a cromatografia de permuta catiónica pode ser realizada utilizando uma membrana feita a partir de celulose regenerada, e tendo uma matriz cromatográfica de ácido sulfônico formado sobre a estrutura de celulose. Um exemplo de um adsorvente de membrana útil são os adsorventes de membrana Sartobind S vendidos pela Sartorius. Os pormenores técnicos da mesma são dadas acima.

Num outro aspecto, o método de purificação da FSH recombinante ou uma variante de FSH recombinante, compreendendo o passo de sujeitar um líquido contendo FSH a um permutador catiónico de membrana compreende ainda uma cromatografia de interacção hidrofóbica.

A chromatografia de interacção hidrofóbica pode ser realizada como descrito acima em ligação com o método de purificação de uma FSH recombinante ou da variante de FSH recombinante, compreendendo os passos de sujeição de um líquido contendo a referida FSH ou variante de FSH a uma chromatografia de permuta aniónica, uma chromatografia de interacção hidrofóbica, e uma chromatografia de afinidade com corante, os quais podem ser realizados por qualquer ordem,

em que o método nem compreende uma chromatografia de permuta aniónica fraca nem uma chromatografia de fase reversa, e formas de realização preferidas da mesma.

Num aspecto preferido, a chromatografia de interacção hidrofóbica é realizada utilizando uma resina consistindo em esferas de agarose reticulada derivatizadas com grupos fenilo ou butilo, ou uma resina com características semelhantes.

Salvo indicação em contrário, as seguintes definições são destinadas a ilustrar e a definir o significado e âmbito dos vários termos utilizados para descrever a presente invenção.

O termo "FSH" refere-se a uma hormona polipeptídica folículo-estimulante como uma proteína madura de comprimento total que inclui, mas não se limita a, FSH humana ou "hFSH", seja produzida por via recombinante ou isolada a partir de fontes humanas, como a urina mulheres na pós-menopausa. A sequência proteica da glicoproteína humana e a sequência proteica da subunidade  $\beta$  da FSH humana são conhecidas para o especialista a partir da literatura científica e de patentes (ver, por exemplo WO 2004/087213).

A sequência de aminoácidos da cadeia  $\alpha$  da FSH humana é apresentada na SEQ ID No. 1, e a sequência de aminoácidos da cadeia  $\beta$  da FSH humana é apresentada na SEQ ID No. 2, conforme anexado a esta descrição. Estas sequências de aminoácidos correspondem às sequências de aminoácidos do tipo nativo da cadeia  $\alpha$  e  $\beta$  da FSH humana, tal como depositada sob o número de acesso J00152 na base de dados EMBL e sob o número de acesso NM\_000510 na base de dados do NCBI, respectivamente.

As sequências de ácidos nucleicos do tipo nativo que codificam para a FSH humana são apresentadas na SEQ ID No. 3 (= cadeia  $\alpha$ ) e No. 4 (= cadeia  $\beta$ ).

A FSH recombinante pode ser codificada pela sequência de ácidos nucleicos do tipo nativo como naturalmente encontrada em humanos, ou pode ser codificada por uma sequência de ácidos nucleicos alterada cuja expressão resulta numa FSH possuindo a sequência de aminoácidos

do tipo nativo, ou seja, a sequência proteica do tipo nativo como naturalmente encontrada em humanos.

A sequência de ácido nucleico que codifica para a FSH humana pode, por exemplo, ser alterada de tal forma que uma ou ambas as sequências de ácidos nucleicos que codificam para a cadeia  $\alpha$  e para a cadeia  $\beta$  da FSH humana foram adaptadas à utilização de codão em células de ovário de hamster chinês (CHO), de modo a aumentar o nível de expressão e rendimento de FSH recombinante nestas células hospedeiras.

Um exemplo de sequências de ácidos nucleicos que codificam para a FSH humana e que foram modificadas no que se refere à utilização do codão em células CHO é descrita no pedido de patente internacional WO 2009/000913. A sequência de ácido nucleico modificados que codifica para a cadeia  $\beta$  da FSH humana é a região de codificação da sequência de ácidos nucleicos representada na SEQ ID No. 5 (na SEQ DD No. 5, a região de codificação começa no nucleótido 56 e estende-se até ao nucleótido 442), e a sequência de ácido nucleico modificado que codifica para a cadeia  $\alpha$  da FSH humana é a região de codificação da sequência de ácido nucleico apresentada na SEQ ID No. 6 (na SEQ ID No. 6 a região de codificação começa no nucleótido 19 e estende-se até ao nucleótido 366). Uma linha de células de CHO contendo uma molécula de ácido nucleico recombinante compreendendo uma primeira sequência de ácido nucleico modificada que codifica para a cadeia  $\beta$  da FSH humana e uma segunda sequência de ácido nucleico modificada

que codifica para a cadeia  $\alpha$  da FSH humana foi depositada em 28 de Março de 2007, na DSMZ em Braunschweig com o número de depósito DSM ACC2833.

Numa forma de realização preferida, a formulação líquida de FSH contém uma FSH humana recombinante do tipo nativo, que é obtida por expressão de genes recombinantes das sequências de ácidos nucleicos de FSH que são modificadas no que diz respeito à utilização de codões em células de CHO relativamente a ambas as cadeias  $\beta$  da FSH humana e a cadeias  $\alpha$  da FSH. Numa outra forma de realização preferida, a FSH recombinante é obtida por expressão a partir de sequências de ácidos nucleicos da FSH divulgadas em WO 2009/000913.

A expressão "variante da FSH" pretende englobar aquelas moléculas que diferem na sequência de aminoácidos, no padrão de glicosilação ou na ligação de inter-subunidade da FSH humana mas que apresentam actividade de FSH. Exemplos incluem CTP-FSH, uma FSH recombinante modificada de acção longa, que consiste na subunidade  $\alpha$  do tipo nativo e na subunidade  $\beta$  híbrida, em que o péptido da extremidade carboxilo da hCG foi fundido à extremidade C- da subunidade  $\beta$  da FSH, como descrito em LaPolt et. al. (1992) Endocrinology, 131, 2514-2520; ou Klein et al. (2003) Human Reprod., 18, 50-56. Também está incluída uma cadeia simples de CTP-FSH, uma molécula de cadeia simples descrita por Klein et. al. (2002) Fertility & Sterility, 77, 1248-1255. Outros exemplos de variantes da FSH incluem moléculas de FSH com sítios de glicosilação adicionais incorporados na

subunidade  $\alpha$  e/ou na subunidade  $\beta$ , tais como divulgado em WO 01/58493, e moléculas de FSH com ligações S-S inter-subunidades, como descrito em WO 98/58957. Outros exemplos de variantes da FSH são divulgados em WO 2004/087213, que são caracterizados por deleções da extremidade carboxilo da subunidade  $\beta$ . Outros exemplos de variantes da FSH incluem moléculas de FSH com um grau alterado de glicosilação em comparação com o tipo nativo de FSH, devido a alterações na sequência de aminoácidos da proteína, através da qual um local ou locais de glicosilação adicional são introduzidos ou um local ou locais de glicosilação que ocorrem naturalmente são excluídos.

Além disso, a FSH ou variante de FSH de acordo com a invenção pode ser uma molécula de FSH que foi modificada por porções químicas. Tais conjugados da FSH podem por exemplo compreender poli alquíleno glicol (tal como o PEG), o amido hidroxialquilo (tal como o HES) ou outras porções poliméricas.

Heterodímeros da FSH ou os heterodímeros de variantes de FSH podem ser produzidos por qualquer método adequado, tal como por via recombinante, por isolamento ou purificação de fontes naturais ou por síntese química, ou qualquer combinação destes.

A utilização do termo "recombinante" refere-se a preparações de FSH ou variantes de FSH, que são produzidas através da utilização de tecnologia de ADN recombinante (ver por exemplo WO 85/01958). As sequências para os clones

de ADNC genómico de FSH são conhecidas para as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de várias espécies. Vários métodos de produção de FSH recombinante ou variantes de FSH utilizando a tecnologia recombinante, estão descritos na técnica anterior, ver por exemplo pedido de patente Europeia EP 0 711 894 e pedido de patente Europeia EP 0 487 512.

Preferencialmente, a FSH purificada de acordo com a invenção tem uma subunidade alfa de acordo com a SEQ ID No. 1 e uma subunidade beta de acordo com a SEQ ID No. 2.

Num outro aspecto, a divulgação refere-se a uma proteína de FSH purificada ou uma proteína variante de FSH obtida pelo método de purificação de acordo com a invenção.

A divulgação refere-se ainda a uma composição farmacêutica compreendendo FSH ou variante de FSH purificada utilizando o método da invenção, bem como um excipiente farmaceuticamente aceitável. Num aspecto preferido, a composição farmacêutica contém um conservante e pode ser utilizada para a administração de doses múltiplas. As composições farmacêuticas preferidas são descritas em PCT/EP2009/051451.

Além disso, a invenção também se refere à utilização da FSH ou variante de FSH purificada utilizando o método da invenção, ou à utilização de uma composição farmacêutica compreendendo a referida FSH ou variante de FSH, em combinação com excipientes farmaceuticamente aceitáveis para o tratamento de distúrbios de fertilidade.

Num outro aspecto, a invenção refere-se a um método de produção de FSH recombinante ou uma variante de FSH compreendendo os passos de:

- a) obtenção de um clone de células de CHO que produz FSH recombinante ou uma variante de FSH recombinante a partir de uma ou mais moléculas de ácido nucleico que codificam para a FSH ou variante de FSH;
- b) cultura de células hospedeiras de CHO sob condições adequadas, e
- c) purificação da FSH recombinante ou da variante de FSH recombinante da cultura de celular de acordo com o método da invenção.

A FSH humana recombinante é purificada a partir do sobrenadante da cultura de células hospedeiras através do método da invenção. A FSH humana recombinante ou variante de FSH é preferencialmente produzida como descrito no pedido de patente internacional WO 2009/000913.

Mais preferencialmente, a FSH é FSH humana que tem sido produzida por via recombinante, particularmente preferencialmente produzida em células de ovário de hamster chinês transfectadas com um vector ou vectores que compreendem ADN que codificam para subunidade  $\alpha$  e para a subunidade  $\beta$  da glicoproteína humana da FSH, quer codificada pela SEQ ID No. 3 e 4 (= sequências de ácido nucleico do tipo nativo) ou por SEQ ID No. 5 e 6 (= sequências de ácidos nucleicos com codões optimizados). O

ADN que codifica para as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  pode estar presente no mesmo vector ou em vectores diferentes.

A FSH recombinante apresenta diversas vantagens sobre a sua homóloga urinária. Técnicas de cultura e isolamento usando células recombinantes permitem a consistência entre os lotes. Pelo contrário, a FSH urinária varia muito de lote para lote em características como a pureza, padrão de glicosilação, sialilação e oxidação das subunidades. Devido a uma maior consistência e pureza da FSH recombinante de lote para lote, a hormona pode ser prontamente identificada e quantificada utilizando técnicas tais como focagem isoeléctrica (IEF). A facilidade com que a FSH recombinante pode ser identificada e quantificada permite o enchimento dos frascos por massa de hormona (preencher-por-massa) em vez de enchimento através de um bioensaio.

O termo "actividade da FSH" refere-se à capacidade de uma formulação de FSH em induzir respostas biológicas associadas com a FSH, tal como o ganho de peso dos ovários no ensaio de Steelman-Pohley (Steelman et al. (1953) Endocrinology 53, 604-616), ou o crescimento folicular numa paciente feminina. O crescimento folicular numa paciente feminina pode ser avaliado por ultrassons, por exemplo, em termos do número de folículos com um diâmetro médio de cerca de 16 mm no dia 8 de estimulação. A actividade biológica é avaliada em relação a um padrão aceite para a FSH.

A bioactividade específica *in vivo* da FSH recombinante é normalmente na gama de cerca de 8000 IU de FSH/mg de proteína a cerca de 16000 UI de FSH/mg de proteína. Por exemplo, a FSH humana recombinante no produto comercialmente disponível Puregon (da Organon) possui uma bioactividade específica de cerca de 10000 IE/mg de proteína, e para o Gonad-f da Serono a bioactividade da FSH humana recombinante é de cerca de 13600 IE/mg de proteína.

A actividade da FSH pode ser determinada por métodos conhecidos relacionados com FSH e outras gonadotrofinas. Tais métodos incluem, por exemplo, ensaio de imunoactividade com enzima (EIA) ou ensaios com gene repórter. A bioactividade é normalmente determinada pelo bioensaio descrito na Farmacopeia Europeia, 5<sup>a</sup> Edição para a FSH derivada da urina, a bioactividade é estimada por comparação do efeito da FSH no aumento do tamanho dos ovários de ratos imaturos tratados com gonadotrofina coriónica com o mesmo efeito de uma preparação padrão.

A actividade biológica da FSH ou da variante de FSH pode ser avaliada pela comparação, sob determinadas condições, do seu efeito no aumento de tamanho dos ovários de ratos imaturos tratados com gonadotrofina coriónica com o mesmo efeito utilizando uma preparação de Padrão Internacional ou de uma preparação de referência calibrada em Unidades Internacionais (Farmacopeia Europeia, 5<sup>a</sup> Edição).

A medição da actividade da FSH *in vitro* é, por exemplo, descrita por Albanese et. al. (1994) Mol. Cell Endocrinol. 101: 211-219.

A pureza da FSH ou variante de FSH obtida pelo método da invenção é pelo menos 95%, de preferência pelo menos 97%, mais preferencialmente pelo menos 99% e ainda mais preferencialmente mais do que 99%. O grau de pureza pode ser determinado por meio de análise por HPLC. Materiais e protocolos adequados para a realização de tais análises podem ser obtidos de fornecedores comerciais tais como a Vydac ou a TOSOH Bioscience.

Os exemplos seguintes são fornecidos meramente para ilustrar adicionalmente o método de purificação da invenção. O âmbito da invenção não deverá ser interpretado como consistindo meramente nos exemplos seguintes.

#### EXEMPLOS

##### Exemplo 1

Preparação de uma FSH humana recombinante por tecnologias recombinantes

A FSH humana recombinante é produzida em células hospedeiras de CHO transfetadas por métodos convencionais. Estes métodos incluem a geração de um clone de célula de CHO que produz a FSH humana recombinante a partir de uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que

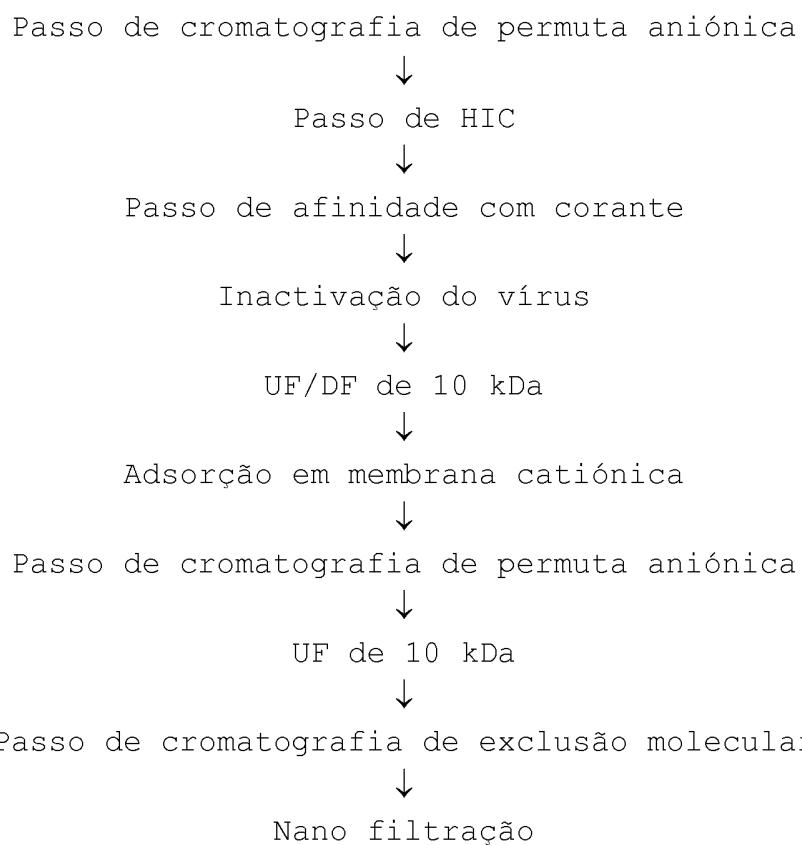
codificam para a cadeia α e para a cadeia β de FSH humana, e cultura das células hospedeiras sob condições adequadas. A FSH humana recombinante é então purificada a partir da cultura de células de acordo com a invenção.

Numa forma de realização preferida, a FSH humana recombinante é produzida como descrito no pedido de patente internacional WO 2009/000913.

#### Exemplo 2

Purificação da FSH a partir de cultura de células

O esquema de purificação é o seguinte:



A duração da fermentação foi de 28 dias, e o volume de fermentação foi de 30 L. A cultura recolhida foi filtrada por um filtro de 0,22 µm e diluída com água de OI por um factor de 3,5.

Passo de cromatografia de permuta aniónica (AEC) :

O sobrenadante diluído recolhido da cultura celular foi sujeito a cromatografia de permuta aniónica usando a resina de permuta aniónica de amónio quaternário conhecida na arte como UNOsphere Q. Esta matriz está disponível da BioRad.

Três volumes de coluna (VC) de 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6 foram utilizados para equilibrar a coluna. A coluna foi carregada com a cultura recolhida (diluída 1:3,5 com água OI, o título da cultura recolhida era aprox. 1,8 µg de FSH/mL) e posteriormente lavada com 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6 (5 VC). Em seguida, a coluna foi lavada com 50 mM de Tris-HCl, 15 mM de NaCl, pH 7,6 (5 VC), e a proteína foi eluída utilizando 50 mM de Tris-HCl, 200 mM de NaCl, pH 7,6 (8 VC). O passo do rendimento foi de 90% e superior.

Passo de HIC:

A HIC foi realizada utilizando uma resina consistindo em esferas de agarose reticulada derivatizadas com fenilo. Phenyl Sepharose 6 FF (disponíveis da GE Healthcare) é um derivado altamente reticulado baseado em agarose. É física e quimicamente estável permitindo caudais

elevadas e maiores tempos de vida de resina. Os pormenores técnicos desta resina são apresentados acima.

Oito eluatos de AEC foram reunidos e diluídos por um factor de 3 com 50 mM de Tris-HCl, NaCl 4,5, pH 7,6. A coluna de HIC foi equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, 3 M de NaCl, pH 7,6 (4 VC) e carregada com o eluato de AEC diluído 1:3. Em seguida, a coluna foi posteriormente lavada usando 50 mM de Tris-HCl, 3 M de NaCl, pH 7,6 (3 VC) e lavada utilizando 50 mM de Tris-HCl, 1,8 M de NaCl, pH 7,6 (5 VC). Verificou-se que o tampão de lavagem com 1,8 M de NaCl tem um bom potencial de libertação sem perda detectável de FSH. A proteína foi então eluída com 50 mM de Tris-HCl, 0,8 M de NaCl, pH 7,6 (6 VC).

O rendimento de FSH do passo de HIC foi > 95% sem qualquer perda significativa durante a carga e um bom potencial de libertação total de proteínas de aprox. um factor 10. Estes dados mostram que o passo de HIC desenvolvido é um passo de purificação muito eficiente com um rendimento e qualidade do produto razoáveis.

**Passo de cromatografia de afinidade com corante:**

Blue-Sepharose FF, disponível pela GE Healthcare, foi utilizada para o passo de cromatografia de afinidade com corante. O eluato de HIC foi diluído com 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6 por um factor de 4. A coluna foi equilibrada utilizando 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6 (3 VC) e carregada com o eluato de HIC diluído 1:4. A coluna foi lavada posteriormente com 50 mM

Tris-HCl, pH 7,6 (3 VC), e a proteína da FSH foi eluída com 50 mM de Tris-HCl, NaCl 4 M, pH 7,6 (6 VC).

A seguir à cromatografia de afinidade foi realizado um passo de inactivação de vírus por incubação do eluato em 15% de 2-propanol, durante 2 horas. Para este efeito, o eluato da cromatografia de afinidade com corante foi diluído por um factor de 2 com 50 mM de Tris-HCl, 30% de 2-propanol, pH 7,6, resultando em 50 mM de Tris-HCl, 15% de 2-propanol, 2 M de NaCl, pH 7,6. Após incubação durante 2 horas o eluato da cromatografia por afinidade com corante com o vírus inactivado foi diluído com 20 mM de Tris-HCl, pH 7,0 por um factor de 2.

UF/DF de 10 kDa:

A ultrafiltração e a diafiltração foi geralmente levada a cabo de acordo com protocolos convencionais. Dispositivos úteis de UF/DF são as cassetes Sartocon ultrafiltração/diafiltração (polietersulfona (PESU), 10 kDa) da Sartorius (área de filtração: 14000 cm<sup>2</sup>, factor de UF: 13-20, factor de DF: 8-10, carga: 0,1 a 0,5 mg de FSH/cm<sup>2</sup>). A diafiltração com dispositivos de UF/DF foi geralmente realizada com factores de ultrafiltração (concentração) de 13 a 20 e factores de diafiltração de 8 a 10.

O eluato da cromatografia de afinidade com corante com o vírus inactivado foi diafiltrado em tampão Tris-HCl (20 mM Tris-HCl, pH 7,0) e carregou-se directamente sobre o adsorvente de membrana catiónica.

**Passo de adsorção em membrana catiónica:**

A cromatografia de permuta catiónica do método da invenção foi realizada utilizando uma membrana feita a partir de celulose regenerada, e com uma matriz cromatográfica de ácido sulfônico formada sobre a estrutura de celulose. Tal adsorvente de membrana está disponível da Sartorius sob o nome comercial de adsorvente de membrana Sartobind S. Um adsorvente de membrana Sartobind S é uma cápsula com várias camadas de membrana, em que o ligando é imobilizado. Adsorventes de membrana têm a vantagem de tempos de processo curtos e volumes de tampão baixos. Os custos e tempos de validação são insignificantes devido ao conceito de material descartável.

O adsorvente de membrana foi equilibrado com 20 mM de Tris-HCl, pH 7,0 (200 mL) e carregou-se o retentado de 10 kDa de UF/DF (aprox. 100 mL). O adsorvente foi lavado posteriormente com 20 mM de Tris-HCl, pH 7,0 (200 mL).

O processamento sobre o adsorvente de membrana está em modo de recolha no material que sai do dispositivo o que reduz os tempos de processo. Além disso, não é necessário nenhum condicionamento de carga no que diz respeito ao passo seguinte do processo (cromatografia de permuta aniónica). O rendimento do produto no material obtido à saída foi muito bom. Não houve praticamente nenhuma perda de produto durante o processamento através de um módulo Sartobind S a valores de pH 6,0, 6,5 e 7,0 em diferentes sistemas de tampão.

O passo de adsorvente de membrana catiónica é muito vantajoso para a depuração de HCP (proteína da célula hospedeira). O rendimento, em 90 a 95%, é muito favorável porque a FSH a ser purificada não se liga ao adsorvente, a pH 7,0 em 20 mM de sistema tampão de Tris-HCl.

Passo de cromatografia de permuta aniónica:

Uma segunda cromatografia de permuta aniónica foi realizada utilizando a resina permutadora aniónica forte de amónio quaternário conhecida na técnica como Q Sepharose HP. Esta resina está disponível da GE Healthcare.

A coluna de AEC foi equilibrada com 20 mM de Tris-HCl, pH 7,0 (3 VC). A fracção que passou pelo adsorvente de membrana foi carregada na coluna (3 VC), e a coluna foi lavada primeiro com 20 mM de Tris-HCl, pH 7,0 (2 VC), em seguida, com 20 mM de Tris-HCl, pH 8,5 (3 VC) e finalmente lavada com 20 mM de Tris-HCl, 60 mM NaCl, pH 8,5 (5 VC). Em seguida, a FSH foi eluída com 20 mM de Tris-HCl, 130 mM de NaCl, pH 8,5 (6 VC).

O eluato Q Sepharose HP tem um grau de pureza muito elevado, comparável ao produto comercial GONAL-f®.

UF de 10 kDa:

A ultrafiltração de 10 kDa foi realizada de

acordo com protocolos convencionais, utilizando a cassette de ultrafiltração Sartocon (PESU, 10 kDa) da Sartorius (área de filtro: 3.000 cm<sup>2</sup>, Factor de UF: 10-30, carga: 0,2 a 1,0 mg de FSH/cm<sup>2</sup>). A ultrafiltração foi geralmente realizada com factores de ultrafiltração (concentração) de 10 a 30.

Passo de cromatografia de exclusão molecular (SEC):

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada utilizando Superdex 75 pg, disponível pela GE Healthcare. A coluna foi equilibrada usando 50 mM de Na-PO<sub>4</sub>, pH 7,0 (2 VC). O retentado da UF de 10 kDa foi carregado na coluna (VC 0,025), e a coluna foi lavada posteriormente com 50 mM de Na- PO<sub>4</sub>, pH 7,0 (2 VC).

O eluato SEC tem um elevado grau de pureza na mesma gama que o produto comercial GONAL-f®.

Nanofiltração:

Finalmente, o eluato de SEC foi nanofiltrado utilizando filtros Planova 15N, vendidos pela Asahi Kasei Medical Co., Ltd., com o tamanho médio dos poros de 15 nm. A carga alvo máxima foi de 2,5 mL/cm<sup>2</sup>. A filtração foi realizada em conformidade com o protocolo do fornecedor.

A pureza da FSH purificada foi medida por SE-HPLC e SDS-PAGE. A pureza e as impurezas especificadas da FSH obtida foram os seguintes:

SE-HPLC (Dímeros e substâncias relacionadas < 1% de peso molecular superior)	
SDS-PAGE red. (coloidal)	pureza > 97%
HCP (genérico)	< 10 ppm
ADN	< 0,006 pg/IU de FSH

A bioactividade da FSH humana recombinante foi determinada como sendo, pelo menos, cerca de 10000 UI/mg. Preferivelmente, a bioactividade da FSH humana recombinante ou da variante de FSH situa-se na gama de cerca de 10000 IU/mg a cerca de 17000 UI/mg, mais preferivelmente, a bioactividade é pelo menos cerca de 12000 IU/mg, e ainda mais preferivelmente a bioactividade é pelo menos cerca de 15000 UI/mg.

Listagem de sequências:

SEQ ID NO. 1: sequência de aminoácidos da cadeia α da FSH humana

SEQ ID No. 2: sequência de aminoácidos da cadeia β da FSH humana

SEQ ID No. 3: sequência de ácidos nucleicos do tipo nativo que codifica para a cadeia α da FSH humana

SEQ ID No. 4: sequência de ácido nucleico do tipo nativo que codifica para a cadeia β da FSH humana

SEQ ID No. 5: sequência de ácidos nucleicos com codões optimizados que codifica para a cadeia β da FSH humana

SEQ ID No. 6: sequência de ácidos nucleicos com codões optimizados que codifica para a cadeia α da FSH humana

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

&lt;110&gt; Briogenerix AG

&lt;120&gt; Método de purificação da FSH recombinante

&lt;130&gt; B 9682/RN

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn versão 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CADEIA

&lt;222&gt; (1)...(116)

&lt;223&gt; cadeia alfa da FSH humana

&lt;400&gt; 1

Met	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ile	Phe	Leu	Val	Thr	Leu	Ser
1										5	10				15

Val	Phe	Leu	His	Val	Leu	His	Ser	Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro
									20	25				30	

Glu	Cys	Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	Ser	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro
							35		40		45				

Ile	Leu	Gln	Cys	Met	Gly	Cys	Cys	Phe	Ser	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr	Pro
50							55			60					

Leu	Arg	Ser	Lys	Lys	Thr	Met	Leu	Val	Gln	Lys	Asn	Val	Thr	Ser	Glu
65							70			75					80

Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Ala	Lys	Ser	Tyr	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Met	Gly
							85			90				95	

Gly	Phe	Lys	Val	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Cys	His	Cys	Ser	Thr	Cys	Tyr
							100		105					110	

Tyr	His	Lys	Ser
		115	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 129

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CADEIA

&lt;222&gt; (1)...(129)

&lt;223&gt; cadeia beta da FSH humana

&lt;400&gt; 2

Met	Lys	Thr	Leu	Gln	Phe	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Cys	Trp	Lys	Ala	Ile
1				5					10				15		

Cys	Cys	Asn	Ser	Cys	Glu	Leu	Thr	Asn	Ile	Thr	Ile	Ala	Ile	Glu	Lys
					20				25				30		

Glu	Glu	Cys	Arg	Phe	Cys	Ile	Ser	Ile	Asn	Thr	Thr	Trp	Cys	Ala	Gly
						35		40				45			

Tyr	Cys	Tyr	Thr	Arg	Asp	Leu	Val	Tyr	Lys	Asp	Pro	Ala	Arg	Pro	Lys
					55				60						

Ile	Gln	Lys	Thr	Cys	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Val	Tyr	Glu	Thr	Val	Arg
65					70				75				80		

Val	Pro	Gly	Cys	Ala	His	His	Ala	Asp	Ser	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Val
					85				90				95		

Ala	Thr	Gln	Cys	His	Cys	Gly	Lys	Cys	Asp	Ser	Asp	Ser	Thr	Asp	Cys
						100			105				110		

Thr	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Tyr	Cys	Ser	Phe	Gly	Glu	Met	Lys
		115					120							125	

**Glu**

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 369

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; características distintas

&lt;223&gt; sequência de ácido nucleico do tipo nativo que codifica para a cadeia alfa da FSH humana

&lt;400&gt; 3

cttaattaag	ccggccagcat	ggattactac	agaaaaatatg	cagctatctt	tctggtcaca	60
ttgtcggtgt	ttctgcgtgt	tctccattcc	gctccgtatg	tgcaggattg	cccagaatgc	120
acgttacagg	aaaaccttatt	cttctccca	ccgggtgccc	caatacttca	gtgcattggc	180
tgcgtttct	ctagagcata	tcccaactcca	ctaagggtcca	agaagacgt	gttggtccaa	240
aagaacgtca	cctcagagt	cacttgcgt	gttagctaat	cataataacag	ggtcacagta	300
atgggggggtt	tcaaagtgg	gaaccacacg	gctgtccact	gcagtacttg	ttattattcac	360
aaatcttaa						369

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 474

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; características distintas

&lt;223&gt; sequência de ácido nucleico do tipo nativo que codifica para a cadeia beta da FSH humana

&lt;400&gt; 4

aggatccccg ggctacacctcc	ccgcggggagg gcgcgccccctt	taattaaagcc gccaccatga	60
agacactccca gtttttttttc	cttttttgtt gctggaaagc	aatctgtgtc aatagctgtg	120
agctgaccas catcaccatt	gcaatagaga aagaagaatg	tgcgtttctgc ataagcatca	180
acaccacttg gtgtgctggc	tactgctaca ccagggatctt	gggtgtataag gacccagcca	240
ggcccaaaat ccagaaaaca	tgtaccttca aggaactggt	atatgaaaca gtgagagtg	300
ccggctgtgc tcaccatgca	gattccctgt atacataccc	agtggccacc cagtgtcact	360
gtggcaagtg tgacagcgac	agcactgatt gtactgtgcg	aggccctgggg cccagctact	420
gtccctttgg tgaatgaaa	gaataaacat gccatggcat	gcgagctcga attc	474

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 471

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sequência de ácido nucleico com codões optimizados que codifica para a cadeia beta da FSH humana

&lt;400&gt; 5

aggatccccg ggtacacctcc	cgcggggagg cgcgccccctt	aattaaagccg ccaccatgas	60
gacccctgcag ttcttttttc	tgttgtgtcg ctggaaaggcc	atctgtgtca acagctgcga	120
gctgaccaac atcaccatcg	ccatcgagaa ggaggagtgc	aggttctgca tcagcatcaa	180
caccacctgg tgcgccggat	actgttacac cagggacctg	gtgtacagg accccgcccag	240
gccccaaatc cagaagacct	gcaccccaa ggagctggtg	tacgagaccg tgagggtgcc	300
cggctgtgcc caccacgcg	acagccctgta cacctacccc	gtggccaccc agtggccactg	360
cggcaagtgc gacagcgaca	gcacccactg caccgtgagg	ggccctggcc ccagctactg	420
caatcttccc	aaatgtgacc atggcatgcg	agctcgaatt c	471

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 372

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sequência de ácido nucleico com codões optimizados que codifica para a cadeia alfa da FSH humana

&lt;400&gt; 6

ttttaatttaag cggccatgtt	ggactactac aggaagtacg	ccggccatctt ccttggtgacc	60
ctgaggcggt	tccgtcacgt gctgcacagc	gccccagacg tgcaggactg	120
accctgcagg	agaacccatt cttcagccag	ccccgagcc ccatccgtca	180
tgttgtttca	ccggggccctt ccccaaaaaa	gtgcacggcc agaagaccat	240
gcaggggctta	ctggggggcc	gctgggtgcag	

**PE2414380**

- 50 -

aagaacgtga	ccagcgagag	cacctgctgc	gtggccaaga	gttacaacag	ggtgaccgtg	300
atggggggct	tcaagggtgga	gaaccacacc	gcctgccact	gcagcacctg	ctactaccac	360
aagagctaat	ga					372

Lisboa, 27 de outubro de 2015

**REIVINDICAÇÕES**

1. Um método de purificação de uma FSH recombinante ou uma variante de FSH recombinante, compreendendo os passos de sujeição de líquido contendo a referida FSH ou variante de FSH a:

- uma cromatografia de permuta aniónica;  
- uma cromatografia de interacção hidrofóbica, e;  
- uma cromatografia de afinidade com corante;  
que são realizadas em qualquer ordem,  
em que o método nem compreende uma cromatografia de permuta aniónica fraca, nem uma cromatografia de fase reversa.

2. O método da reivindicação 1, em que os passos são realizados na seguinte ordem:

a) uma cromatografia de permuta aminoácidos;  
b) uma cromatografia de interacção hidrofóbica, e;  
c) uma cromatografia de afinidade com corante.

3. O método das reivindicações 1 ou 2, em que a cromatografia de permuta aniónica é realizada utilizando uma resina de permuta aniónica forte tendo grupos funcionais  $-N^+(CH_3)_3$ , ou uma resina com características semelhantes.

4. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a cromatografia de interacção hidrofóbica é realizada utilizando uma resina consistindo em

esferas de agarose reticulada derivatizadas com grupos fenilo, ou butilo, ou uma resina com características semelhantes.

5. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a cromatografia de afinidade com corante é realizada com Cibacron Blue 3G como ligando, ligado covalentemente a qualquer matriz.

6. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a cromatografia é realizada utilizando um tampão Tris-HCl/cloreto de sódio como eluente, a um pH na gama entre 7,0 e 9,0.

7. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o método compreende ainda uma cromatografia de permuta catiónica.

8. O método da reivindicação 7, em que a cromatografia de permuta catiónica é realizada com um permutador catiónico acídico de ácido sulfónico forte, fixado numa membrana, ou num permutador com características semelhantes.

9. O método da reivindicação 7 ou 8, em que os passos são realizados na seguinte ordem:

- a) uma cromatografia de permuta aniónica;
- b) uma cromatografia de interacção hidrofóbica;
- c) uma cromatografia de afinidade com corante, e;
- d) uma cromatografia de permuta catiónica.

10. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, compreendendo ainda uma cromatografia de permuta aniónica adicional.

11. O método da reivindicação 10, em que a cromatografia de permuta aniónica é realizada utilizando uma resina de permuta aniónica forte tendo grupos funcionais  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ , ou uma resina com características semelhantes.

12. O método das reivindicações 10 ou 11, em que a cromatografia de permuta aniónica é realizada utilizando um tampão Tris-HCl/cloreto de sódio como eluente, a um pH na gama entre 7,0 e 9,0.

13. O método das reivindicações 10 a 12, em que os passos são realizados na seguinte ordem:

- a) uma primeira cromatografia de permuta aniónica;
- b) uma cromatografia de interacção hidrofóbica;
- c) uma cromatografia de afinidade com corante;
- d) uma cromatografia de permuta catiónica opcional, e;
- e) uma segunda cromatografia de permuta aniónica.

14. O método de qualquer das reivindicações 1 a 6, compreendendo o método ainda uma cromatografia de exclusão molecular.

15. O método da reivindicação 14, em que a

cromatografia de exclusão molecular é realizada utilizando uma matriz de compósito esférico de dextrano e agarose reticulados.

16. O método da reivindicação 14 ou 15, em que os passos são realizados na seguinte ordem:

- a) uma primeira chromatografia de permuta aniónica;
- b) uma chromatografia de interacção hidrofóbica;
- c) uma chromatografia de afinidade com corante;
- d) uma chromatografia de permuta catiónica opcional;
- e) uma segunda chromatografia de permuta aniónica opcional, e;
- f) uma chromatografia de exclusão molecular.

17. O método de qualquer das reivindicações anteriores, em que os passos são realizados na seguinte ordem:

- a) uma primeira chromatografia de permuta aniónica;
- b) uma chromatografia de interacção hidrofóbica;
- c) uma chromatografia de afinidade com corante;
- d) uma segunda chromatografia de permuta aniónica, e;
- e) uma chromatografia de exclusão molecular.

18. O método de qualquer das reivindicações anteriores, compreendendo ainda um ou mais passos de ultrafiltração e/ou nanofiltração.

19. O método de qualquer das reivindicações anteriores, em que não é realizada chromatografia de afinidade com iões metálicos.

20. O método de qualquer das reivindicações anteriores, em que não é realizada cromatografia de imunoafinidade.

21. O método de qualquer das reivindicações anteriores, em que a FSH tem uma subunidade  $\alpha$  de acordo com a SEQ ID No 1 e uma subunidade  $\beta$  de acordo com a SEQ ID No 2.

22. Um método para a produção de uma FSH humana recombinante compreendendo os passos de:

- a) geração de um clone de célula de CHO que produz a FSH humana recombinante a partir de uma ou mais moléculas de ácido nucleico recombinante que codificam para a cadeia  $\alpha$  para a cadeia  $\beta$  da FSH humana,
- b) cultivar as células CHO hospedeiras sob condições adequadas, e
- c) purificar a FSH humana recombinante a partir da cultura de células de acordo com o método de qualquer uma das reivindicações 1 a 21.

Lisboa, 27 de outubro de 2015

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- \* WO 8910270 A
- \* WO 8804589 A
- \* EP 0735139 A
- \* WO 2006051070 A1
- \* WO 2005063811 A1
- \* WO 2007065918 A2
- \* WO 2004087213 A
- \* WO 2008030913 A
- \* WO 0158483 A
- \* WO 9858957 A
- \* WO 8501958 A
- \* EP 0711894 A
- \* EP 0487512 A
- \* EP 2008051451 W

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- \* LAPOLT et al. *Endocrinology*, 1992, vol. 133, 2514-2520
- \* KLEIN et al. *Human Reprod.*, 2003, vol. 18, 50-56
- \* KLEIN et al. *Fertility & Sterility*, 2002, vol. 77, 1248-1255
- \* STEELMAN et al. *Endocrinology*, 1993, vol. 133, 604-616
- \* European Pharmacopoeia
- \* ALBANESE, *Mol Cell Endocrinol*, 1994, vol. 101, 211-218