



Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0417992-7

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0417992-7

(22) Data do Depósito: 16/12/2004

(43) Data da Publicação do Pedido: 14/07/2005

(51) Classificação Internacional: C07K 14/59.

(30) Prioridade Unionista: EP 03 104925.7 de 22/12/2003.

(54) Título: MÉTODOS PARA PURIFICAR FSH HUMANO RECOMBINANTE OU UMA VARIANTE DE FSH

(73) Titular: ARES TRADING S.A., Sociedade Suíça. Endereço: Zone Industrielle De L'Ouriettaz, CH-1170 Aubonne, SUIÇA(CH)

(72) Inventor: MARA ROSSI.

Código de Controle: 73BFA26FD97FF2C2 40EA1030467433D7

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 02/01/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 02/01/2019

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA PURIFICAR FSH HUMANO RECOMBINANTE OU UMA VARIANTE DE FSH"**.

Campo da Invenção

[001] A presente invenção se refere ao campo de purificação de proteínas, particularmente a purificação de hormônio estimulante de folículos (FSH).

Antecedentes da Invenção

[002] O hormônio estimulante de folículos (FSH) é uma proteína injetável caindo na classe de gonadotrofinas. FSH é usado no tratamento de infertilidade e distúrbios de reprodução em pacientes tanto do sexo feminino como masculino.

[003] Na natureza, FSH é produzido pela glândula pituitária. Para uso farmacêutico, FSH pode ser produzido de modo recombinante (rFSH), ou pode ser isolado da urina de mulheres na pós-menopausa (uFSH).

[004] FSH é usado em pacientes do sexo feminino em indução de ovulação (OI) e em hiperestimulação ovariana controlada (COH) para tecnologias reprodutivas assistidas (ART). Em um regime de tratamento típico para indução de ovulação, um paciente é administrado diariamente com injeções de FSH ou uma variante (cerca de 75 a 300 UI 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 diariamente com injeções de FSH ou uma variante (cerca de 150-600 UI FSH/dia) durante um período de cerca de 6 a cerca de 12 dias.

[005] FSH é também usado para induzir espermatogênese em homens sofrendo de oligospermia. Um regime usando 150 UI FSH 3 vezes semanalmente em combinação com 2.500 UI hCG duas vezes por semana obteve sucesso para alcançar uma melhora na contagem

de esperma em homens sofrendo de hipogonadismo hipogonadotrófico ([Burgues et al.; *Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotrophic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotrophic Hypogonadism; Hum. Reprod.*; **1997**, 12, 980-6]).

[006] Devido à importância de FSH no tratamento de distúrbios de fertilidade, a provisão de FSH de alta pureza e elevada atividade específica é desejável. O tratamento com FSH requer injeção repetida. As preparações de FSH altamente purificadas podem ser administradas subcutaneamente, permitindo a autoadministração pelo paciente, assim aumentando muito a conveniência e adesão do paciente.

[007] Lynch *et al.* [The extraction and purification of human pituitary follicle-stimulating hormone and luteinising hormone; *Acta Endocrinologica*, **1988**, 288, 12-19] descreve um método de purificação de FSH pituitário humano. O método envolve cromatografia de troca aniônica e catiônica, e cromatografia de exclusão de tamanho. Afirma-se que o método resulta em FSH pituitário tendo uma atividade específica de 4.990 UI (imunoteste)/mg, com 16 UI/mg de LH. O teor de proteína foi determinado ou por peso seco ou em solução por absorção a 280 nm (considerando que $A_{280}^{1\text{cm}}$ para 1 g/l é igual a 1).

[008] WO 98/20039 (IBSA Institut Biochimique SA) descreve um processo para a purificação de FSH urinário humano partindo com extratos urinários chamados gonadotrofinas de menopausa humana (hMG). O processo usa cromatografia de troca iônica em resinas de troca aniônica fracamente básicas de tipo DEAE seguido por cromatografia por afinidade em resina tendo um derivado antraquinona como um ligante. O processo dá, como se afirma, FSH urinário isento de LH e tendo uma atividade específica de 6.870 UI (imunoteste)/mg. O teor de proteína foi determinado ao se considerar que uma solução em

água de 1 mg/mL de proteína tem uma densidade óptica de 0,62 a 277 nm, em cubetas de quartzo com um comprimento de trajeto de 1 cm.

[009] WO 00/63248 (Instituto Massone SA) descreve um processo para a purificação de gonadotrofinas, incluindo FSH, de urina humana. O processo envolve as seguintes etapas: cromatografia de troca iônica com uma resina catiônica forte do tipo sulfopropila, cromatografia de troca iônica com uma resina aniônica forte, e cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Uma preparação de FSH tendo uma atividade específica de 8.400 UI/mg (método de Steelman-Pohley : *Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation com human chorionic gonadotrophin; Endocrinology*, **1953**, 53, 604-616) e menos do que 1 UI LH (rat seminal vesicle weight gain method: Van Hell H, Matthijsen R & GA Overbeek; *Acta Endocrinol*, **1964**, 47, 409) de atividade biológica por 75 UI FSH são obtidos, como registrado. O teor de proteína foi realizado pelo método de Lowry [O.H. Lowry *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265].

[0010] US 5.990.288 (Musick *et al.*) descreve um método para purificar FSH de amostras biológicas, como glândulas pituitárias humanas em urina pós-menopausa humana. O processo usa cromatografia de afinidade de corante. Diz-se que o processo resulta em FSH pituitário humano tendo uma atividade específica de 7.066 UI (imunoteste)/mg e menos do que 1 UI (imunoteste)/mg of LH, e um FSH urinário tendo uma atividade específica de 6.298 UI (imunoteste)/mg e menos do que 3 UI (imunoteste)/mg of LH. O teor de proteína foi determinado por absorção a 280 nm (considerando que $A^{280}_{1\text{cm}}$ para 1 g/l é igual a 1).

[0011] Chiba *et al.* [Isolation and partial characterisation of LH, FSH and TSH from canine pituitary gland; *Endocrinol. J.*, **1997**, 44, 205-218] descreve uma técnica para purificar gonadotrofinas pituitárias caninas, incluindo FSH, usando cromatografia de afinidade de conca-

navalina (Con) A, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e cromatografia de íon metal imobilizado com Cu^{++} . O FSH resultante é registrado como tendo uma atividade específica de 2,17 UI/g proteína usando um teste radiorreceptor para FSH para medir a atividade biológica e o kit de teste de proteína BioRad (BioRad Laboratories CA USA) para determinar o teor de proteína.

[0012] WO 88/10270 (Istituto di Ricerca Cesare Serono SPA) descreve um método para purificar FSH humano de urina. O processo envolve a imunocromatografia com anticorpos monoclonais imobilizados específicos para FSH ligados a Sepharose 4B por divinil sulfona, seguido por HPLC em fase reversa. O FSH resultante é isento de LH e outras proteínas urinárias e tem uma atividade específica de 6.200 UI/mg de pó liofilizado (método de Steelman-Pohley). A preparação foi a primeira preparação de FSH a ser apropriada para administração subcutânea devido à sua grande pureza.

[0013] Existe uma necessidade crescente para novos métodos para purificar FSH.

Sumário da Invenção

[0014] É um objeto da invenção prover um novo método para purificar FSH recombinante ou uma variante de FSH.

[0015] Em um primeiro aspecto, a invenção provê um método para purificar FSH humano recombinante ou uma variante de FSH, compreendendo as etapas:

- (1) cromatografia de troca iônica;
- (2) cromatografia de íon metal imobilizado;
- (3) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC).

que podem ser realizadas em qualquer ordem.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0016] Figura 1 mostra um fluxograma mostrando a purificação de rhFSH.

[0017] Figura 2 mostra o perfil de eluição para cromatografia de rhFSH bruto em Sepharose FF como detectado por OD a 280 nm.

[0018] Figura 3 mostra o perfil de eluição para cromatografia IMAC de rhFSH parcialmente purificado como detectado por OD a 280 nm.

[0019] Figura 4 mostra o perfil de eluição para cromatografia DEAE Sepharose de rhFSH parcialmente purificado como detectado por OD a 280 nm.

[0020] Figura 5 mostra o perfil de eluição para cromatografia Phenyl Sepharose de rhFSH parcialmente purificado como detectado por OD a 280 nm.

[0021] Figura 6 mostra o perfil de eluição para a etapa de RPC usando uma coluna Source 30 RPC.

Abreviaturas

[0022] As seguintes abreviaturas são usadas na descrição da invenção:

[0023] FSH: hormônio estimulante de folículos;

[0024] rFSH: FSH recombinante

[0025] hFSH: FSH humano;

[0026] rhFSH: FSH humano recombinante

[0027] BV: Volume do leite

[0028] DEAE: dietilaminoetila

[0029] IMAC: cromatografia de afinidade de íon metal imobilizado

[0030] OD: densidade óptica

[0031] HIC: Cromatografia de interação hidrofóbica

[0032] HPLC : cromatografia líquida de elevado desempenho

[0033] IRMA: teste imunorradiométrico

[0034] KD ou kD: kiloDalton

[0035] HCP: proteína de célula hospedeira, proteínas surgindo da célula hospedeira usada para expressão de FSH

[0036] IPC: em controles do processo

[0037] RP-HPLC: cromatografia líquida de elevado desempenho – fase reversa

[0038] Q FF: troca aniônica on Q sepharose FF

Descrição detalhada da invenção

[0039] A invenção provê um método para purificar FSH humano recombinante ou uma variante de FSH, compreendendo as etapas:

- (1) cromatografia de troca iônica;
- (2) cromatografia de íon metal imobilizado;
- (3) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC).

que podem ser realizadas em qualquer ordem.

[0040] O método de purificação de invenção permite a obtenção de um FSH purificado de uma pureza comparável a produtos FSH conhecidos, como Gonal-F (Serono) e Metrodin-HP (Serono). O material de partida para a purificação é FSH recombinante.

Formas de realização preferidas da invenção

[0041] O método de purificação da invenção envolve uma etapa cromatografia de troca iônica. Em uma modalidade preferida, a etapa de cromatografia de troca iônica é realizada com uma resina de troca aniônica forte, particularmente preferivelmente uma resina de amônio quaternário, como Q Sepharose FF (Amersham Biosciences), ou uma resina tendo características similares, como a seguir:

Tipo de trocador iônico:	ânion forte
Total capacidade (mmol/mL):	0,18-0,25
Limite de exclusão (proteínas globulares):	4 X 10 ⁶
Forma de contas:	esféricas, diâmetro 45-165 µm
Estrutura da conta:	agarose reticulada, 6%
Estabilidade pH operacional :	2-12
Estabilidade pH de limpeza:	1-14
Taxa de fluxo linear a 25°C 1 bar 15 cm	

altura do leito, coluna XK 50/30: 400-700 cm/h

[0042] Na etapa de cromatografia de troca iônica, eluição é preferivelmente realizada usando um tampão tendo um pH suavemente alcalino (por exemplo em ou cerca de 7,2 a em ou cerca de 9,0, ou em ou cerca de 8,0 a em ou cerca de 9,0, o mais preferivelmente em ou cerca de 8,5). Os tampões apropriados incluem, por exemplo tampão borato, trietanolamina/ácido iminodiacético. O mais preferido é tampão borato, em um pH em ou cerca de 8,5. A concentração da espécie de tampão de eluição está preferivelmente dentro da faixa de em ou cerca de 10 a em ou cerca de 100 mM, mais preferivelmente em ou cerca de 25 a em ou cerca de 75 mM, mais preferivelmente em ou cerca de 50 mM.

[0043] Antes da etapa de cromatografia de troca iônica, pode ser desejável realizar uma etapa de ultrafiltração, a fim de concentrar o FSH bruto. A ultrafiltração (ou diafiltração) é preferivelmente realizada usando uma membrana tendo um corte de em ou cerca de 3 –10 kD, o mais preferivelmente em ou cerca de 5 kD.

[0044] O método da invenção também envolve uma etapa de cromatografia de íon metal imobilizado. Em uma modalidade preferida, a etapa de cromatografia de íon metal imobilizado é realizada usando uma resina tendo grupos quelato tridentados, como, por exemplo, ácido iminodiacético (IDA), e um íon metal divalente, M^{2+} , como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Co^{2+} , preferivelmente Cu^{++} . O grupo quelante de íon metal é fixado a um suporte sólido apropriado, como, por exemplo, Sepharose. Uma resina particularmente preferida é Sepharose FF quelante (Amersham Biosciences), ou outras resinas tendo similares características, como a seguir:

Composição: 6% agarose altamente reticulado

tamanho partícula: 45-165 μm

Ligante: grupos de ácido iminodiacético em

	espaçador
química de copulação :	Epóxi
capacidade de íon metal:	30-37 $\mu\text{mol Cu}^{2+}/\text{mL}$
estabilidade de pH (operacional):	3-13
estabilidade de pH (prazo curto):	2-14
Pressão/espec. De fluxo:	matriz de base 200-400 cm/h, 1 bar (100 kPa), coluna XK 50/60, altura do leito 25 cm

[0045] Eluição na etapa de cromatografia de íon metal imobilizado deve ser realizada usando um tampão de imidazol, fosfato ou acetato, particularmente preferivelmente acetato, como acetato de amônio. O pH do eluente deve preferivelmente ser de ou cerca de 7,5 a em ou cerca de 10, mais preferivelmente em ou cerca de 8,0 a em ou cerca de 9,5, particularmente preferivelmente em ou cerca de 9. A concentração das espécies de tampão no eluente devem preferivelmente estar em ou cerca de 0,1 a em ou cerca de 2 M, mais preferivelmente em ou cerca de 0,5 M a em ou cerca de 1 M, o mais preferivelmente em ou cerca de 0,75 M.

[0046] O método também envolve uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica. Em uma modalidade preferida, a cromatografia de interação hidrofóbica é realizada com a resina como Phenyl Sepharose FF HS (Amersham Biosciences), ou uma resina tendo características similares, como a seguir:

Matriz :	6% agarose esférico altamente reticulado
Tamanho médio de partícula :	90 μm
Ligante hidrofóbico:	PHENYL
densidade de ligante:	40
estabilidade de pH (prazo curto):	2-14
estabilidade de pH (prazo longo e	

faixa de trabalho): 3-13

[0047] Eluição em uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica é preferivelmente realizada usando um tampão tendo um pH suavemente alcalino (por exemplo em ou cerca de 7,2 a em ou cerca de 9, mais preferivelmente em ou cerca de 7,5 a em ou cerca de 8,5, o mais preferivelmente em ou cerca de 8,25). Um eluente particularmente preferido é acetato de amônio (50 mM)/sulfato de amônio (0,25 M), preferivelmente em um pH em ou cerca de 8,25.

[0048] Após a etapa de cromatografia de interação hidrofóbica, também é possível realizar uma etapa de cromatografia de fase reversa (RPC). RPC é preferivelmente realizado usando uma resina como SOURCE 30 RPC (Amersham Biosciences). Eluição é preferivelmente realizada usando um tampão como acetato de amônio, preferivelmente em pH suavemente alcalino, por exemplo em ou cerca de pH 7-8,5, mais preferivelmente em ou cerca de 7,5 ou 7,6. A solução de tampão preferivelmente contém em ou cerca de 5-25% (volume/volume), preferivelmente em ou cerca de 10-20%, de um solvente orgânico miscível em água, preferivelmente um álcool C₁ a C₃, o mais preferivelmente 2- propanol (*iso*-propanol).

[0049] As etapas de cromatografia de troca iônica, cromatografia de íon metal imobilizado, e cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) podem ser realizadas em qualquer ordem, apesar de ser preferido realizar a etapa de cromatografia de troca iônica primeiro. As etapas restantes de cromatografia de íon metal imobilizado, e cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) podem ser realizadas em qualquer ordem, apesar de ser preferido seguir a ordem mostrada abaixo:

[0050] Cromatografia de troca iônica, (2) Cromatografia de íon metal imobilizado, e (3) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC).

[0051] Em uma outra modalidade preferida, entre etapa (2) e etapa (3) uma outra etapa de cromatografia de troca iônica é realizada (2a),

particularmente preferivelmente com uma resina de troca aniônica fraca, como por exemplo uma resina de troca contendo grupos diamino-etila, particularmente DEAE Sepharose FF. Em uma modalidade particularmente preferida, as etapas são realizadas na ordem mostrada abaixo:

[0052] Cromatografia de troca iônica, (2) Cromatografia de íon metal immobilizado, (2a) segunda etapa de cromatografia de troca iônica, e (3) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC).

[0053] Em uma modalidade particularmente preferida, o método da invenção compreende as etapas caracterizadas como a seguir:

(1) cromatografia de troca iônica (preferivelmente com uma resina de troca aniônica forte, como Q Sepharose FF);

(2) cromatografia de íon metal immobilizado (preferivelmente com Sepharose FF quelante, usando Cu^{++} como íon metal);

(2a) cromatografia de troca iônica (preferivelmente com uma resina de troca aniônica fraca, como DEAE Sepharose FF)

(3) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) (preferivelmente com Phenyl Sepharose FF HS).

[0054] A segunda etapa de cromatografia de troca iônica (2a) é preferivelmente realizada usando tampão de acetato de amônio como eluente, preferivelmente em um pH de em ou cerca de 8,5. Preferivelmente o tampão de acetato de amônio está em ou cerca de 0,05 a em ou cerca de 0,5 M, mais preferivelmente em ou cerca de 0,11 M.

[0055] Em uma outra modalidade preferida, após qualquer uma das etapas de cromatografia (particularmente preferivelmente após uma etapa de cromatografia em fase reversa), a amostra de FSH é submetida a concentração por ultrafiltração. A ultrafiltração (ou diafiltração) é preferivelmente realizada usando uma membrana tendo um corte de em ou cerca de 3 –10 kD, o mais preferivelmente em ou cerca de 5 kD.

[0056] Em uma modalidade particularmente preferida, as seguintes etapas são realizadas na ordem mostrada abaixo:

[0057] (0) Ultrafiltração (preferivelmente com uma membrana tendo um corte de em ou cerca de 5 kD), (1) Cromatografia de troca iônica (preferivelmente com Q Sepharose FF), (2) Cromatografia de íon metal imobilizado (preferivelmente com Sepharose FF quelante e Cu^{++}), (2a) segunda etapa de cromatografia de troca iônica (preferivelmente DEAE Sepharose FF), (3) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) (preferivelmente com Phenyl Sepharose FF HS), (4) cromatografia de fase reversa (RPC) (preferivelmente com Source 30 RPC), e (5) ultrafiltração (preferivelmente com uma membrana tendo um corte de 5 kD).

[0058] Pode ser desejável submeter a amostra de FSH a uma etapa de nanofiltração, a fim de assegurar que a preparação de FSH purificado é isenta de vírus. Nanofiltração pode ser feita em qualquer estágio do processo de purificação, no entanto é particularmente preferido realizar nanofiltração após a segunda etapa de cromatografia de troca iônica, ou após cromatografia de fase reversa ou após cromatografia de interação hidrofóbica. Nanofiltração pode ser realizada mais de uma vez, por exemplo pode ser realizada duas vezes.

[0059] Em uma modalidade particularmente preferida, o método da invenção compreende as seguintes etapas:

[0060] (0) Ultrafiltração (preferivelmente com uma membrana tendo um corte de em ou cerca de 5 kD), (1) cromatografia de troca iônica (preferivelmente com Q Sepharose FF), (2) cromatografia de íon metal imobilizado (preferivelmente com Sepharose FF quelante e Cu^{++}), (2a) segunda etapa de cromatografia de troca iônica (preferivelmente DEAE Sepharose FF), (3) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) (preferivelmente com Phenyl Sepharose FF HS), (4) cromatografia de fase reversa (RPC) (preferivelmente com Source 30 RPC), e (5) ultra-

filtração (preferivelmente com uma membrana tendo um corte de 5 kD), (6) nanofiltração.

Armazenamento/liofilização

[0061] A composição líquida resultante do processo de purificação como descrito acima e contendo FSH purificado pode ser congelada para armazenamento como tal ou após purificação, o eluado pode ser submetido a liofilização ("secagem por congelamento") para remover solvente. O líquido resultante ou produto liofilizado é chamado "FSH bruto".

Formulações de FSH

[0062] FSH ou uma variante de FSH da invenção ou purificado de acordo com o método da invenção deve ser formulado para injeção, ou intramuscular ou subcutânea, preferivelmente subcutânea.

[0063] A formulação de FSH pode ser secada por congelamento, em cujo caso é dissolvida em água para injeção logo antes da injeção. A formulação de FSH pode ser também uma formulação líquida, neste caso pode ser injetada diretamente, sem dissolução anterior.

[0064] A formulação de FSH pode ser de dose única ou dose múltipla. Se for de dose múltipla, ela deve preferivelmente conter um agente bacteriostático, como, por exemplo álcool benzílico, meta-cresol, timol ou fenol, preferivelmente álcool benzílico, ou meta-cresol. As formulações de dose única podem também compreender um agente bacteriostático.

[0065] O FSH da invenção pode ser formulado com excipientes conhecidos e estabilizantes, por exemplo sacarose e manitol. Também pode compreender um antioxidante, como metionina. Pode ainda compreender um tensoativo, como TWEEN (preferivelmente TWEEN 20), ou Pluronic (preferivelmente Pluronic F68).

[0066] Em uma formulação de múltiplas doses particularmente preferida, FSH produzido pelo método da invenção é formulado por

dissolução do mesmo em água para injeção com sacarose, tampão fosfato (pH 7), Pluronic F68, metionina e meta-cresol ou álcool benzílico.

Indicações

[0067] O FSH da invenção é apropriado para uso em todos os tratamentos onde FSH é indicado. Ele é particularmente apropriado para administração subcutânea em indução de ovulação, hiperestimulação ovariana controlada para tecnologias reprodutivas auxiliadas, e no tratamento de oligospermia. Pode ser usado em conjunto com outras gonadotrofinas, como LH e hCG. Também pode ser usado com compostos que aumentam a resposta a FSH, como citrato de colmifenol, inibidores de aromatase, como Anastrozol, Letrozol, Fadrozol e YM-511.

Sequencias

[0068] SEQ ID NO. 1: α -subunidade de glicoproteína humana;

[0069] SEQ ID NO. 2: β -subunidade de hFSH

[0070] SEQ ID NO. 3: hFSH β -variante de subunidade 1

[0071] SEQ ID NO. 4: hFSH β -variante de subunidade 2

[0072] SEQ ID NO. 5: hFSH β -variante de subunidade 3

[0073] Hormônio estimulante de folículos, ou FSH, como usado aqui se refere a FSH humano (hFSH) produzido como uma proteína madura de comprimento completo. FSH é um dímero composto de alfa-subunidade de glicoproteína humana e a beta-subunidade de FSH humano. A sequência de proteína da alfa-subunidade de glicoproteína humana é provida em SEQ ID NO: 1, e a sequência de proteína da beta-subunidade de FSH humano é dada em SEQ ID NO: 2.

[0074] O uso do termo "recombinante" se refere às preparações de FSH que são produzidas através do uso de tecnologia de DNA recombinante (ver por exemplo WO 85/01958). Um exemplo de um método de expressão de FSH usando tecnologia recombinante é por transfecção de células eucarióticas com sequências de DNA codifi-

cando uma alfa e beta subunidade de FSH, ou provida em um vetor ou em dois vetores com cada subunidade tendo um promotor separado, como descrito nas patentes européias nos. EP 0 211 894 e EP 0 487 512. O DNA codificando FSH pode ser um cDNA ou pode conter íntrons. Outro exemplo é o uso de tecnologia recombinante para produzir FSH é pelo uso de recombinação homóloga para inserir um segmento regulatório heterólogo em conexão operativa para sequências endógenas codificando uma ou ambas as subunidades de FSH, como descrito na patente EP 0 505 500 (Applied Research Systems ARS Holding NV). Também contemplado são os métodos como descritos em WO 99/57263 (Transkaryotic Therapies), em que uma das subunidades é inserida de modo heterólogo na célula e a outra subunidade é expressada por ativação de sequências genômicas por inserção de um segmento regulatório heterólogo por recombinação homóloga. O método da invenção pode ser usado para purificar FSH expressado usando qualquer um destes métodos.

[0075] A expressão "célula recombinante" se refere a uma célula produzida por inserção de DNA heterólogo, incluindo qualquer um dos métodos acima mencionados de manipulação genética.

[0076] Preferivelmente, o FSH é produzido de modo recombinante em células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com um vetor ou vetores compreendendo DNA codificando para alfa-subunidade de glicoproteína humana e a beta-subunidade de FSH. O DNA codificando as unidades alfa e beta pode estar presente no mesmo ou diferentes vetores.

[0077] A expressão "variante de FSH" significa englobar as moléculas diferindo em sequência de aminoácidos, padrão de glicosilação ou ligação intersubunidade de FSH humano mas demonstrando atividade para FSH. Os exemplos incluem CTP- FSH, um FSH recombinante modificado de longa ação, consistindo de α -subunidade de tipo

selvagem, e uma β -subunidade híbrida em que o peptídeo terminal carbóxi de hCG foi fundido no C-terminal de β -subunidade de FSH, como descrito em LaPolt *et al.*; *Endocrinology*; **1992**, *131*, 2514-2520; ou Klein *et al.*; *Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist*; *Human Reprod.* 2003, *18*, 50-56]. Também está incluída o CTP-FSH de cadeia única, uma molécula de cadeia única, consistindo das seguintes sequências (de N-terminal a C-terminal):

β FSH	β hCG-CTP(113-145)	α FSH
-------------	--------------------------	--------------

em que β FSH significa a β -subunidade de FSH, β hCG CTP (113-145) significa o peptídeo terminal carbóxi de hCG e α FSH significa a α -subunidade de FSH, como descrito por Klein *et al.* [*Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotrophin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey*; *Fertility & Sterility*; **2002**, *77*, 1248-1255]. Outros exemplos de variantes de FSH incluem as moléculas de FSH tendo sítios de glicosilação adicionais incorporados na α - e/ou β -subunidade, como descrito em WO 01/58493 (Maxygen), e moléculas de FSH com ligações S-S- intersubunidade, como descrito em WO 98/58957. Outros exemplos de variantes de FSH incluem moléculas quiméricas compreendendo sequências de FSH e sequência de hCG ou LH, como descritas em WO 91/16922 e WO 92/22568.

[0078] As variantes de FSH referidas aqui também incluem as deleções de terminal carbóxi de beta-subunidade que são mais curtas do que a proteína madura de comprimento completo de SEQ ID NOS: 2. As deleções de terminal carbóxi de subunidade beta humana são dadas em SEQ ID NO: 3, 4 e 5. Entende-se que as variantes de terminal carbóxi da cadeia beta formam dímeros com uma alfa-subunidade co-

nhecida para formar um heterodímero de variante de FSH.

[0079] Em uma modalidade preferida, o FSH é produzido de modo recombinante em células CHO.

[0080] Em uma modalidade preferida, o FSH purificado produzido de acordo com o método da invenção é apropriado para administração subcutaneamente, permitindo a autoadministração pelo paciente.

[0081] A expressão "FSH recombinante bruto" se refere a sobrenadante de cultura de células de células recombinantes expressando FSH, antes de sofrer qualquer etapa cromatográfica. A expressão engloba a forma bruta de sobrenadante (como isolado de células) assim como sobrenadante concentrado e/ou filtrado e/ou ultrafiltrado.

[0082] O termo "atividade biológica" em relação à atividade de FSH, se refere à capacidade de uma formulação de FSH elicitar as respostas biológicas associadas com FSH, como ganho de peso ovariano no teste de Steelman Pohley (Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin: *Endocrinology*; 1953, 53, 604-616], ou crescimento folicular em um paciente fêmea. O crescimento folicular em um paciente fêmea pode ser avaliado por ultra-som, 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 relação a um padrão aceito para FSH.

[0083] O teor de LH em uma preparação de FSH pode ser medido, por exemplo, usando um imunoteste específico para LH, como Delfia hLH Spec (Wallac Oy, Turku, Finlândia).

[0084] O termo "atividade específica" em referência a FSH, significa a atividade biológica em UI de preparação em um teste biológico reconhecido para FSH, como o bioteste de Steelman Pohley, dividido pela quantidade de proteína, como determinado por um teste para teor de proteína total, como o teste de Lowry [O.H. Lowry, N.J. Rose-

brough, A.L. Farr e R.J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* **193**: 265; Hartree E. E. (1972). *Anal. Biochem.* **48**: 422; J.R. Dulley e P.A. Grieve (1975) *Anal. Biochem.* **64**: 136], o teste de Bradford [Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248], ou por absorvância a 280 nm. Preferivelmente FSH da invenção tem uma atividade específica superior a em ou cerca de 4000 UI/mg, mais preferivelmente superior a em ou cerca de 6000 UI/mg, ainda mais preferivelmente superior a em ou cerca de 7000 UI/mg, ainda mais preferivelmente superior a em ou cerca de 8000 UI/mg em que a atividade biológica é medida pelo teste de Steelman-Pohley e o teor de proteína é medido por OD a 280 nm.

Exemplos

Purificação

[0085] O seguinte exemplo provê r-hFSH purificado partindo de r-hFSH bruto concentrado produzido em biorreatores de 15 e 75 L.

[0086] Um fluxograma do processo de purificação descrito em detalhes nas próximas seções é apresentado na Figura 1. O rhFSH purificado resultante é chamado "rhFSH bruto".

[0087] Para todos os tampões, pH e os valores de condutividade são referidos como + 25°C, isto é, a determinação do valor de condutividade foi realizada usando um instrumento equipado com sonda de temperatura e o valor obtido foi automaticamente compensado para diferença de temperatura e referido como + 25°C.

[0088] Com relação às medidas de condutividade, o coeficiente de temperatura de correlação foi sempre fixado em 2.

Etapa 0: Diafiltração do rhFSH bruto concentrado

Equipamento

[0089] • Sistema de ultrafiltração tipo Pellicon Mini (Millipore ou equivalente)

[0090] • Membrana de ultrafiltração em corte de 5KD em polietersulfona tipo BIOMAX (Millipore ou equivalente), 0,1 m²

- [0091] • Bomba peristáltica de tipo Masterflex ou equivalente

Materiais

- [0092] • r-hFSH bruto concentrado
- [0093] • Quantidade de partida: 200-400 mg FSH determinado por imunoteste DELFIA para FSH (do biorreator de 75 L)
- [0094] • Péletes de hidróxido de sódio – (Merck)
- [0095] • Água purificada (Modulab ou equivalente)
- [0096] • Ácido bórico
- [0097] • Tetraborato de sódio decahidratado
- [0098] • Hidróxido de sódio (péletes)
- [0099] • tampão borato (50 mM de Borato de sódio pH 8,5±0,1): 3,06 g de ácido bórico e 10 g de tetraborato de sódio dihidratado foram adicionados a 900 mL de água purificada sob agitação, e levados a 1 L.

PROCEDIMENTO DE ULTRAFILTRAÇÃO

- [00100] Todas as operações foram realizadas em condições refrigeradas (3-8°C).
- [00101] O r-hFSH bruto concentrado (1-1,5 L) foi ultrafiltrado sob as seguintes condições:
- [00102] • tampão : 50 mM de Borato de sódio pH 8,5±0,1, condutividade 1,9±0,2 mS/cm
- [00103] • Fluxo do permeado: 15-25 mL/minuto
- [00104] • Pressão de entrada : 1,5-2,2 bar
- [00105] • Pressão de transmembrana: 1,5-1,8 bar
- [00106] Onde:
- [00107] Pressão de transmembrana (TMP) = (pressão de entrada + pressão de saída) / 2
- [00108] A solução de rhFSH foi concentrada até um volume de 1 L.
- [00109] A fração de retido foi diluída com 1 volume de água purificada e concentrada novamente até 1 L (lavagem);

[00110] A etapa de lavagem foi repetida mais duas vezes;

[00111] A condutividade do permeado foi verificada, e se foi inferior a 1,5 mS/cm, a amostra foi enviada para a próxima etapa, de outra forma a etapa de lavagem foi repetida.

Condutividade do permeado <1,5 mS/cm

[00112] • Um volume de fração do retido foi diluído a 2 volumes com tampão de equilíbrio e concentrado novamente até o volume original.

[00113] • A operação foi repetida mais duas vezes.

[00114] • O pH e a condutividade do permeado foram verificados e se o pH e condutividade da fração do permeado foram de $8,5 \pm 0,1$ e $1,9 \pm 0,2$ mS/cm, respectivamente, a permeado foi enviado para a próxima etapa, de outra forma a etapa de lavagem foi repetida.

pH do permeado = $8,5 \pm 0,1$

condutividade do permeado: $1,9 \pm 0,2$ mS/cm

[00115] • A fração de retido foi coletada e o ultrafiltro foi lavado com três alíquotas de tampão de equilíbrio, coletando e reunindo as lavagens com a fração de retido de modo a ter um volume coletado final em torno de 0,6-1,2 L.

Volume coletado : 0,6-1,2 L

[00116] • Esta fração foi rotulada como :

<<Partida Q>>

[00117] • Amostras de $5 \times 0,5$ mL foram armazenadas a -20°C para IPC.

[00118] • O volume da fração foi medido (ela pode ser armazenada a $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ por não mais do que dois dias).

[00119] • As amostras foram analisadas como a seguir: OD a 280 nm, pH, condutividade e teor de r-hFSH por Imunoteste (DELFI A), e RP-HPLC.

Etapa 1: Troca aniônica em Q Sepharose FF

Equipamento

- [00120] • Coluna cromatográfica XK 50/20
- [00121] • Bomba peristáltica de tipo Masterflex ou equivalente
- [00122] • Sala fria
- [00123] • Monitor de UV (comprimento de trajeto óptico 2,5 mm) equipado com gravador de dois canais (Amersham Biosciences ou equivalente)
- [00124] • Espectrofotômetro UV (Shimadzu ou equivalente)
- [00125] • medidor de pH (Metrohm ou equivalente)
- [00126] • Condutômetro (Metrohm ou equivalente)
- [00127] • Balança (MettlerToledo ou equivalente)
- [00128] • Bomba peristáltica de tipo Masterflex ou equivalente

Materiais

- [00129] • r-hFSH concentrado bruto de etapa de ultrafiltração
- [00130] • Quantidade de partida: 200-400 mg de FSH por DELFIA
- [00131] • Péletes de hidróxido de sódio – (Merck)
- [00132] • Água purificada (Modulab ou equivalente)
- [00133] • Ácido bórico
- [00134] • Tetraborato de sódio decaidratado
- [00135] • Hidróxido de sódio (péletes)
- [00136] • Cloreto de sódio
- [00137] • Ácido acético glacial

Tampões

- [00138] Tampão de equilíbrio: 50 mM de Borato de sódio pH $8,5\pm 0,1$, condutividade $1,9\pm 0,2$ mS/cm
- [00139] Tampão de eluição: 50 mM de Borato de sódio, 0,13M de NaCl pH $8,5\pm 0,1$, condutividade $16\pm 1,5$ mS/cm
- [00140] Solução de extração: 1,5M de NaCl
- [00141] Solução de sanitização 1: 0,1 M de ácido acético

[00142] Solução de sanitização 2: 0,5 M de NaOH

[00143] Solução de armazenamento: 0,01 M de NaOH

Compactação de coluna

[00144] A coluna foi compactada com resina Q Sepharose Fast Flow de acordo com as instruções dos fabricantes. A coluna compactada tinha as seguintes dimensões:

Diâmetro: 5 cm

Altura do leito: 11 cm \pm 10%

Volume do leito: 190 - 240 mL

Procedimento de purificação

[00145] Toda a operação foi realizada a:

[00146] • temperatura: 3-8°C

[00147] • taxa de fluxo linear: 240-280 cm/hora

Sanitização da coluna

[00148] A coluna foi lavada com pelo menos 1 BV de NaOH a 0,5M, então enxaguada com 3 BV de água purificada.

Equilíbrio da coluna

[00149] A coluna foi lavada completamente com 6-7 ou mais BV de tampão de equilíbrio, 50 mM Borato de sódio pH $8,5 \pm 0,1$, condutividade de $1,9 \pm 0,2$ mS/cm.

[00150] O pH e condutividade foram verificados e lavagem foi continuada até os parâmetros do efluente da coluna estarem nos seguintes valores de marcação:

[00151] pH $8,5 \pm 0,1$, condutividade $1,9 \pm 0,2$ mS/cm

Preparação de material de partida

[00152] O r-hFSH concentrado e diafiltrado obtido da etapa de ultrafiltração foi descongelado na quantidade indicada na seção de material.

[00153] O pH e condutividade foram verificados, e amostras foram guardadas para IPC ($5 \times 0,5$ mL).

Carga

[00154] O material de partida foi carregado na coluna equilibrada.

Lavagem

[00155] Quando a carga de amostra estava completa, a coluna foi lavada com 2-3 BV de tampão de equilíbrio. O volume coletado foi registrado, e amostras foram guardadas para IPC 5 x 0,5mL, e a fração foi descartada.

Eluição

[00156] Eluição foi iniciada com 50 mM Borato de sódio, 0,13M NaCl pH 8,5±0,1, condutividade 16±1,5mS/cm. r-hFSH iniciado para eluir após 0,7-1,0 BV desde o início.

[00157] 4,5 BV da fração de eluição foram coletados, mostrando dois picos, de acordo com o perfil cromatográfico mostrado na Figura 2.

[00158] O volume coletado foi registrado, e amostras para IPC foram mantidas (5x 0,5mL). A fração pode ser armazenada a 4°C por não mais do que dois dias.

[00159] Esta fração contém o r-hFSH semi-purificado.

Etapa (2): IMAC em Sepharose ff quelante

Equipamento

- [00160] • Coluna cromatográfica C10/40 (Amersham Biosciences)
- [00161] • Bomba peristáltica tipo miniplus 2 Gylson ou equivalente
- [00162] • Monitor de UV (comprimento trajeto óptico 2,5 mm) equipado com gravador de dois canais (Amersham Biosciences ou equivalente)
- [00163] • Sala fria
- [00164] • Espectrofotômetro UV (Shimadzu ou equivalente)
- [00165] • Medidor de pH (Metrohm ou equivalente)
- [00166] • Condutômetro (Metrohm ou equivalente)
- [00167] • Balança (MettlerToledo ou equivalente)

- [00168] • Bomba peristáltica de tipo Masterflex ou equivalente

Materiais

- [00169] • Post Q Sepharose FF r-hFSH
- [00170] • Péletes de hidróxido de sódio – (Merck)
- [00171] • Água purificada (Modulab ou equivalente)
- [00172] • Ácido bórico
- [00173] • Tetraborato de sódio decahidratado
- [00174] • Hidróxido de sódio (péletes)
- [00175] • Cloreto de sódio
- [00176] • EDTA
- [00177] • Acetato de amônio
- [00178] • Sulfato de cobre
- [00179] • 25% Solução de amônia

Tampões

- [00180] Solução de carga de metal: 0,2M de Sulfato de cobre
- [00181] Água acidulada: 1 mL de ácido acético glacial foi adicionado a 1 L de água purificada sob agitação.
- [00182] Tampão de equilíbrio: 50 mM de Borato de sódio pH $8,25 \pm 0,1$, 0,5M de NaCl
- [00183] Eluição : 0,75 M de Acetato de amônio pH $9,0 \pm 0,1$, condutividade $\pm 0,5$ mS/cm
- [00184] Solução de regeneração: 0,5M de NaCl, 50 mM de EDTA
- [00185] Solução de sanitização: 0,5M de NaOH
- [00186] Solução de armazenamento: 0,01M de NaOH

Compactação de coluna

[00187] A coluna foi compactada com resina quelante Sepharose Fast Flow de acordo com as instruções dos fabricantes. A coluna compactada tinha as seguintes dimensões:

Diâmetro: 10 mm

Altura do leito: $22 \pm 10\%$

Volume do leito: 16 – 20 mL

Procedimento de purificação

[00188] Todas as operações foram realizadas a:

[00189] • temperatura: $5 \pm 3^\circ\text{C}$

[00190] • taxa de fluxo linear: 240-300 cm/hora

Sanitização da coluna

[00191] A coluna foi lavada com pelo menos 1 BV de NaOH a 0,5M, então enxaguada com 3 BV de água purificada.

Carga de coluna

[00192] A coluna foi lavada com 5-6 BV de água acidulada até o pH ser $< 4,5$ (com indicador de pH). A coluna foi então lavada com 3 BV de 0,2M de sulfato de cobre e novamente 4-5 BV de água acidulada até o Valor de absorvância (280 nm) alcançar a linha de base.

Equilíbrio da coluna

[00193] A coluna foi lavada completamente com 6 ou mais BV de tampão de equilíbrio, 50 mM de Fosfato de sódio pH $8,25 \pm 0,1$, 0,5M de NaCl, condutividade 50 ± 5 mS/cm.

[00194] O pH e condutividade foram verificados e lavagem foi continuada se os parâmetros do efluente da coluna estiverem fora dos valores de marcação:

[00195] pH $8,25 \pm 0,1$, condutividade 50 ± 5 mS/cm

Preparação de material de partida

[00196] r-hFSH obtido de etapa Q Sepharose FF foi ajustado a pH a $8,25 \pm 0,1$ por adição de 35% de ácido orto-fosfórico, e condutividade a 50 ± 5 mS/cm por adição de NaCl.

[00197] Amostras foram retiradas para IPC (5x 0,5mL).

Carga

[00198] O material de partida foi carregado na coluna equilibrada como acima.

Lavagem

[00199] Quando a carga de amostra estava completa, a coluna foi lavada com 5-10 BV de tampão de equilíbrio 50 mM fosfato de sódio pH $8,25 \pm 0,1$, 0,5M de NaCl, condutividade 50 ± 5 mS/cm.

[00200] Amostras foram retiradas ($5 \times 0,5$ mL) para IPC e a fração foi descartada.

Eluição

[00201] Eluição foi iniciada com 0,075M de acetato de amônio pH $9,0 \pm 0,1$, condutividade $7,2 \pm 0,5$ mS/cm.

[00202] r-hFSH começou a eluir como um pico principal após 0,5 BV desde o início.

[00203] 5-7 BV foram coletados do pico principal partindo quando o OD em linha aumentou de modo íngreme, aproximadamente após os primeiros 0,5 BV descartados.

[00204] Amostras foram retiradas para (IPC $5 \times 0,5$ mL) e a fração foi armazenada a 3° - 8° C por não mais do que dois dias.

[00205] O perfil de eluição para IMAC é mostrado na Figura 3.

[00206] *Esta fração continha o r-hFSH semipurificado.*

Etapa (2a): Troca aniônica em DEAE Sepharose FF

Equipamento

[00207] • Coluna cromatográfica Vantage L 22/40

[00208] • Bomba peristáltica tipo miniplus 2 Gylson ou equivalente

[00209] • Sala fria

[00210] • Monitor de UV (comprimento trajeto óptico 2,5 mm) equipado com gravador de dois canais (Amersham Biosciences ou equivalente)

[00211] • Espectrofotômetro UV (Shimadzu ou equivalente)

[00212] • Medidor de pH (Metrohm ou equivalente)

[00213] • Condutômetro (Metrohm ou equivalente)

[00214] • Balança (MettlerToledo ou equivalente)

- [00215] • Bomba peristáltica de tipo Masterflex ou equivalente

Materiais

- [00216] • Pós- IMAC r-hFSH
- [00217] • Péletes de hidróxido de sódio – (Merck)
- [00218] • Água purificada (Modulab ou equivalente)
- [00219] • Hidróxido de sódio (péletes)
- [00220] • Cloreto de sódio
- [00221] • Acetato de amônio
- [00222] • 25% Solução de amônia

Tampões

- [00223] Tampão de equilíbrio: 0,11 M de Acetato de amônio pH 8,5±0,1, condutividade ±0,5 mS/cm
- [00224] Solução de regeneração: 1,5M de NaCl
- [00225] Solução de sanitização: 0,5M de NaOH
- [00226] Solução de armazenamento: 0,01M de NaOH

Compactação de coluna

[00227] A coluna foi compactada com resina DEAE Sepharose Fast Flow de acordo com as instruções dos fabricantes. A coluna compactada tinha as seguintes dimensões:

Diâmetro:	22 mm
Altura do leito:	16-17 cm
Volume do leito:	65-70 mL

Procedimento de purificação

- [00228] Toda a operação foi realizada a:
- [00229] • temperatura: 5 ± 3°C
- [00230] • taxa de fluxo linear: 240-300 cm/hora

Sanitização da coluna

[00231] A coluna foi lavada com pelo menos 1 BV de NaOH a 0,5M, e então enxaguada com 3 BV de água purificada.

Equilíbrio da coluna

[00232] A coluna foi lavada com 6 ou mais BV de tampão de equilíbrio, 0,11 M de Acetato de amônio pH $8,5 \pm 0,1$, condutividade $10,2 \pm 0,5$ mS/cm.

[00233] O pH e condutividade foram verificados e lavagem foi continuada se os parâmetros do efluente da coluna estivessem fora dos valores de marcação:

pH $8,5 \pm 0,1$, condutividade $10,5 \pm 0,5$ mS/cm

Preparação de material de partida

[00234] r-hFSH obtido da etapa IMAC foi levado a pH $8,5 \pm 0,1$ por adição de ácido acético glacial, e condutividade a $10,5 \pm 0,5$ mS/cm por adição de água purificada (um volume de água pelo menos é necessário para ajustar a condutividade ao valor de marcação).

[00235] Amostras foram retiradas para IPC ($5 \times 0,5$ mL).

Carga

[00236] O material de partida foi carregado na coluna equilibrada como acima.

Lavagem

[00237] Quando a carga de amostra estava completa, a coluna foi lavada com 3-6 BV de tampão de equilíbrio 0,11 M Acetato de amônio pH $8,5 \pm 0,1$, condutividade $10,2 \pm 0,5$ mS/cm.

[00238] Amostras foram retiradas para IPC ($5 \times 0,5$ mL) e a fração foi armazenada a $+5 \pm 3^\circ\text{C}$ por não mais do que dois dias. O perfil de eluição para DEAE Sepharose FF cromatografia é mostrado na Figura 4.

Etapa (3): Interação hidrofóbica em PHENYL Sepharose FF HS

Equipamento

[00239] • Coluna cromatográfica XK 26/30

[00240] • Bomba peristáltica tipo miniplus 2 Gylson ou equivalente

[00241] • Monitor de UV (comprimento trajeto óptico 2,5 mm) equipado com gravador de dois canais (Amersham Biosciences ou equiva-

lente)

- [00242] • Sala fria
- [00243] • Espectrofotômetro UV (Shimadzu ou equivalente)
- [00244] • medidor de pH (Metrohm ou equivalente)
- [00245] • Condutômetro (Metrohm ou equivalente)
- [00246] • Balança (MettlerToledo ou equivalente)
- [00247] • Bomba peristáltica de tipo Masterflex ou equivalente

Materiais

- [00248] • Pós - DEAE r-hFSH
- [00249] • Péletes de hidróxido de sódio – (Merck)
- [00250] • Água purificada (Modulab ou equivalente)
- [00251] • Hidróxido de sódio (péletes)
- [00252] • Cloreto de sódio
- [00253] • Acetato de amônio
- [00254] • Sulfato de amônio
- [00255] • 25% Solução de amônia

Tampões

- [00256] Tampão de equilíbrio: 50 mM Acetato de amônio, 1M Sulfato de amônio pH 8,25±0,1, condutividade 142±8 mS/cm
- [00257] Tampão de lavagem: 50 mM Acetato de amônio, 0,9M Sulfato de amônio pH 8,25±0,1, condutividade 130±5mS/cm
- [00258] Tampão de eluição: 50 mM Acetato de amônio, 0,25M Sulfato de amônio pH 8,25±0,1, condutividade 50 ±3mS/cm
- [00259] Solução de extração: Água purificada
- [00260] Solução de sanitização: 0,5M NaOH
- [00261] Solução de armazenamento: 0,01M NaOH

Compactação de coluna

- [00262] A coluna foi compactada com resina de Phenyl Sepharose Fast Flow HS de acordo com as instruções dos fabricantes. A coluna

compactada tinha as seguintes dimensões:

Diâmetro:	34 mm
Altura do leito:	14-15 mm
Volume do leito:	125-135 mL

Procedimento de purificação

[00263] Todas as operações foram realizadas a:

[00264] • temperatura: $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

[00265] • taxa de fluxo linear: 240-300 cm/hora

Sanitização da coluna

[00266] A coluna foi lavada com pelo menos 1 BV de NaOH 0,5M , então enxaguada com 3-5 BV de água purificada.

Equilíbrio da coluna

[00267] A coluna foi lavada completamente com 5-6 ou mais BV de tampão de equilíbrio: 50 mM Acetato de amônio, 1M Sulfato de amônio pH $8,25 \pm 0,1$, condutividade 140 ± 8 mS/cm

[00268] O pH e condutividade foram verificados e lavagem foi continuada até os parâmetros do efluente da coluna estar nos seguintes valores de marcação:

[00269] pH $8,25 \pm 0,1$, condutividade 140 ± 8 mS/cm

Preparação de material de partida

[00270] r-hFSH obtido de etapa DEAE etapa foi adicionado com 1 M Sulfato de amônio e levado a pH $8,25 \pm 0,1$ por adição de 25% solução de amônia.

[00271] Amostras foram retiradas para IPC (5x 0,5mL) e a fração foi carregada na coluna PHENYL.

Carga

[00272] O material de partida foi carregado na coluna equilibrada como acima.

Lavagem após carga

[00273] Quando a carga de amostra estava completa, a coluna foi

lavada com 3-6 BV de tampão de equilíbrio: 50 mM Acetato de amônio, 1M Sulfato de amônio pH 8,25±0,1, condutividade 140 ± 5 mS/cm
[00274] Amostras foram retiradas para IPC (5 × 0,5mL) e a fração foi descartada.

Lavagem

[00275] Quando a carga de amostra estava completa, a coluna foi lavada com 3-6 BV de tampão de lavagem 50 mM Acetato de amônio, 0,9M Sulfato de amônio pH 8,25±0,1, condutividade 130±5mS/cm

[00276] Amostras foram retiradas para IPC (5× 0,5mL) e a fração foi descartada.

Eluição

[00277] Eluição foi iniciada com tampão de eluição.

[00278] r-hFSH começou a eluir como um pico principal após 0,5-0,8 BV desde o início. 3-4 BV do pico principal foram coletados partindo quando o Valor de absorbância (280 nm) aumentou, de acordo com o perfil cromatográfico mostrado na Figura 5.

[00279] Amostras foram retiradas para IPC (5× 0,5 mL) e armazenadas em +5 ± 3°C por não mais do que um dia.

Etapa (4): Fase reversa em Source 30 RPC

Equipamento

[00280] • Coluna cromatográfica: Vantage L 22/40

[00281] • Monitor de UV (comprimento trajeto óptico 2,5 mm) equipado com gravador de dois canais (Amersham Biosciences ou equivalente)

[00282] • Bomba peristáltica (Minipulse 2 Gillson ou equivalente)

[00283] • Espectrofotômetro UV (Shimadzu ou equivalente)

[00284] • medidor de pH (Metrohm ou equivalente)

[00285] • Condutômetro (Metrohm ou equivalente)

[00286] • Balança (Mettler Toledo ou equivalente)

Materiais

- [00287] • r-hFSH intermediário após HIC
- [00288] • SOURCE 30 RPC resina (Amersham Biosciences)
- [00289] • Acetato de amônio - Merck
- [00290] • Ácido acético glacial - Merck
- [00291] • Péletes de hidróxido de sódio - Merck -
- [00292] • 50% solução NaOH – J.T. Baker
- [00293] • 25% Solução de amônia - Merck
- [00294] • 2-propanol – Merck
- [00295] • Péletes de hidróxido de sódio – Merck

Tampões

- [00296] Tampão de base: 50 mM Acetato de amônio pH 7,6 ± 0,2, condutividade 6,5 ± 0,5 mS
- [00297] Tampão de equilíbrio: 50 mM Acetato de amônio pH 7,6 ± 0,2, contendo 13% of 2-propanol (V/V)
- [00298] Tampão de eluição: 50 mM Acetato de amônio 7,6 ± 0,2, contendo 20% of 2-propanol (V/V)
- [00299] Solução de regeneração: 50 mM Acetato de amônio 7,6 ± 0,2, contendo 35% of 2-propanol (V/V)
- [00300] Solução de sanitização: 0,5M NaOH
- [00301] Solução de armazenamento: 0,01M NaOH

Compactação de coluna

[00302] A coluna foi compactada com SOURCE 30RPC resina de acordo com as instruções dos fabricantes. A coluna compactada tinha as seguintes dimensões:

Diâmetro:	22 mm
Altura do leito:	13-14 cm
Volume do leito:	49,4-53.2 mL

Procedimento de purificação

Preparação de material de partida

- [00303] Pós- HIC intermediário foi carregado na coluna em 13%

(V/V) de 2-propanol.

Toda a operação foi realizada a:

temperatura: temperatura ambiente (+ 20±5°C)

taxa de fluxo linear: 300-450 cm/hora

Sanitização da coluna

[00304] A coluna foi lavada com pelo menos 1 BV de NaOH 0,5 M e enxaguada com 6 BV de água purificada.

Equilíbrio da coluna

[00305] A coluna foi lavada com 7-10 ou mais BV de tampão de equilíbrio, 50 mM Acetato de amônio pH 7,6 ± 0,2, contendo 13% de 2-propanol (V/V).

Carga

[00306] O material de partida r-hFSH após- HIC preparado como acima foi carregado na coluna.

Lavagem após-carga

[00307] Quando a carga de amostra estava completa, a coluna foi lavada com 7-10 BV de tampão de equilíbrio.

[00308] Amostras foram retiradas para IPC (5 × 0,5 mL), e a fração foi descartada.

Eluição

Eluição foi iniciada com tampão de eluição.

[00309] r-hFSH começou a eluir como um pico principal após 0,5-0,8 BV desde o início. 5-7 BV do pico principal foram coletados partindo quando o valor de absorvância (280 nm) aumentou, de acordo com o perfil de cromatografia mostrado na Figura 6. Após completar a coleta, a solução foi diluída 1: 2 com água purificada para reduzir a porcentagem de 2-propanol em contato com r-hFSH.

[00310] Amostras foram retiradas para IPC (5 x 0,5 mL) e armazenadas em +5 ± 3°C por não mais do que um dia.

[00311] *Esta fração continha r-hFSH purificado.*

Regeneração da coluna

[00312] Após a eluição estar completa, a coluna foi lavada com pelo menos 3 BV de tampão de regeneração.

[00313] Amostras foram retiradas para IPC (5 × 0,5 mL), e a fração foi descartada.

Sanitização

[00314] A coluna foi lavada com pelo menos 1-2 BV de água seguido por 3 BV NaOH 0,5M, o fluxo foi parado 1 hora, e a coluna foi então enxaguada com 6 BV de água purificada.

Armazenamento

[00315] A coluna foi lavada com pelo menos 3 BV de solução de armazenamento, 0,01M NaOH e armazenada até o próximo ciclo.

Etapa (5) ULTRAFILTRAÇÃO EM BRUTO

Equipamento

[00316] • 1 Vivaflow 200 PES, RC ou Hydrosart corte de 5KD (Sartorius)

[00317] • Bomba peristáltica (tipo Masterflex L/S)

[00318] • Espectrofotômetro UV (tipo Shimadzu ou equivalente)

[00319] • medidor de pH (tipo Mettler Toledo ou equivalente)

[00320] • Medidor de condutividade (tipo Metrohm ou equivalente)

Materiais

[00321] • r-hFSH - HIC Eluado

[00322] • Péletes de hidróxido de sódio - Merck (NaOH).

[00323] • Água purificada por Modulab ou equivalente

[00324] • Nitrogênio (pressão operativa: 3 bar) - tipo UPP.

Tampões

[00325] Solução de diafiltração: a ultrafiltração de r-hFSH foi realizada usando água purificada.

[00326] Solução de sanitização: 0,5 M NaOH

[00327] Solução de armazenamento: 0,05 M NaOH

Procedimento

[00328] Todas as operações foram realizadas em uma sala fria ($+5\pm 3^{\circ}\text{C}$).

Ultrafiltração

[00329] A solução de eluado r-hFSH - HIC foi recirculada no sistema Vivaflow e concentrada em um volume inferior a 20 mL.

[00330] A fração de retido foi diluída com 4 volumes de água purificada e concentrada até < 20 mL.

[00331] A etapa de lavagem foi repetida como descrito, 5-7 mais vezes.

[00332] O pH e condutividade do permeado foram de $7.1 \pm 0,2$ e $6,2 \pm 0,5$ mS/cm respectivamente. Se fora destes valores, a etapa de lavagem foi repetida.

[00333] pH do permeado = $7.1 \pm 0,2$ -- condutividade do permeado = $6,2 \pm 0,5$ mS/cm

[00334] A fração retida foi coletada em um volume apropriado para obter uma concentração final de r-hFSH por OD (280 nm) em torno de 0,5-0,7 mg/mL.

[00335] Amostras foram retiradas ($10 \times 0,5$ mL) para análise. Ambas as amostras e as em bruto foram armazenadas a -20°C .

Etapa (6) ETAPA de nanofiltração para remoção de vírus

Materiais e Equipamento

[00336] • solução de r-hFSH intermediário (após DEAE ou após RPC ultrafiltrado);

[00337] • Pré- filtros de tamanho de 47 mm tipo Fluorodine II FTK-DJL (Pall) ou VVLP $0,1\mu$ (Millipore);

[00338] • Filtros de 47 mm de tamanho tipo NFP (Millipore) ou DV20 (Pall);

[00339] • Água purificada;

[00340] • Indicadores de papel de pH;

- [00341] • Hidróxido de sódio;
- [00342] • Fonte regulada de nitrogênio;
- [00343] • Sistema de filtração de aço inoxidável completo (Millipore);
- [00344] • Tubo de tygon e Silicons.

Tampões

[00345] Solução de sanitização: 0,5 M NaOH

Procedimento

[00346] Todas as operações foram realizadas a temperatura ambiente ($+23 \pm 3^{\circ}\text{C}$)

Nanofiltração

[00347] O sistema foi carregado após DEAE ou ultrafiltrado após RPC rFSH, pré-filtrado em filtros de $0,1\mu$. No começo da filtração, o nitrogênio foi aberto até uma pressão inicial de 0,5 bar e a válvula de ventilação colocada em um suporte de disco foi aberta a fim de purgar o sistema.

[00348] Logo que a primeira gota de solução apareceu, a válvula de ventilação do suporte do disco foi fechada e a pressão de nitrogênio foi elevada a 2,3 – 2,8 bar.

[00349] A pressão de nitrogênio foi mantida a 2,3 – 2,8 e a solução foi filtrada. As condições de operação são resumidas abaixo:

Parâmetro	Faixa
Amostra	Após- DEAE ou após - RPC rFSH ultra filtrado
pressão de nitrogênio	2,3-2,7 bar
taxa de fluxo (mL/min)	0,1-0,3 mL/min com filtro Pall em após DEAE 0,3-0,6 mL/min com filtro Millipore em após- DEAE 0,1-0,2 mL/min com filtro Pall em após – RPC ultrafiltrado 1-1,5 mL/min com filtro Millipore em após – RPC ultrafiltrado

Atividade biológica de amostras

[00350] A atividade biológica de rhFSH purificado foi medida usando o método de ganho de peso ovariano de Steelman- Pohley. A atividade específica foi calculada usando a atividade biológica dividida pelo teor de proteína, como determinado por absorvância a 280 nm (considerando que $\epsilon = 9,95 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), e também usando a atividade biológica dividida pelo teor de proteína como determinado pelo método de Lowry. A atividade específica do rhFSH bruto purificado é mostrada na tabela 1.

TABELA 1. Atividade específica de rhFSH bruto purificado da invenção

Análise	Amostra
concentração de proteína por OD (mg/mL)	0,64
Atividade específica (atividade biológica/OD)	8876 UI/mg
concentração de proteína por Lowry (mg/mL)	0,75
atividade específica (atividade biológica /Lowry)	7594 UI/mg

REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificar FSH humano recombinante ou uma variante de FSH, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de submeter FSH a:

(1) cromatografia de troca iônica realizada com uma resina de troca aniônica forte;

(2) cromatografia de íon metálico imobilizado;

(2a) cromatografia de troca iônica realizada usando uma resina de troca aniônica fraca;

(3) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC); e

(4) cromatografia de fase reversa.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a resina de troca aniônica é Q Sepharose FF, ou uma resina apresentando propriedades similares.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de troca iônica (1) é realizada usando tampão borato como eluente.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o tampão borato está em um pH de 8,5.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de íon metálico imobilizado é realizada com uma resina apresentando grupos quelantes tridentados.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que os grupos quelantes são ácido iminodiacético.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de íon metálico imobilizado é realizada com Sepharose FF quelante, ou uma resina apresentando propriedades similares.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 7, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de íon metálico imobilizado é realizada com um íon metálico selecionado dentre Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Co^{2+} .

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de íon metálico imobilizado é realizada com Cu^{2+} .

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de íon metálico imobilizado é realizada usando acetato de amônio como eluente.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o tampão de acetato de amônio apresenta um pH de 9.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) é realizada usando Phenyl Sepharose FF HS, ou uma resina apresentando características similares.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de interação hidrofóbica é realizada usando acetato de amônio (50 mM)/sulfato de amônio (0.25 M) como eluente.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a resina de troca aniônica fraca é uma resina DEAE Sepharose FF, ou uma resina apresentando propriedades similares.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de fase reversa é realizada usando Source 30 RPC como resina, ou uma resina apresentando características similares.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de fase reversa é realizada usando acetato de amônio (50 mM, pH de 7,6) com 20% (v/v) 2-propanol.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de ultrafiltração (5), realizada após a etapa de cromatografia de fase reversa.

18. Método para purificar FSH recombinante humano, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de submeter FSH a:

(0) ultrafiltração;

(1) uma cromatografia de troca iônica em Q Sepharose FF em 50 mM borato, em 0,13 M NaCl, pH de 8,5 como eluente;

(2) submeter o eluado da etapa (1) a uma etapa de cromatografia de afinidade de íon metálico imobilizado em Sepharose ff quelante, com Cu^{++} como íon metálico, e em 0,75 M acetato de amônio pH de 9 como eluente;

(2a) submeter o eluado da etapa (2) a uma etapa de uma cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF, em 0,11 M acetato de amônio, pH de 8,5 como eluente;

(3) submeter o eluado da etapa (2a) a uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose FF HS em 50 mM acetato de amônio, em 0,25 M sulfato de amônio, pH de 8,25 como eluente;

(4) submeter o eluado da etapa (3) a uma etapa de cromatografia de fase reversa em Source 30 RPC, em 50 mM acetato de amônio, pH de 7,6, em 20% de 2-propanol (v/v);

(5) submeter o eluado da etapa (4) a uma etapa de ultrafiltração; e

(6) submeter o retentado da etapa (5) a uma etapa de nanofiltração.

Fig. 1 Fluxograma do processo de purificação de r-hFSH

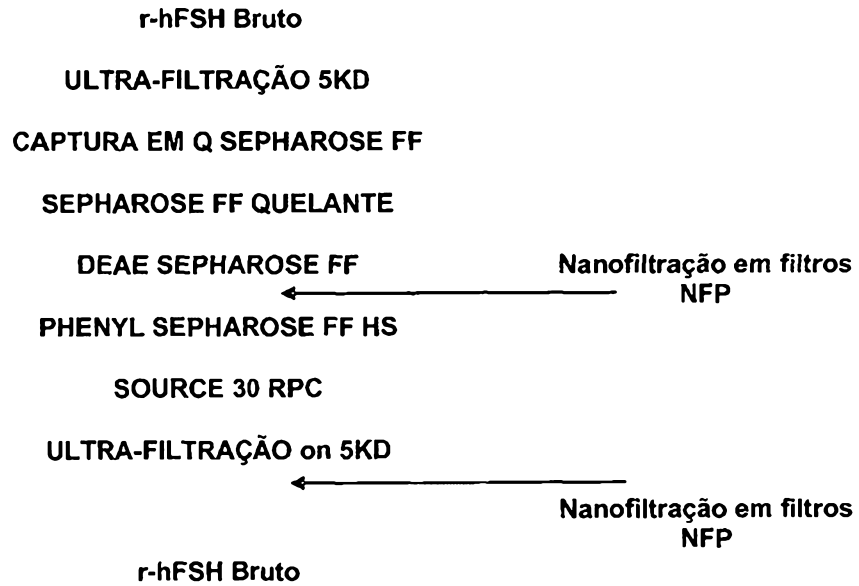


Fig.4 Perfil cromatográfico preparativo de etapa DEAE

