



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1012647-3 A2



(22) Data do Depósito: 01/04/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020

(54) Título: MÉTODO PARA PURIFICAR UM HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE RECOMBINANTE OU UMA VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE RECOMBINANTE, HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE OU VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DO HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE OU DA VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE, OU DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA.

(51) Int. Cl.: C07K 1/18; C07K 1/20; C07K 14/59.

(30) Prioridade Unionista: 01/04/2009 EP 09157133.1.

(71) Depositante(es): BIOGENERIX AG.

(72) Inventor(es): CHRISTIAN SCHECKERMANN; DIETMAR EICHINGER; STEFAN ARNOLD.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010002111 de 01/04/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/115586 de 14/10/2010

(85) Data da Fase Nacional: 29/09/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA PURIFICAR UM HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE RECOMBINANTE OU UMA VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE RECOMBINANTE, HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE OU VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DO HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE OU DA VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE, OU DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA A presente invenção refere-se a um método para purificar um hormônio folículo-estimulante (FSH) recombinante ou variante de FSH recombinante. O método compreende as etapas de submeter um líquido contendo um FSH recombinante ou variante de FSH recombinante a uma cromatografia por troca aniônica, a uma cromatografia por interação hidrofóbica, e a uma cromatografia por afinidade com corante, em que estas cromatografias podem ser realizadas em qualquer ordem, e em que o método nem compreende uma cromatografia por troca aniônica fraca nem uma cromatografia por fase inversa. O método de purificação resulta em um rendimento alto de FSH recombinante tendo um grau desejado de pureza. O FSH obtido é especialmente útil para a profilaxia e tratamento de distúrbios e indicações médicas onde preparações de FSH são consideradas como medicamentos úteis.

“MÉTODO PARA PURIFICAR UM HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE RECOMBINANTE OU UMA VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE RECOMBINANTE, HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE OU VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DO HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE OU DA VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE, OU DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

A presente invenção refere-se a um método para purificar um hormônio folículo-estimulante (FSH) recombinante ou variante de FSH recombinante. O método compreende as etapas de submeter um líquido contendo um FSH recombinante ou variante de FSH recombinante a uma cromatografia por troca aniônica, a uma cromatografia por interação hidrofóbica, e a uma cromatografia por afinidade com corante, em que estas etapas de cromatografia podem ser realizadas em qualquer ordem, e em que o método nem compreende uma cromatografia por troca aniônica fraca nem uma cromatografia por fase inversa. O método de purificação resulta em um rendimento alto de FSH recombinante tendo um grau desejado de pureza. O FSH obtido é especialmente útil para a profilaxia e tratamento de distúrbios e indicações médicas onde preparações de FSH são consideradas como medicamentos úteis.

Hormônio folículo-estimulante (FSH) é produzido pelas células gonadotrópicas da glândula pituitária anterior e liberado na circulação. FSH age junto com o hormônio luteinizante (LH) no controle de maturação de oócito em fêmeas e de espermatogênese em machos. Tanto FSH quanto LH pertencem a uma família de glicoproteínas heterodiméricas que consistem em duas cadeias α e β não covalentemente ligadas que são codificadas por genes separados. Tanto as cadeias α quanto β são glicosiladas. A subunidade α consiste em 92 resíduos de aminoácido enquanto a subunidade β consiste em

111 resíduos de aminoácido, cada um dos quais tem dois sítios de glicosilação ligados à asparagina potenciais.

FSH humano é usado para tratar mulheres com anovulação, para a estimulação do desenvolvimento multifolicular (superovulação) e na
5 preparação para uma concepção assistida tal como IVF, ICSI, GIFT ou CIFT. Além disso, FSH humano é usado para estimular a maturação de folículos em mulheres com produção de FSH baixa ou ausente e para estimular espermatogênese em homens que sofrem de oligospermia.

Em um regime de tratamento típico para indução da ovulação,
10 um paciente é administrado com injeções diárias de FSH ou uma variante (cerca de 75 a 450 IU FSH/dia) durante um período de cerca de 6 a cerca de 12 dias. Em um regime de tratamento típico para hiperestimulação ovariana controlada, um paciente é administrado com injeções diárias de FSH ou uma variante (cerca de 150 a 600 IU FSH/dia) durante um período de cerca de 6 a
15 cerca de 12 dias.

Para a estimulação da espermatogênese um regime usando 150 IU FSH três vezes por semana em combinação com 2.500 IU hCG duas vezes por semana foi bem sucedido em obter uma melhora na contagem de espermatozoides em homens que sofrem de hipogonadismo hipogonadotrófico.

Até a década de 80, uma fonte primária de FSH humano foi FSH derivado de urina isolado da urina de mulheres em idade reprodutiva. Uma outra forma purificada de FSH derivado de urina, de pureza alta, foi introduzida na década de 90, e finalmente um FSH recombinante foi desenvolvido e foi amplamente usado desde o ano 1998. Com o advento da
20 tecnologia de DNA recombinante, tornou-se possível produzir FSH humano em culturas celulares transfectadas com as sequências de ácido nucléico que codificam as sequências de DNA de cadeia α e β que codificam as cadeias α e β e métodos para produzir FSH recombinante foram divulgados, por exemplo, em WO 88/10270, WO 86/04589 e EP 0 735 139.
25

Correntemente, existem dois produtos de FSH humano recombinante comerciais no mercado na Alemanha, GONAL-f® e Puregon®, ambos os quais são produzidos por expressão das sequências de DNA que codificam as cadeias α e β do tipo selvagem humanas em células do Ovário de Hamster Chinês (CHO).

Por causa da importância de FSH no tratamento de distúrbios de fertilidade, a provisão de FSH recombinante de pureza alta e atividade específica alta é desejável. O tratamento com FSH requer injeções repetidas. Preparações de FSH altamente purificadas podem ser administradas subcutaneamente, permitindo a auto-administração pelo paciente, aumentando assim a conveniência e complacência do paciente.

O pedido de patente internacional WO 2006/051070 A1 de Ares Trading S.A. descreve um método para purificar FSH recombinante compreendendo as etapas seguintes: 1) cromatografia por afinidade com corante, 2) cromatografia por interação hidrofóbica; e 3) cromatografia por fase inversa. Além disso, a WO 2006/051070 A1 divulga um método para purificar FSH compreendendo as etapas de submeter FSH a 1) cromatografia por troca aniônica, 2) cromatografia por afinidade com corante, 3) cromatografia por interação hidrofóbica, 4) cromatografia por fase inversa e 5) cromatografia por troca aniônica.

O pedido de patente internacional WO 2005/063811 A1 de Ares Trading S.A. refere-se a um método para purificar FSH humano recombinante compreendendo as etapas de (1) cromatografia por troca iônica; (2) cromatografia por íon metálico imobilizado; e (3) cromatografia por interação hidrofóbica (HIC).

A WO 2007/065918 A2 de Ares Trading S.A. descreve um método para purificar FSH compreendendo a etapa cromatográfica: cromatografia por afinidade com corante, cromatografia por troca aniônica fraca, cromatografia por interação hidrofóbica, e cromatografia por troca

aniônica forte, que pode ser realizada em qualquer ordem.

Existe uma necessidade contínua para novos métodos de purificar FSH recombinante e variantes de FSH. Em particular, existe uma necessidade para métodos de purificação que evitam o uso de etapas de cromatografia por fase inversa. Além disso, é desejável ter um método de purificação que não conta com cromatografia por imunoafinidade, mas que pode ser realizado sem esta etapa intensiva de custo.

De acordo com a presente invenção, este e outros problemas são revolidos por meio das características da reivindicação principal. Formas de realização vantajosas são definidas nas sub-reivindicações.

É um objetivo da invenção fornecer um método vantajoso, novo para purificar FSH recombinante ou uma variante de FSH recombinante.

Em um primeiro aspecto, a invenção fornece um método para purificar FSH humano recombinante ou uma variante de FSH partindo de um líquido contendo o FSH bruto, compreendendo as etapas seguintes:

- uma cromatografia por troca aniônica,
 - uma cromatografia por interação hidrofóbica, e
 - uma cromatografia por afinidade com corante,
- que podem ser realizadas em qualquer ordem,

em que o método evita qualquer cromatografia por troca aniônica fraca assim como qualquer cromatografia por fase inversa.

Em uma outra forma de realização, as diferentes etapas cromatográficas são realizadas na ordem seguinte: (1) cromatografia por troca aniônica, (2) cromatografia por interação hidrofóbica, e (3) cromatografia por afinidade com corante. Cromatografia por troca aniônica (AEC) conta com interações de carga-carga entre as proteínas na amostra e as cargas imobilizadas na resina. Na cromatografia por troca aniônica, os íons de ligação das proteínas são negativos, e o grupo funcional imobilizado é positivo. Resinas de troca aniônica comumente usadas são Q-resina, uma

amina quaternária, e resina de DEAE (DiEtilAminoEtano). Entretanto, em geral a etapa de cromatografia por troca aniônica pode ser realizada com todas as resinas de troca aniônica ou membranas comercialmente disponíveis comuns. Resinas de troca aniônica podem ser usadas na forma de colunas pré-
 5 vertidas. Alternativamente, colunas podem ser auto-preparadas. Não existe nenhuma limitação específica como para a capacidade e a geometria das colunas exceto as usuais. A pessoa habilitada na técnica conhece que a quantidade de resina de troca aniônica a ser usada depende do teor de proteína global do fluido de cultura celular ou qualquer outro fluido, por exemplo, o
 10 eluado de uma etapa cromatográfica precedente, aplicado à coluna na etapa de captura.

Resinas de troca aniônica forte típicas que podem ser usadas para o propósito da invenção compreendem grupos funcionais tais como: porções aminoetila quaternário (QAE), resinas incluem por exemplo,
 15 Toyopearl QAE (disponível da Tosoh Bioscience, Alemanha), Selectacel QAE (um derivado de aminoetila quaternário de celulose, disponível da Polysciences Inc., Pennsylvania USA) e outros; porções amônio quaternário (Q), resinas incluem por exemplo, Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, Q Sepharose HP (disponível da GE Healthcare, Alemanha), Resource Q
 20 (disponível da GE Healthcare, Alemanha), Macro Prep High Q (Bio-Rad, California, USA), Toyopearl Super Q (disponível da Tosoh Bioscience, Alemanha), UNOsphere Q (disponível da Bio-Rad, California, USA), e grupos trimetilamônioetila (TMAE), resinas incluem por exemplo, Fractogel EMD TMAE (disponível da Merck, Alemanha).

25 A cromatografia por troca aniônica é preferivelmente uma cromatografia por troca aniônica forte que é realizada usando uma resina de troca aniônica forte tendo grupos funcionais $-N^+(CH_3)_3$, ou uma resina tendo características similares.

Exemplos preferidos de resinas de troca aniônica forte que

podem ser usadas para o propósito da invenção são resinas de troca aniônica forte de amônio quaternário conhecidas na técnica como UNOsphere Q, Q Sepharose HP e outras resinas tendo porções amônio quaternário (Q).

As características do trocador aniônico forte UNOsphere Q são

5 como segue:

	Grupo funcional	$-N^+(CH_3)_3$
	Capacidade iônica total	120 μ eq/ml
	Capacidade de ligação dinâmica	
	150 cm/h	180 mg/ml
10	600 cm/h	125 mg/ml
	Contra-íon de remessa	Cl^-
	Tamanho de partícula médio	120 μ m
	Faixa de taxa de fluxo linear recomendada	
		50 a 1200 cm/h
15	Estabilidade química	
	NaOH 1,0 M (20°C)	até 2.000 h
	HCl 1,0 M (20°C)	até 200 h
	Mudanças de volume	
	pH 4 a 10	< 5 %
20	NaCl 0,01 a 1,0 M	< 5 %
	estabilidade do pH	1 a 14

As características do trocador aniônico forte Q Sepharose HP

são como segue:

	Capacidade iônica	0,14 a 0,20 mmol Cl^- /ml
25	Capacidade dinâmica	70 mg BSA/ml de meio
	Velocidade de fluxo de rec.	30 a 150 cm/h
	Pressão max. sobre o leito empacotado	
	durante a operação	3 bar (42 psi, 0,3 MPa)
	Limite de pressão de hardware	

	em coluna HiLoad	5 bar (73 psi, 0,5 MPa)
	Tamanho de partícula médio	34 μm
	Limite de exclusão (M_r)	aprox. 4×10^6 proteínas globulares
	Matriz	agarose reticulada, 6 %
5	Estabilidade do pH	2 a 12 (funcional e de longo prazo), 1 a 14 (de curto prazo)
	Estabilidade química	estável em todos os tampões comumente usados

10 É preferível evitar o uso de resinas de troca aniônica fraca, tais como aquelas com base em dietilaminoetila (DEAE) ou dimetilaminoetila (DMAE) como os grupos funcionais.

15 A etapa de cromatografia por troca aniônica é preferivelmente realizada usando um tampão tendo um pH suavemente alcalino, por exemplo, em ou cerca de 7,0 a em ou cerca de 9,0, ou em ou cerca de 7,5 a em ou cerca de 8,5. Tampões adequados incluem, por exemplo, tampão de borato, trietanolamina/ácido iminodiacético Tris, acetato de amônio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. O uso de um tampão Tris é preferido. A eluição da resina de troca aniônica é usualmente obtida aumentando-se a condutividade da fase móvel através da adição de sal, preferivelmente cloreto de sódio.

20 A cromatografia por interação hidrofóbica (HIC) do método da invenção pode ser realizada usando uma resina de HIC tendo uma superfície relativamente suavemente hidrofóbica (comparada à superfície hidrofóbica muito mais forte de uma resina de fase inversa). Proteínas com propriedades de superfície hidrofóbica são atraídas a tais resinas que comumente têm
25 grupos éter, fenila, butila ou hexila.

A HIC pode ser realizada com todas as resinas de HIC comercialmente disponíveis comuns. Resinas de HIC que podem ser usadas para o propósito da invenção compreendem matrizes tais como Butil, Fenil, Propil ou Octil Sefarose, SOURCE 15 (todas disponíveis da GE Healthcare,

Alemanha), suporte de HIC de metila ou t-butila Macro-Prep (Bio-Rad, Alemanha) ou Fractogel EMD com ligandos de propila ou fenila (Merck AG, Alemanha),

- 5 Resinas de HIC Toyopearl, tais como Toyopearl Butil 650 M e resinas de HIC similares (Tosoh Bioscience).

Em uma forma de realização preferida, a cromatografia por interação hidrofóbica é realizada usando uma resina consistindo em pérolas de agarose reticuladas derivadas com grupos fenila, butila ou octila, ou uma resina tendo características similares. As características de Phenyl Sepharose 10 6 FF (disponível da GE Healthcare) são dadas abaixo.

Densidade do ligando

Phenyl Sepharose® 6 Fast 25 µmol/ml de meio

Fluxo (sub baixo)

Phenyl Sepharose® 6 Fast 40 µmol/ml de meio

- 15 Fluxo (sub alto)

Capacidade de ligação

Phenyl Sepharose® 6 Fast 10 mg de IgG/ml de meio

Fluxo (sub baixo) 24 mg de HSA/ml de meio

Phenyl Sepharose® 6 Fast 30 mg de IgG/ml de meio

- 20 Fluxo (sub alto) 36 mg de HSA/ml de meio

Espec. de pressão/fluxo 200 a 400 cm/h, 1 bar XK coluna

50/60, altura do leito 25 cm

Estabilidade do pH 2 a 14 (curto prazo),

3 a 13 (longo prazo)

- 25 Estabilidade química Estável em tampões comuns, agentes caotrópicos, detergentes, e solventes orgânicos polares.

Tamanho de partícula médio 90 µm

Armazenamento 20 % de etanol

Temperatura de armazenamento 4°C a 30°C

A ligação na resina de HIC é obtida em um tampão com uma condutividade alta, obtida através da adição do sal (NaCl, (NH₄)₂SO₄ ou Na₂SO₄ por exemplo). A eluição na etapa de HIC é usualmente realizada
5 reduzindo-se a condutividade da fase móvel (isto é, reduzindo a concentração de sal), usando um tampão tendo um pH em ou cerca de 5 a em ou cerca de 9, mais preferivelmente em ou cerca de 6 a em ou cerca de 8, o mais preferivelmente em ou cerca de 7 a em ou cerca de 8.

Tampões de equilíbrio, lavagem e eluição podem compreender
10 todos os tipos de tampão usualmente usados para HIC. Assim, agentes de tamponamento compreendem fosfato de sódio, acetato de sódio, Tris/HCl, HEPES, ou outros agentes de tamponamento. Além disso, tampões podem conter entre 0,5 mM e 3 M de NaCl, KCl ou outros sais adequados dependendo se o tampão é usado para equilíbrio, lavagem ou eluição.
15 Tampões de equilíbrio e lavagem contêm concentrações mais altas dos sais anteriormente mencionados do que tampões de eluição.

Um tampão particularmente preferido na etapa de HIC é um tampão de Tris/HCl contendo cloreto de sódio.

A cromatografia por afinidade com corante do método da
20 invenção pode ser realizada usando uma resina tendo como um ligando imobilizado um composto corante que é bem conhecido a uma pessoa habilitada na técnica, isto é, Cibacron Blue F3G-A. O termo “imobilizado” é bem entendido por uma pessoa habilitada na técnica e significa que o ligando é derivado no sentido de que ele é quimicamente ligado à resina.

25 Em uma forma de realização preferida, a cromatografia por afinidade com corante é realizada com Cibacron Blue F3G-A como o ligando, covalentemente ligado a qualquer matriz, por exemplo, uma matriz de agarose. Preferivelmente, a cromatografia por afinidade com corante é realizada usando a resina conhecida como Blue Sepharose FF (disponível da

GE Healthcare, Alemanha). As características técnicas da Blue Sepharose FF são dadas abaixo:

	Ligando	Cibacron Blue F3G-A
	Método de ligação de ligando	Ligação de triazina
5	Capacidade de ligação	> 18 mg de albumina sérica humana/ml de meio
	Densidade do ligando	≈ 7 μmol de Cibacron Blue/ml de meio
	Matriz	Agarose altamente reticulada, 6 %
10	Tamanho de partícula médio	90 μm
	Estabilidade do pH	4 a 12 (longo prazo), 3 a 13 (curto prazo)
	Armazenamento	20 % de etanol, 0,1 M de tampão de fosfato de potássio, pH 8,0
15	Temperatura de armazenamento	4°C a 30°C
	Estabilidade química	40°C durante 7 dias em: 70 % de etanol, 6 M de cloridreto de guanidina, 8 M de uréia

É entendido que a cromatografia por afinidade com corante do método da invenção pode ser realizada com resinas alternativas, tendo características similares. 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), Econo-Pac blue cartridges (Bio-Rad), Cibacron Blue 3GA (Sigma).

A eluição na etapa de cromatografia por afinidade com corante imobilizado é preferivelmente realizada usando um tampão de Tris/HCl ou um tampão de fosfato. O mais preferido é um tampão de Tris/HCl contendo cloreto de sódio. O pH do eluente é preferivelmente em ou cerca de 7 a em ou

cerca de 9, o mais preferivelmente o pH está na faixa entre 7 e 8.

Em um outro aspecto, o método para purificar um FSH recombinante ou variante de FSH de acordo com a invenção compreende as etapas de submeter um líquido contendo o dito FSH ou variante de FSH a

- 5 - uma cromatografia por troca aniônica,
- uma cromatografia por interação hidrofóbica,
- uma cromatografia por afinidade com corante, e
- além disso a uma cromatografia por troca catiônica
- que podem ser realizadas em qualquer ordem,
- 10 em que o método evita qualquer cromatografia por troca
- aniônica fraca assim como qualquer cromatografia por fase inversa.

Em uma forma de realização as etapas são realizadas na ordem seguinte: (1) cromatografia por troca aniônica, (2) cromatografia por interação hidrofóbica, (3) cromatografia por afinidade com corante, e (4) cromatografia

15 por troca catiônica.

A cromatografia por troca catiônica (CEC) conta com interações de carga-carga entre as proteínas na amostra e as cargas imobilizadas na resina. Na cromatografia por troca catiônica, os íons de ligação das proteínas são positivos e o grupo funcional imobilizado é

20 negativo. Resinas de troca catiônica comumente usadas são S-resina, derivados de sulfato, e resinas de CM (carboximetila), íons derivados carboxilados.

Entretanto, em geral a etapa de cromatografia por troca catiônica pode ser realizada com todas as resinas de troca catiônica ou

25 membranas comercialmente disponíveis comuns. Resinas de troca catiônica podem ser usadas na forma de colunas pré-vertidas ou membranas nas quais o grupo funcional, por exemplo, ácido sulfônico, é fixado. Alternativamente colunas podem ser auto-preparadas. Não existe nenhuma limitação específica como à capacidade e à geometria das colunas exceto as usuais. A pessoa

habilitada na técnica conhece que a quantidade de resina de troca catiônica a ser usada depende do teor de proteína global do fluido de cultura celular ou qualquer outro fluido, por exemplo, o eluado de uma etapa cromatográfica precedente.

5 Resinas de troca catiônica típicas que podem ser usadas para o propósito da invenção estão disponíveis da GE Healthcare e outros fabricantes de acessórios e colunas de cromatografia iônica. Comumente, CEC é realizada usando tampões em valores de pH entre 4 e 7.

10 Em uma forma de realização preferida, a etapa de troca catiônica do método da invenção é realizada como uma troca catiônica de membrana. Preferivelmente, a etapa de troca catiônica é realizada com um trocador catiônico ácido forte ácido sulfônico fixado em uma membrana ou um trocador tendo características similares.

15 Adsorvedores de membrana adequados para uso na etapa de troca catiônica da invenção são conhecidos na técnica e estão disponíveis de vários fornecedores. Por exemplo, a cromatografia por troca catiônica do método da invenção pode ser realizada usando uma membrana fabricada de celulose regenerada e tendo uma matriz cromatográfica de ácido sulfônico formado na cadeia principal de celulose. Um exemplo de um adsorvedor de
20 membrana útil são os Adsorvedores de membrana Sartobind S vendidos por Sartorius. Os dados técnicos dos Adsorvedores de membrana Sartobind S são dados abaixo.

Designação	Sartobind SingleSep [®] (trocador catiônico ácido forte S)
25 Ligando	ácido sulfônico (R-CH ₂ -SO ₃ ⁻)
Capacidade de ligação estática	> 0,8 mg/cm ² (29 mg/ml) medido com albumina sérica bovina e lisozima de ovo de galinha
Capacidade iônica	4 a 6 µeq/cm ²

Membrana

Material de base celulose reforçada estabilizada

Espessura da membrana 275 μm

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

5 Cápsula

Modelo Cilíndrico, número nominal de camadas: 15

Altura do leito: 4 mm

Material da Cápsula Polipropileno (FDA)

10 Pressão max. 0,4 MPa (4 bar, 58 psi)

Estabilidade do pH 3 a 14 (curto prazo)

Armazenamento descartar após um uso

Estabilidade química Estável contra todos os tampões comumente usados em cromatografia, 1 M de NaOH (30 a 60 min a 20°C), 8 M de uréia, 8 M de cloridreto de guanidina, etanol, acetona, e 100 % de acetonitrila. Evitar agentes oxidantes.

15

20 A etapa de CEC pode ser realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Por exemplo, um tampão de Tris-HCl pode ser usado no pH 7,0.

Foi descoberto que a etapa de CEC, preferivelmente a etapa de adsorvedor de membrana catiônico, purifica proteínas da célula hospedeira de todos os tamanhos moleculares embora mantendo os tempos do processo curtos. O rendimento, em torno de 95 %, é muito favorável porque FSH não liga-se ao adsorvedor no pH 7,0.

25

Em geral, foi descoberto que a cromatografia por troca catiônica na forma de uma membrana cromatográfica é muito útil para a

purificação de FSH recombinante ou variante de FSH. Assim, em um outro aspecto, a invenção refere-se ao uso de um adsorvedor de membrana catiônico em um método para purificar FSH ou variante de FSH. Em uma forma de realização preferida, o adsorvedor de membrana catiônico é um adsorvedor de troca catiônica, preferivelmente um adsorvedor de troca catiônica forte, fabricado a partir da celulose regenerada e tendo uma matriz cromatográfica de ácido sulfônico formada na cadeia principal de celulose.

Em um outro aspecto, o método para purificar um FSH recombinante ou variante de FSH de acordo com a invenção compreende as etapas de submeter um líquido contendo o dito FSH ou variante de FSH a

- uma cromatografia por troca aniônica,
- uma cromatografia por interação hidrofóbica,
- uma cromatografia por afinidade com corante,
- uma cromatografia por troca catiônica opcional, e

além disso a uma cromatografia por troca aniônica adicional, que podem ser realizadas em qualquer ordem, em que o método evita qualquer cromatografia por troca aniônica fraca assim como qualquer cromatografia por fase inversa.

Em uma forma de realização as etapas são realizadas na ordem seguinte: uma cromatografia por troca aniônica primária, uma cromatografia por interação hidrofóbica, uma cromatografia por afinidade com corante, uma cromatografia por troca catiônica opcional, e uma cromatografia por troca aniônica secundária.

A cromatografia por troca aniônica secundária pode ser realizada usando resinas de troca aniônica típicas como mencionado acima em combinação com a cromatografia por troca aniônica primária. Também a cromatografia por troca aniônica secundária é preferivelmente uma cromatografia por troca aniônica forte que é realizada usando uma resina de troca aniônica forte tendo grupos funcionais $-N^+(CH_3)_3$, ou uma resina tendo

características similares. Exemplos preferidos de resinas de troca aniônica forte que podem ser usadas para o propósito da invenção são resinas de troca aniônica forte de amônio quaternário conhecidas na técnica como UNOsphere Q, Q Sepharose HP e outras resinas tendo porções amônio quaternário (Q). As

5 características do trocador aniônico forte UNOsphereQ e Q Sepharose HP são dadas acima em combinação com a cromatografia por troca aniônica primária. Também na etapa de cromatografia por troca aniônica secundária é preferível evitar o uso de resinas de troca aniônica fraca, tais como aquelas com base em dietilaminoetila (DEAE) ou dimetilaminoetila (DMAE) como os grupos

10 funcionais.

A etapa de cromatografia por troca aniônica é preferivelmente realizada usando um tampão tendo um pH suavemente alcalino, por exemplo, em ou cerca de 7,0 a em ou cerca de 9,0, ou em ou cerca de 7,5 a em ou cerca de 8,5. Tampões adequados incluem, por exemplo, tampão de borato,

15 trietanolamina/ácido iminodiacético Tris, acetato de amônio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. O uso de um tampão de Tris é preferido. A eluição da resina de troca aniônica é usualmente obtida aumentando-se a condutividade da fase móvel através da adição de sal, preferivelmente cloreto de sódio.

Em uma forma de realização, a cromatografia por troca

20 aniônica secundária é realizada usando um tampão de Tris-HCl/cloreto de sódio como eluente em um pH na faixa entre 7,0 e 9,0.

Em um outro aspecto, o método para purificar um FSH recombinante ou variante de FSH de acordo com a invenção compreende as etapas de submeter um líquido contendo o dito FSH ou variante de FSH a

- 25
- uma cromatografia por troca aniônica,
 - uma cromatografia por interação hidrofóbica, e
 - uma cromatografia por afinidade com corante,
- que podem ser realizadas em qualquer ordem,
- em que o método evita qualquer cromatografia por troca

aniônica fraca assim como qualquer cromatografia por fase inversa, e em que o método compreende adicionalmente uma cromatografia por exclusão de tamanho.

Em um outro aspecto, o método para purificar um FSH recombinante ou variante de FSH de acordo com a invenção compreende as etapas de submeter um líquido contendo o dito FSH ou variante de FSH a

- uma cromatografia por troca aniônica,
- uma cromatografia por interação hidrofóbica,
- uma cromatografia por afinidade com corante,
- uma cromatografia por troca catiônica opcional,
- uma cromatografia por troca aniônica adicional opcional, e
- uma cromatografia por exclusão de tamanho,

que podem ser realizadas em qualquer ordem,

em que o método evita qualquer cromatografia por troca aniônica fraca assim como qualquer cromatografia por fase inversa.

Em uma forma de realização as etapas são realizadas na ordem seguinte: uma cromatografia por troca aniônica, uma cromatografia por interação hidrofóbica, uma cromatografia por afinidade com corante, uma cromatografia por troca catiônica opcional, uma cromatografia por troca aniônica adicional opcional, e uma cromatografia por exclusão de tamanho.

Em uma forma de realização preferida, o método da invenção compreende as etapas seguintes na ordem seguinte: uma cromatografia por troca aniônica primária, uma cromatografia por interação hidrofóbica, uma cromatografia por afinidade com corante, uma cromatografia por troca catiônica opcional, uma cromatografia por troca aniônica secundária opcional, e uma cromatografia por exclusão de tamanho.

A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), também conhecida como cromatografia por filtração em gel, é um método cromatográfico em que partículas, por exemplo, proteínas e outras

biomoléculas, são separadas com base em seu tamanho. Um meio de gel típico para SEC é poliacrilamida, dextrano, agarose ou uma mistura destes. Matrizes de SEC estão disponíveis de vários fabricantes de acessórios e coluna cromatográficos, por exemplo, da Tosoh Bioscience LLC ou GE Healthcare.

A cromatografia por exclusão de tamanho é preferivelmente realizada usando uma matriz de compósito esférico de agarose reticulada e dextrano.

Exemplos de matrizes de cromatografia por exclusão de tamanho úteis são matrizes conhecidas na técnica como Superdex 75 pg, disponível por exemplo da GE Healthcare. Colunas Superdex 75 pg levam em consideração separação de alta resolução de proteínas, peptídeos, e outras biomoléculas de acordo com o tamanho. Geralmente, colunas de exclusão de tamanho são ideais para a etapa de polimento em um procedimento de purificação.

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

Limite de exclusão (M_r)	1 x 10 ⁵ proteínas globulares
Faixa de separação (M_r)	3000 a 70 000 proteínas globulares
Matriz	Compósito esférico de agarose reticulada e dextrano
Tamanho de partícula médio	34 μ m
Estabilidade química	Estável em todos os tampões comuns:
	1 M de acético ácido,
	8 M de uréia,
	6 M de cloridreto de guanidina,
	30 % de álcool isopropílico,
	70 % de etanol, 1 M de NaOH (para

		limpeza adequada)
	Estabilidade do pH	3 a 12 (funcional e de longo prazo), 1 a 14 (curto prazo)
	Colunas Superdex® 10/300 GL (Tricorn)*	
5	Dimensões do leito	10 x 300 mm
	Volume recomendado da amostra	25 a 250 µl
	Volume do leito	24 ml
	Pressão max.	18 bar (261 psi, 1,8 MPa)
	Taxa de fluxo max. (H ₂ O a 25°C)	1,5 ml/min
10	Placas teóricas	> 30 000 m ⁻¹
	Colunas Superdex® PC 3,2/30	
	Dimensões do leito	3,2 x 300 mm
	Volume do leito	2,4 ml
	Volume recomendado da amostra	2 a 25 µl
15	Pressão max.	24 bar (348 psi, 2,4 MPa)
	Taxa de fluxo max. (H ₂ O a 25°C)	0,100 ml/min
	Placas teóricas	> 30 000 m ⁻¹
	Armazenamento	20 % de etanol
	Temperatura de armazenamento	4°C a 30°C

20 A etapa de SEC pode ser realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Por exemplo, um tampão de fosfato de sódio pode ser usado no pH 6 a 8, preferivelmente em torno do pH 7,0.

25 Em uma forma de realização preferida da invenção, o método da invenção compreende as etapas seguintes na ordem seguinte: uma cromatografia por troca aniônica primária, uma cromatografia por interação hidrofóbica, uma cromatografia por afinidade com corante, uma cromatografia por troca catiônica, uma cromatografia por troca aniônica secundária, e uma cromatografia por exclusão de tamanho.

Em uma forma de realização preferida, a etapa de

cromatografia por troca catiônica do método da invenção é realizada como uma troca catiônica de membrana. Preferivelmente, a etapa de troca catiônica é realizada com um trocador catiônico ácido forte ácido sulfônico, fixado em uma membrana ou um trocador tendo características similares.

5 Além disso, o método da invenção compreende uma ou mais etapas de ultrafiltração e/ou nanofiltração. Ultrafiltração é uma forma de filtração de membrana em que a pressão hidrostática força um líquido contra uma membrana semipermeável. Sólidos e solutos colocados em suspensão de peso molecular alto são retidos, enquanto água e solutos de peso molecular
10 baixo passam através da membrana. Ultrafiltração é um método comumente usado de separação para purificar e concentrar soluções macromoleculares, especialmente soluções de proteína. Ultrafiltração é similar à nanofiltração, entretanto diferindo em termos do tamanho das moléculas que ela retém. Na estrutura da presente invenção, um corte de peso molecular de 10 kDa é
15 preferido (10 kDa UF). Membranas UF também podem ser usadas para diafiltração para remover sais e outras microespécies da solução por intermédio de diluição repetida ou contínua e reconcentração.

Em uma forma de realização preferida da invenção, o processo de purificação compreende uma ou mais etapas de ultrafiltração/diafiltração
20 e/ou nanofiltração. Estas etapas de filtração podem ser realizadas usando dispositivos de filtração comercialmente disponíveis, por exemplo, disponíveis da GE Healthcare ou Sartorius.

A ultrafiltração é preferivelmente realizada usando os cassetes Sartocon e cassetes Sartocon Slice vendidos pela Sartorius.

25	Membrana	Polietersulfona (PESU) ou Hidrosart®
	Corte de peso molecular	10 kD
	Área de filtro	0,02 a 0,7 m ²
	Pressão de alimentação	máximo de 4 bar (58 psi)
	Estabilidade do pH	1 a 14

Temperatura de operação	máximo de 50°C, a 20°C
Limpeza	1 M de NaOH, 40°C
Desinfecção	1 M de NaOH, 40 a 50°C, 30 min
Armazenamento	0,1 M de NaOH

5 A membrana de polietersulfona (PESU) usada nos cassetes de fluxo cruzado vendidos pela Sartorius é um polímero de membrana estável que caracteriza uma ampla faixa de pH e temperatura.

Os cassetes de ultrafiltração Hidrosart® vendidos pela Sartorius também podem ser usados. Hidrosart é uma membrana com base em
10 celulose estabilizada que foi otimizada para aplicações biotecnológicas. As membranas e cassetes de ultrafiltração Hidrosart estão disponíveis nos seguintes cortes de peso molecular nominais: 2 kD, 5 kD, 10 kD e 30 kD.

Em uma forma de realização preferida, o método de purificação inclui uma etapa de nanofiltração. A nanofiltração pode ser
15 realizada usando qualquer dispositivo de nanofiltração útil. A nanofiltração é preferivelmente realizada usando filtros Planova, disponíveis da Asahi Kasei Medical Co., Ltd.

Filtros Planova são designados para remover vírus durante a fabricação de produtos medicamentosos bioterapêuticos tais como produtos
20 biofarmacêuticos. Eles são fundamentados em uma membrana microporosa de fibra oca construída de celulose regenerada de cupramônio naturalmente hidrofílica com uma distribuição de poro estreita, filtros Planova estão disponíveis como módulos independentes, de uso único em quatro tamanhos de poro médios de 15 nm, 19 nm, 35 nm, e 72 nm (Planova 15N, 20N, 35N , e
25 75N, respectivamente). No processo da invenção é preferido usar um filtro Planova 15N, isto é, um filtro tendo um tamanho de poro médio de 15 nm. O filtro é usado de acordo com o protocolo do fornecedor.

É preferido que o método para purificar FSH de acordo com a invenção não compreenda uma cromatografia por afinidade com íon de metal.

Além disso, também é preferido que o método da invenção evite uma cromatografia por imunoafinidade. A purificação de FSH sem etapas de cromatografia por imunoafinidade elimina a interferência resultante possível de impurezas ou agentes infecciosos, derivados da preparação do anticorpo, com o composto de FSH.

Em uma outra forma de realização, a invenção refere-se a um método para purificar um FSH recombinante ou variante de FSH recombinante, compreendendo a etapa de submeter um líquido contendo o dito FSH ou variante de FSH a um trocador de membrana catiônico.

Em uma forma de realização preferida, o trocador de membrana catiônico é um trocador catiônico ácido forte ácido sulfônico, fixado em uma membrana, ou um trocador tendo características similares.

Adsorvedores de membrana adequados para uso no método da invenção são conhecidos na técnica e disponíveis de vários fornecedores. Por exemplo, a cromatografia por troca catiônica do método da invenção pode ser realizada usando uma membrana fabricada de celulose regenerada e tendo uma matriz cromatográfica de ácido sulfônico formado na cadeia principal de celulose. Um exemplo de um adsorvedor de membrana útil são os Adsorvedores de membrana Sartobind S vendidos por Sartorius. Os detalhes técnicos deste são dados acima.

Em uma outra forma de realização, o método para purificar um FSH recombinante ou variante de FSH recombinante compreendendo a etapa de submeter um líquido contendo FSH a um trocador de membrana catiônico compreende adicionalmente uma cromatografia por interação hidrofóbica.

A cromatografia por interação hidrofóbica do método da invenção pode ser realizada como descrito acima em combinação com o método para purificar um FSH recombinante ou variante de FSH recombinante, compreendendo as etapas de submeter um líquido contendo o dito FSH ou variante de FSH a uma cromatografia por troca aniônica, uma

cromatografia por interação hidrofóbica, e uma cromatografia por afinidade com corante, que são realizadas em qualquer ordem,

em que o método nem compreende uma cromatografia por troca aniônica fraca nem uma cromatografia por fase inversa, e formas de
5 realização preferidas deste.

Em uma forma de realização preferida, a cromatografia por interação hidrofóbica é realizada usando uma resina consistindo em pérolas de agarose reticuladas derivadas com grupos fenila ou butila, ou uma resina tendo características similares.

10 A menos que de outro modo indicado, as definições seguintes são intencionadas a ilustrar e definir o significado e escopo dos vários termos usado para descrever a presente invenção.

O termo “FSH” refere-se a um polipeptídeo de hormônio folículo-estimulante como uma proteína madura de tamanho natural que
15 inclui, mas não é limitado a, FSH humano ou “hFSH”, se produzido recombinantemente ou isolado de fontes humanas, tais como a urina de mulheres pós-menopáusicas. A sequência de proteína da glicoproteína humana e a sequência de proteína da subunidade β de FSH humano são conhecidas à pessoa habilitada da literatura científica e de patente (ver por
20 exemplo, WO 2004/087213).

A sequência de aminoácido da cadeia α de FSH humano é representada na SEQ ID No. 1, e a sequência de aminoácido da cadeia β de FSH humano é representada na SEQ ID No. 2 como anexado a este relatório descritivo. Estas sequências de aminoácido correspondem às sequências de
25 aminoácido do tipo selvagem da cadeia α e β de FSH humano como depositado sob o número de acesso J 00152 na base de dados de EMBL e sob o número de acesso NM_000510 na base de dados de NCBI, respectivamente.

As sequências de ácido nucléico do tipo selvagem que codificam FSH humano são mostradas na SEQ ID No. 3 (= cadeia α) e No. 4

(= cadeia β).

O FSH recombinante pode ser codificado pela sequência de ácido nucléico do tipo selvagem como naturalmente encontrado em seres humanos, ou ele pode ser codificado por uma sequência de ácido nucléico alterada cuja expressão resulta em um FSH tendo a sequência de aminoácido do tipo selvagem, isto é, a sequência de proteína do tipo selvagem como naturalmente encontrado em seres humanos.

A sequência de ácido nucléico que codifica FSH humano pode, por exemplo, ser alterada em um tal modo que uma ou ambas as sequências de ácido nucléico que codificam a cadeia α e β de FSH humano foram adaptadas ao uso de códon 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 ácido nucléico que codificam FSH humano e que foram modificadas com respeito ao uso de códon em células CHO é descrito no pedido de patente internacional WO 2009/000913. A sequência de ácido nucléico modificada que codifica a cadeia β de FSH humano é a região de codificação da sequência de ácido nucléico representada na SEQ ID No. 5 (na SEQ ID No. 5 a região de codificação começa no nucleotídeo 56 e estende-se até o nucleotídeo 442), e a sequência de ácido nucléico modificada que codifica a cadeia α de FSH humano é a região de codificação da sequência de ácido nucléico dada na SEQ ID No. 6 (na SEQ ID No. 6 a região de codificação começa no nucleotídeo 19 e estende-se até o nucleotídeo 366). Uma linhagem de célula CHO contendo uma molécula de ácido nucléico recombinante compreendendo uma primeira sequência de ácido nucléico modificada que codifica a cadeia β de FSH humano e uma segunda sequência de ácido nucléico modificada que codifica a cadeia α de FSH humano foi depositada em 28 de março de 2007 na DSMZ em Braunschweig sob o número de depósito DSM ACC2833.

Em uma forma de realização preferida, a formulação líquida de FSH de acordo com a presente invenção contém um FSH do tipo selvagem humano recombinante que é obtido por expressão de gene recombinante das sequências de ácido nucléico de FSH que são modificadas com respeito ao uso de códon em células CHO com respeito tanto à cadeia β de FSH humano quanto à cadeia α de FSH. Em uma outra forma de realização preferida, o FSH recombinante é obtido por expressão das sequências de ácido nucléico de FSH divulgadas na WO 2009/000913.

A expressão “variante de FSH” é significada a abranger aquelas moléculas que diferem em sequência de aminoácido, padrão de glicosilação ou em ligação inter-subunidade de FSH humano mas exibindo atividade de FSH. Exemplos incluem CTP-FSH, um FSH recombinante modificado de ação longa, consistindo na subunidade α do tipo selvagem e uma subunidade β híbrida em que o peptídeo de terminal carboxi de hCG foi fundido ao terminal C da subunidade β de FSH, como descrito em LaPolt *et al.* (1992) *Endocrinology*, 131, 2514-2520; ou Klein *et al.* (2003) *Human Reprod.*, 18, 50-56. Também incluído é um CTP-FSH de cadeia única, uma molécula de cadeia única descrita por Klein *et al.* (2002) *Fertility & Sterility*, 77, 1248-1255. Outros exemplos de variantes de FSH incluem moléculas de FSH tendo sítios de glicosilação adicionais incorporados na subunidade α e/ou β , como divulgado em WO 01/58493, e moléculas de FSH com ligações S-S inter-subunidade, como divulgado na WO 98/58957. Outros exemplos de variantes de FSH são divulgados na WO 2004/087213, que são caracterizadas por supressões de terminal carboxi da subunidade β . Outros exemplos de variantes de FSH incluem moléculas de FSH tendo um grau alterado de glicosilação comparado ao FSH do tipo selvagem devido a mudanças na sequência de aminoácido da proteína pela qual sítio(s) de glicosilação adicional(is) são introduzidos ou sítio(s) de glicosilação de ocorrência natural são suprimidos.

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

Heterodímeros de FSH ou heterodímeros de variante de FSH podem ser produzidos por qualquer método adequado, tal como recombinantemente, por isolamento ou purificação de fontes naturais ou por síntese química, ou qualquer combinação destes.

O uso do termo “recombinante” refere-se a preparações de FSH ou variantes de FSH que são produzidas através do uso de tecnologia de DNA recombinante (ver por exemplo WO 85/01958). As sequências para clones genômicos e de cDNA de FSH são conhecidas para as subunidades α e β de várias espécies. Vários métodos de produzir FSH recombinante ou variantes de FSH usando tecnologia recombinante são descritos na técnica anterior, ver por exemplo pedido de patente europeu EP 0 711 894 e pedido de patente europeu EP 0 487 512.

Preferivelmente, o FSH purificado 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.

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

A invenção refere-se ainda a uma composição farmacêutica compreendendo o FSH ou variante de FSH purificada usando o método da invenção assim como um excipiente farmacêuticamente aceitável. Em uma forma de realização preferida, a composição farmacêutica contém um conservante e pode ser usada para administração de dose múltipla. Composições farmacêuticas preferidas são descritas em PCT/EP2009/051451.

Além disso, a invenção também refere-se ao uso do FSH ou variante de FSH purificada usando o método da invenção, ou ao uso de uma composição farmacêutica compreendendo o dito FSH ou variante de FSH em combinação com excipientes farmacêuticamente aceitáveis para o tratamento de distúrbios de fertilidade.

O FSH humano recombinante é purificado a partir do sobrenadante de cultura de célula hospedeira pelo método da invenção. O FSH humano recombinante ou variante de FSH são preferivelmente produzidos como descrito no pedido de patente internacional WO 2009/000913.

O mais preferivelmente, o FSH é FSH humano que foi produzido recombinantemente, particularmente preferivelmente produzido em células de Ovário de Hamster Chinês transfectadas com um vetor ou vetores compreendendo DNA que codifica a subunidade α de glicoproteína humana e a subunidade β de FSH, codificada pela SEQ ID No. 3 e 4 (= sequências de ácido nucléico do tipo selvagem) ou pela SEQ ID No. 5 e 6 (= sequências de ácido nucléico otimizadas de códon). O DNA que codifica as subunidades α e β pode estar presente nos mesmos vetores ou vetores diferentes.

FSH recombinante tem várias vantagens sobre sua contraparte urinária. Técnicas de cultura e isolamento usando células recombinantes permitem consistência entre os lotes. Ao contrário, FSH urinário varia muito de lote a lote em tais características como pureza, padrão de glicosilação, sialilação e oxidação das subunidades. Devido à consistência e pureza lote-a-lote maior de FSH recombinante, o hormônio pode ser facilmente identificado e quantificado usando técnicas tais como focalização isoelétrica (IEF). A facilidade com que FSH recombinante pode ser identificado e quantificado permite o enchimento de frascos em massa de hormônio (enchimento em massa) ao invés de enchimento por bioensaio.

O termo “atividade de FSH” refere-se à capacidade de uma

formulação de FSH para evocar respostas biológicas associadas com FSH, tais como ganho de peso ovariano no ensaio de Steelman-Pohley (Steelman *et al.* (1953) *Endocrinology* 53, 604-616), ou crescimento folicular em um paciente feminino. O crescimento folicular em um paciente feminino pode ser
5 avaliado por ultrassom, por exemplo, em termos do número de folículos tendo um diâmetro médio de cerca de 16 mm no dia 8 de estimulação. A atividade biológica é avaliada com respeito a um padrão aceito para FSH.

A bioatividade *in vivo* específica do FSH recombinante está usualmente na faixa de cerca de 8.000 IU FSH/mg de proteína a cerca de
10 16.000 IU FSH/mg de proteína. Por exemplo, o FSH humano recombinante no produto comercialmente disponível Puregon (da Organon) tem uma bioatividade específica de cerca de 10.000 IE/mg de proteína, e para Gonal-f da Serono a bioatividade do FSH humano recombinante é cerca de 13.600 IE/mg de proteína.

A atividade de FSH pode ser determinada por métodos conhecidos relativos a FSH e outras gonadotrofinas. Tais métodos incluem por exemplo, ensaio de imunotividade enzimática (EIA) ou ensaios de gene repórter. A bioatividade é usualmente determinada pelo bioensaio descrito na
15 European Pharmacopoeia, 5ª Edição para FSH derivado da urina, a bioatividade sendo estimada comparando-se o efeito de FSH em aumentar os
20 ovários de ratos imaturos tratados com gonadotrofina coriônica com o mesmo efeito de uma Preparação Padrão.

A atividade biológica do FSH ou variante de FSH pode ser avaliada comparando-se, sob condições dadas, seu efeito em aumentar os
25 ovários de ratos imaturos tratados com gonadotrofina coriônica com o mesmo efeito usando uma preparação de Padrão Internacional ou de uma preparação de referência calibrada em Unidades Internacionais (European Pharmacopoeia, 5ª Edição).

A medição da atividade de FSH *in vitro* é por exemplo,

descrita por Albanese *et al.* (1994) Mol. Cell Endocrinol. 101:211-219.

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

Os exemplos seguintes são fornecidos meramente para ilustrar ainda mais o método de purificação da invenção. O escopo da invenção não deve ser interpretado como meramente consistindo nos exemplos seguintes.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Preparação de um FSH humano recombinante por tecnologias recombinantes

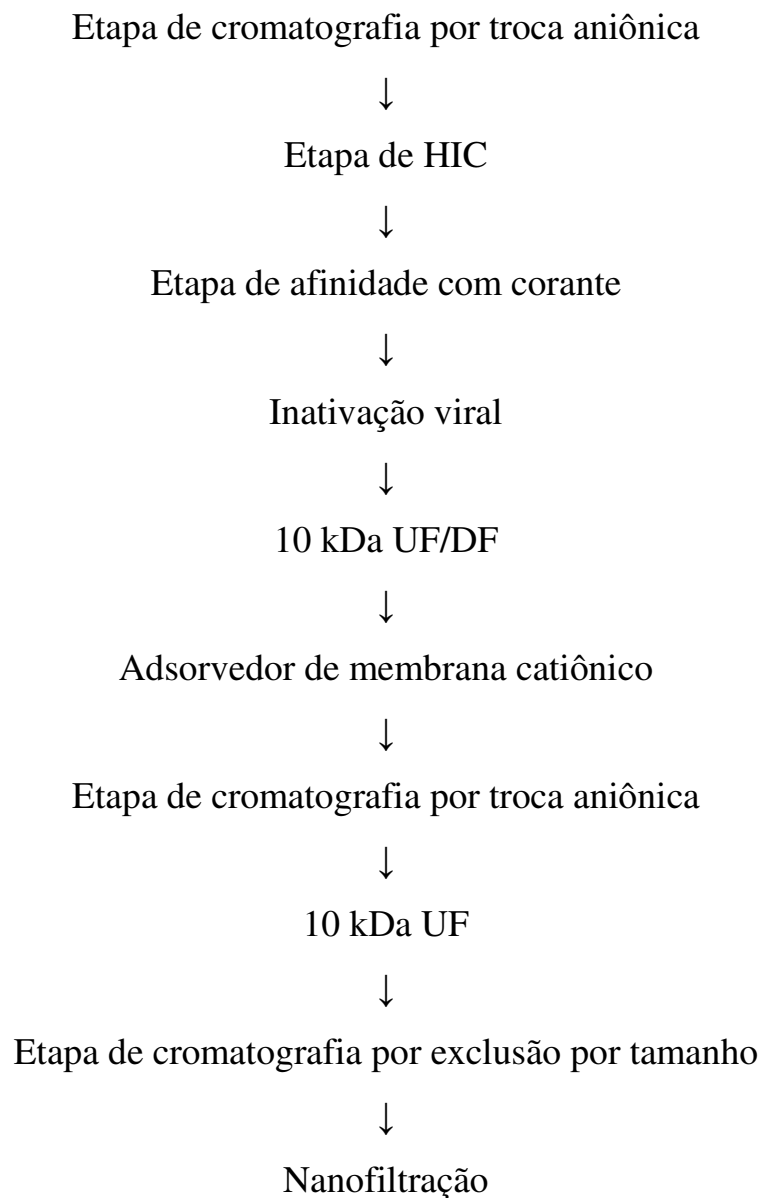
FSH humano recombinante é produzido em células CHO hospedeiras transfectadas por métodos padrão. Estes métodos incluem a geração de um clone de célula CHO que produz FSH humano recombinante a partir de uma ou mais moléculas de ácido nucléico recombinantes que codificam a cadeia α e a cadeia β de FSH humano, e cultivo das células hospedeiras sob condições adequadas. O FSH humano recombinante depois é purificado a partir da cultura celular de acordo com a invenção.

Em uma forma de realização preferida, o FSH humano recombinante é produzido como descrito no pedido de patente internacional WO 2009/000913.

Exemplo 2

Purificação de FSH a partir da cultura celular

O esquema de purificação é como segue:



A duração da fermentação foi de 28 dias, e o volume de fermentação foi 30 L. A colheita foi 0,22 µm filtrado e diluído com água RO por fator 3,5.

Etapa de cromatografia por troca aniônica (AEC):

5 A colheita do sobrenadante da cultura celular diluída foi aplicada à cromatografia por troca aniônica usando a resina de trocador aniônico forte de amônio quaternário conhecida na técnica como UNOsphere Q. Esta matriz está disponível da BioRad.

10 Três volumes de coluna (CV) de 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6 foram usados para o equilíbrio. A coluna foi carregada com a colheita (diluída

1:3,5 com água RO; o título de colheita foi de aprox. 1,8 µg de FSH/mL) e pós-lavado com 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6 (5 CV). Depois a coluna foi lavada com 50 mM de Tris-HCl, 15 mM de NaCl, pH 7,6 (5 CV), e a proteína foi eluída usando 50 mM de Tris-HCl, 200 mM de NaCl, pH 7,6 (8 CV). O rendimento da etapa foi 90 % e mais alto.

Etapa de HIC:

A HIC foi realizada usando uma resina consistindo em pérolas de agarose reticuladas derivadas com fenila. Phenyl Sepharose 6 FF (disponível da GE Healthcare) é um derivado altamente reticulado com base em agarose. Ela é física e quimicamente estável permitindo taxas de fluxo elevadas e vidas de resina aumentadas. Os detalhes técnicos desta resina são dados acima.

Oito eluados de AEC foram misturados e diluídos com 50 mM de Tris-HCl, 4,5 NaCl, pH 7,6 por fator 3. A coluna de HIC foi equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, 3 M de NaCl, pH 7,6 (4 CV) e carregada com o eluado de AEC diluído a 1:3. Depois a coluna foi pós-lavada usando 50 mM de Tris-HCl, 3 M de NaCl, pH 7,6 (3 CV) e lavada usando 50 mM de Tris-HCl, 1,8 M de NaCl, pH 7,6 (5 CV). O tampão de lavagem com 1,8 M de NaCl foi descoberto ter um bom potencial de liberação sem perda de FSH detectável. A proteína depois foi eluída com 50 mM de Tris-HCl, 0,8 M de NaCl, pH 7,6 (6 CV).

O rendimento de FSH da etapa de HIC foi > 95 % sem nenhuma perda significativa durante a carga e um bom potencial de liberação de proteína total de aprox. fator 10. Estes dados mostram que a etapa de HIC desenvolvida é uma etapa de purificação muito eficiente com rendimento e qualidade do produto razoáveis.

Etapa de cromatografia por afinidade com corante:

Blue Sepharose FF, disponível da GE Healthcare, foi usada para a etapa de cromatografia por afinidade com corante. O eluado de HIC foi

diluído com 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6 por fator 4. A coluna foi equilibrada usando 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6 (3 CV) e carregada com o eluado de HIC diluído a 1:4. A coluna foi pós-lavada com 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6 (3 CV), e a proteína de FSH foi eluída com 50 mM de Tris-HCl, 4 M de NaCl, pH 7,6 (6 CV).

A seguir da cromatografia por afinidade uma etapa de inativação viral foi realizada por incubação do eluado em 15 % de 2-propanol durante 2 horas. Para este propósito o eluado da cromatografia por afinidade com corante foi diluído por fator 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. Depois da incubação durante 2 horas o eluado da cromatografia por afinidade com corante inativado por vírus foi diluído com 20 mM de Tris-HCl, pH 7,0 por fator 2.

10 kDa UF/DF:

Ultra- e diafiltração foram geralmente realizadas de acordo com protocolos padrão. Dispositivos de UF/DF úteis são os cassetes de ultrafiltração/diafiltração Sartocoon (polietersulfona (PESU), 10 kD) da Sartorius (área de filtro: 14.000 cm², fator OF: 13 a 20, fator DF: 8 a 10, carga: 0,1 a 0,5 mg de FSH/cm²). A diafiltração com dispositivos de UF/DF foi geralmente realizada com fatores de ultrafiltração (concentração) de 13 a 20 e fatores de diafiltração de 8 a 10.

O eluado da cromatografia por afinidade com corante inativado por vírus foi diafiltrado em tampão de Tris-HCl (20 mM de Tris-HCl, pH 7,0) e carregado diretamente sobre o adsorvedor de membrana catiônico.

Etapa de adsorvedor de membrana catiônico:

A cromatografia por troca catiônica do método da invenção foi realizada usando uma membrana fabricada de celulose regenerada e tendo uma matriz cromatográfica de ácido sulfônico formada na cadeia

principal de celulose. Um tal adsorvedor de membrana está disponível da Sartorius sob o nome comercial adsorvedor de membrana Sartobind S. Um adsorvedor de membrana Sartobind S é uma cápsula com várias camadas de membrana, sobre a qual o ligando é imobilizado.

- 5 Adsorvedores de membrana têm a vantagem de tempos de processo curtos e volumes de tampão baixos. Os custos e tempo de validação são desprezíveis devido à idéia única de uso.

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

O processamento sobre o adsorvedor de membrana está em modo de fluxo contínuo que reduz tempos do processo. Além disso, nenhum condicionamento de carga é necessário com respeito à etapa de processo
15 seguinte (cromatografia por troca aniônica). O rendimento do produto no fluxo contínuo foi muito bom. Não houve virtualmente nenhuma perda de produto enquanto processando em um módulo de Sartobind S nos valores de pH 6,0, 6,5 e 7,0 em diferentes sistemas tampão.

A etapa de adsorvedor de membrana catiônico é muito
20 vantajosa para liberação de HCP (proteína de célula hospedeira). o rendimento, a 90 a 95 %, é muito favorável porque o FSH a ser purificado não liga-se ao adsorvedor no pH 7,0 em 20 mM de sistema tampão de Tris-HCl.

Etapa de cromatografia por troca aniônica:

Uma cromatografia por troca aniônica secundária foi realizada
25 usando a resina de trocador aniônico forte de amônio 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 CV). A mistura de fluxo contínuo de adsorvedor de membrana foi

carregada na coluna (3 CV), e a coluna foi primeiro lavada com 20 mM de Tris-HCl, pH 7,0 (2 CV), depois com 20 mM de Tris-HCl, pH 8,5 (3 CV) e finalmente lavada com 20 mM de Tris-HCl, 60 mM de NaCl, pH 8,5 (5 CV). Depois o FSH foi eluído com 20 mM de Tris-HCl, 130 mM de NaCl, pH 8,5 (6 CV).

O eluado de Q Sepharose HP tem uma pureza muito alta comparável ao produto comercial GONAL-f®.

10 kDa UF:

A ultrafiltração de 10 kDa foi realizada de acordo com protocolos padrão usando o cassete de ultrafiltração Sartocore (PESU, 10 kD) da Sartorius (área de filtro: 3.000 cm², fator UF: 10 a 30, carga: 0,2 a 1,0 mg de FSH/cm²). A ultrafiltração foi geralmente realizada com fatores de ultrafiltração (concentração) de 10 a 30.

Etapas de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC):

A cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada usando Superdex 75 pg, disponível da GE Healthcare. A coluna foi equilibrada usando 50 mM de Na-PO₄, pH 7,0 (2 CV). O retentado de 10 kDa UF foi carregado na coluna (0,025 CV), e a coluna foi pós-lavada com 50 mM de Na-PO₄, pH 7,0 (2 CV).

O eluado de SEC tem uma pureza alta na mesma faixa como o produto comercial GONAL-f®.

Nanofiltração:

Finalmente o eluado de SEC foi nanofiltrado usando filtros Planova 15N, vendidos por Asahi Kasei Medical Co., Ltd., o tamanho de poro médio sendo 15 nm. O máximo de carga alvo foi 2,5 mL/cm². A filtração foi realizada de acordo com o protocolo do fornecedor.

A pureza do FSH purificado foi medida por SE-HPLC e SDS-PAGE. A pureza e impurezas especificadas do FSH obtido foram como segue:

SE-HPLC (Dímeros e substâncias relacionadas

de massa molecular mais alta < 1 %

pureza red. (coloidal) de SDS-PAGE red. > 97 %

HCP (genérico) < 10 ppm

5 DNA < 0,006 pg/IU FSH

A bioatividade do FSH humano recombinante foi determinada como pelo menos cerca de 10.000 IU/mg. Preferivelmente a bioatividade do FSH humano recombinante ou variante de FSH está na faixa de cerca de 10.000 IU/mg a cerca de 17.000 IU/mg, mais preferivelmente a bioatividade é pelo menos cerca de 12.000 IU/mg, e o mais preferivelmente a bioatividade é pelo menos cerca de 15.000 IU/mg.

Listagem de sequência:

SEQ ID No. 1: sequência de aminoácido da cadeia α de FSH humano

15 SEQ ID No. 2: sequência de aminoácido da cadeia β de FSH humano

SEQ ID No. 3: sequência de ácido nucléico do tipo selvagem que codifica a cadeia α de FSH humano

20 SEQ ID No. 4: sequência de ácido nucléico do tipo selvagem que codifica a cadeia β de FSH humano

SEQ ID No. 5: sequência de ácido nucléico otimizada de códon que codifica a cadeia β de FSH humano

SEQ ID No. 6: sequência de ácido nucléico otimizada de códon que codifica a cadeia α de FSH humano

REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificar um hormônio folículo-estimulante (FSH) recombinante ou uma variante de hormônio folículo-estimulante (FSH) recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de
5 submeter um líquido contendo o dito FSH ou variante de FSH a:

- uma cromatografia por troca aniônica,
 - uma cromatografia por interação hidrofóbica, e
 - uma cromatografia por afinidade com corante,
- que são realizadas em qualquer ordem,

10 em que compreende uma cromatografia por troca aniônica fraca nem uma cromatografia por fase inversa.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas são realizadas na ordem seguinte:

- a) uma cromatografia por troca aniônica
- 15 b) uma cromatografia por interação hidrofóbica, e
- c) uma cromatografia por afinidade com corante.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por troca aniônica é realizada usando uma resina de troca aniônica forte tendo grupos funcionais $-N^+(CH_3)_3$, ou uma
20 resina tendo características similares.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por interação hidrofóbica é realizada usando uma resina consistindo em pérolas de agarose reticuladas derivadas com grupos fenila ou butila, ou uma resina tendo
25 características similares.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por afinidade com corante é realizada com Cibacron Blue 3G como o ligando, covalentemente ligado a qualquer matriz.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a cromatografia é realizada usando um tampão de Tris-HCl/cloreto de sódio como eluente em um pH na faixa entre 7,0 e 9,0.

5 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma cromatografia por troca catiônica.

10 8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por troca catiônica de membrana é realizada com um trocador catiônico ácido forte ácido sulfônico fixado em uma membrana, ou um trocador tendo características similares.

9. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que as etapas são realizadas na ordem seguinte:

- 15 a) uma cromatografia por troca aniônica,
b) uma cromatografia por interação hidrofóbica,
c) uma cromatografia por afinidade com corante, e
d) uma cromatografia por troca catiônica.

20 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma cromatografia por troca aniônica adicional.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por troca aniônica é realizada usando uma resina de troca aniônica forte tendo grupos funcionais $-N^+(CH_3)_3$, ou uma resina tendo características similares.

25 12. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por troca aniônica é realizada usando um tampão de Tris-HCl/cloreto de sódio como eluente em um pH na faixa entre 7,0 e 9,0.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de

10 a 12, caracterizado pelo fato de que as etapas são realizadas na ordem seguinte:

- 5
- a) uma cromatografia por troca aniônica primária,
 - b) uma cromatografia por interação hidrofóbica,
 - c) uma cromatografia por afinidade com corante,
 - d) uma cromatografia por troca catiônica opcional, e
 - e) uma cromatografia por troca aniônica secundária.

10 14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma cromatografia por exclusão de tamanho.

15 15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por exclusão de tamanho é realizada usando uma matriz de compósito esférico de agarose reticulada e dextrano.

15 16. Método de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que as etapas são realizadas na ordem seguinte:

- 20
- a) uma cromatografia por troca aniônica primária,
 - b) uma cromatografia por interação hidrofóbica,
 - c) uma cromatografia por afinidade com corante,
 - d) uma cromatografia por troca catiônica opcional,
 - e) uma cromatografia por troca aniônica secundária opcional, e
 - f) uma cromatografia por exclusão de tamanho.

25 17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas seguintes na ordem seguinte:

- 25
- a) uma cromatografia por troca aniônica primária,
 - b) uma cromatografia por interação hidrofóbica,
 - c) uma cromatografia por afinidade com corante,
 - d) uma troca catiônica de membrana,
 - e) uma cromatografia por troca aniônica secundária, e

f) uma cromatografia por exclusão de tamanho.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma ou mais etapas de ultrafiltração e/ou nanofiltração.

5 19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que nenhuma cromatografia por afinidade com íon de metal é realizada.

10 20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que nenhuma cromatografia por imunoafinidade é realizada.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o FSH tem uma subunidade α de acordo com a SEQ ID No. 1 e uma subunidade β de acordo com a SEQ ID No. 2.

15 22. Hormônio folículo-estimulante (FSH) ou variante de hormônio folículo-estimulante (FSH), caracterizado pelo fato de que são obtidos pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

20 23. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o FSH ou variante de FSH como definido na reivindicação 22 assim como um excipiente farmacêuticamente aceitável.

25 24. Uso do Hormônio folículo-estimulante (FSH) ou da variante de hormônio folículo-estimulante (FSH), ou de uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 23, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento de distúrbios de fertilidade.

RESUMO

“MÉTODO PARA PURIFICAR UM HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE RECOMBINANTE OU UMA VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE RECOMBINANTE, HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE OU VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DO HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE OU DA VARIANTE DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE, OU DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

10 A presente invenção refere-se a um método para purificar um hormônio folículo-estimulante (FSH) recombinante ou variante de FSH recombinante. O método compreende as etapas de submeter um líquido contendo um FSH recombinante ou variante de FSH recombinante a uma cromatografia por troca aniônica, a uma cromatografia por interação hidrofóbica, e a uma cromatografia por afinidade com corante, em que estas cromatografias podem ser realizadas em qualquer ordem, e em que o método nem compreende uma cromatografia por troca aniônica fraca nem uma cromatografia por fase inversa. O método de purificação resulta em um rendimento alto de FSH recombinante tendo um grau desejado de pureza. O FSH obtido é especialmente útil para a profilaxia e tratamento de distúrbios e indicações médicas onde preparações de FSH são consideradas como medicamentos úteis.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



5D6F286909B36CC4

Campo 2



A57855B2DB79D3BF

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 112659e001.txt
- Data de Geração do Código: 26-09-2011
- Hora de Geração do Código: 11:42:18
- Código de Controle:
 - Campo 1: 5D6F286909B36CC4
 - Campo 2: A57855B2DB79D3BF