

Métodos de purificación y/o inactivación viral

Handwritten marks: a large 'X' and the number '4'.

La presente invención se relaciona con métodos de purificación de proteínas (o productos proteínicos) y/o métodos de desactivación viral de proteínas (o productos proteínicos). La presente invención se relaciona con métodos de purificación de glucoproteínas (o productos glucoproteínicos) y/o métodos de desactivación viral de glucoproteínas (o productos glucoproteínicos). Las proteínas/glucoproteínas pueden ser, por ejemplo, glucoproteínas recombinantes como FSH, hCG o LH, producidas en células huésped. Las proteínas/glucoproteínas pueden ser derivadas de la orina.

Muchas glucoproteínas se usan con fines terapéuticos. Por ejemplo, las gonadotropinas son una clase de glucoproteínas que se usan en el tratamiento de la infertilidad. Las gonadotropinas son un grupo de hormonas glucoproteínicas heterodiméricas que regulan la función gonadal en machos y hembras. Incluyen hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG).

La FSH y la hCG extraídas de la orina de mujeres embarazadas y postmenopáusicas se han usado para muchos años en el tratamiento de la infertilidad. La producción de FSH y hCG extraídas de la orina involucra la recogida y el procesamiento de grandes cantidades de orina.

Como una alternativa a los productos derivados de la orina, se dispone de versiones recombinantes de FSH y hCG. Los productos hoy aprobados (Gonal-F, Ovitrelle de Merck Serono; Puregon de MSD) son obtenidos (expresados) en células de ovario de hámster chino (CHO).

Los presentes Solicitantes han desarrollado una FSH recombinante y una hCG recombinante, ambas las cuales se expresan en una línea celular PER.C6®. La el producto FSH derivado de la línea celular PER.C6®, y los métodos para su producción, son revelados en las solicitudes Internacionales de patente Nos. PCT/GB2009/000978 (publicada como WO2009/127826A), y PCT/EP2012/065507 (publicada como WO2013/020996). Este producto (FE999049) tiene ensayos clínicos de Fase III ya terminados en Europa. El producto de hCG recombinante derivado de la línea celular PER.C6®, y un método para su producción, son revelados en PCT/GB2010/001854 (publicada como WO2011/042688).

Los presentes Solicitantes han desarrollado técnicas que se pueden usar para la purificación de p.ej., FSH recombinante y hCG recombinante producidas en líneas celulares de mamíferos (p.ej., la FSH recombinante revelada en WO2009/127826A y WO2013/020996, y la hCG recombinante revelada en WO2011/042688).

De acuerdo con la presente invención en un primer aspecto se proporciona un método de purificación de una proteína [p.ej., una glucoproteína, p.ej., una glucoproteína recombinante, una gonadotropina (p.ej., recombinante), una FSH, hCG o LH (p.ej., recombinante), el cual método comprende un paso de tratar la proteína [p.ej., una glucoproteína, p.ej., una glucoproteína recombinante, una gonadotropina (p.ej., recombinante), una FSH, hCG o LH (p.ej., recombinante) con una combinación de ácido caprílico y etanol.

5

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

El paso de tratar la glucoproteína con una combinación de ácido caprílico y etanol puede tener lugar a pH ácido, por ejemplo, a pH 2 a pH 6,5, por ejemplo, pH 3 a pH 6,5, por ejemplo, pH 4 a pH 6 (por ejemplo, pH 5,5 $\pm$ 0.1) de preferencia pH 4,5 a pH 5,5]. El uso de condición ácida (p.ej., pH 4 –pH 6) se debe a la actividad del ácido caprílico. El ácido caprílico puede inactivar virus encapsulados perturbando la membrana del virus; esto es habilitado por la forma no cargada del ácido caprílico, la cual puede penetrar la membrana hidrofóbica del virus. El ácido caprílico no está cargado a un pH que es cercano a su pKa (pH 4,9). A un Δ pH de 1 unidad arriba ($\sim$ pH 5,9), 100% de las moléculas de ácido caprílico están cargadas negativamente y por ello son menos eficientes para la inactivación viral.

La proteína puede ser una proteína recombinante o una proteína derivada de la orina. La proteína puede ser una glucoproteína. La proteína/glucoproteína puede ser un gonadotropina, por ejemplo, FSH, hCG o LH. La glucoproteína puede ser una glucoproteína recombinante, p.ej., una gonadotropina recombinante, p.ej., FSH, hCG o LH recombinantes. De preferencia la proteína/glucoproteína es una glucoproteína recombinante (p.ej., gonadotropina recombinante, p.ej., FSH, hCG o LH recombinantes) producidas en una célula (línea celular) por un método que comprende cultivar la célula (línea celular) en un medio apropiado y cosechar la glucoproteína recombinante de la mencionada célula (línea celular) y/o el mencionado medio (p.ej., cosechar la proteína recombinante del sobrenadante del cultivo celular). La célula (línea celular) pueden ser una célula de mamífero (línea celular), por ejemplo, una célula CHO (línea), una célula PER.C6® (línea), una célula HEK293 (línea), una célula HT1080 (línea), una célula COS (línea), una célula NOS (línea), una célula SP20 (línea), etc... De preferencia la célula (línea celular) es una célula PER.C6® (línea).

Las glucoproteínas (gonadotropinas, FSH, hCG, LH etc.), ya sean urinarias o recombinantes, suelen estar en la forma de una solución/suspensión en un medio. La glucoproteína puede estar presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas, como es bien conocido en el estado de la técnica. Aquí los términos proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc., cubren una solución o suspensión que comprende la proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc. Aquí los términos proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc., cubren una solución o suspensión que comprende la proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc., que se caracteriza porque la proteína, glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc. se encuentra presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas. Así las cosas, el término FSH cubre una solución o suspensión que comprende FSH (p.ej., que se caracteriza porque la FSH se encuentra presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas).

Aquí, la frase "tratar la proteína, (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc.) con una combinación de ácido caprílico y etanol" significa la aplicación tanto de ácido caprílico como de etanol a la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc.) de tal manera que la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc.) es expuesta tanto a ácido caprílico como a etanol al mismo tiempo. Así pues, esta frase cubre técnicas que se caracterizan porque el ácido caprílico y etanol son adicionados, bien sea como una mezcla, o como dos reactivos separados, a una solución de la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc.), de manera que la solución se convierte en una mezcla de ácido caprílico, etanol y la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc.); esta frase también cubre otras técnicas en las cuales tanto el ácido caprílico como el etanol actúan sobre la proteína (glucoproteína, gonadotropina, FSH, hCG, LH etc.) al mismo tiempo.

Los Solicitantes de manera sorprendente han encontrado que tratar una solución que contiene proteína/glucoproteína recombinante (p.ej., FSH recombinante, hCG recombinante) con etanol y ácido caprílico, por ejemplo, una combinación de 20 mM de ácido caprílico/30% de etanol, a pH ácido, puede conducir a desnaturalizar ciertos virus (causar su inactivación) y/o precipitación de otros virus y proteínas de la célula huésped (impurezas). La solución entonces puede ser centrifugada o filtrada (para eliminar los virus precipitados y/o las proteínas de la célula huésped, p.ej., usando un filtro de profundidad como un filtro de vidrio), de tal manera que el sobrenadante incluye glucoproteína purificada (p.ej., FSH recombinante, hCG recombinante) para su ulterior procesamiento y uso. Los Solicitantes han encontrado que el tratamiento de una solución que contiene glucoproteína recombinante (p.ej., FSH recombinante, hCG recombinante) con etanol y ácido caprílico puede (i) inactivar virus encapsulados; y/o (ii) depurar virus no encapsulados por precipitación (el virus precipitado puede entonces ser eliminado por un paso de centrifugación o filtración posterior como, por p.ej., filtro de fibra de vidrio); y/o (iii) remover proteínas relacionadas con el huésped por precipitación (las proteínas relacionadas con el huésped precipitadas pueden entonces ser eliminadas por un paso posterior de centrifugación o filtración como, por p.ej., filtro de fibra de vidrio). Este tratamiento y proceso de filtración relativamente simple proporciona una notable eliminación de impurezas (se elimina 64% a 79% de las impurezas relacionadas con el huésped en este proceso), con mínima pérdida del producto glucoproteína (es decir, alto rendimiento).

El uso de ácido caprílico y etanol (p.ej., en la purificación/inactivación viral de FSH recombinante y/o hCG recombinante) tiene otras ventajas. Primero, la combinación de ácido caprílico y etanol puede acortar el proceso de purificación porque el paso único puede tener una función dual: Inactivación y precipitación viral, así como precipitación de proteínas de la célula huésped. Segundo, como se describió arriba, el ácido caprílico es más activo con respecto a la inactivación viral a pH ~4,9, pero este pH bajo en teoría podría dañar el producto de FSH recombinante (por disociación de la molécula, etc.). De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach, a pH 5,5 cerca de 20% del CA no está cargado, lo cual proporciona un buen balance de inactivación viral con menor riesgo de daño de la FSH recombinante; la adición de EtOH (p.ej., 30% de EtOH) compensa la pérdida de la actividad del ácido caprílico en estas condiciones, que son menos nocivas para la proteína. Por último, la combinación de ácido

A
7

caprílico/EtOH permite el uso de una concentración más baja de EtOH (p.ej., 30%), lo cual es de suma importancia en el proceso de manufactura, por razones de seguridad.

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

El método puede comprender tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico en incubación durante 1 minuto a 6 h a una temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación (p.ej., para inactivación viral, con precipitación observada), por ejemplo, tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico en incubación durante 0,5 h a 1 h a una temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación (p.ej., para inactivación viral, con precipitación observada). El método puede comprender tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico a una temperatura de $4^{\circ}\text{--}8^{\circ}\text{C}$ para incubación durante 1 minuto a 32 h, sin agitación (este paso puede continuar/permitir la precipitación de las proteínas de la célula huésped (HCP) y virus no encapsulados), por ejemplo, tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico a una temperatura de $4^{\circ}\text{--}8^{\circ}\text{C}$ para incubación durante 14 h a 16 h, sin agitación (este paso puede continuar/permitir la precipitación de HCP y virus no encapsulados). En un ejemplo preferido el método comprende tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico en incubación durante 0,5 h a 1 h a una temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación, seguido de reducción a una temperatura de $4^{\circ}\text{--}8^{\circ}\text{C}$ y posterior incubación durante 16 ± 2 horas, por ejemplo, 14 h a 16 h, sin agitación.

El método puede comprender tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico durante un tiempo de $1\text{ h}\pm 10\text{ min}$ a un pH de $5,5\pm 0,1$ y una temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$.

El método puede comprender un paso adicional de centrifugar o filtrar la (solución de) proteína (glucoproteína) luego del tratamiento con ácido caprílico y etanol (p.ej., a través de un filtro de profundidad, p.ej., un filtro de fibra de vidrio).

El método puede comprender un paso adicional de concentrar la (solución) proteína (glucoproteína) a la concentración deseada (de proteína/glucoproteína) y/u otros pasos de purificación/formulación (p.ej., posteriores).

De acuerdo con la presente invención en un aspecto adicional se proporciona un método de inactivación viral en una proteína [p.ej., una glucoproteína, p.ej., una glucoproteína recombinante, una gonadotropina (p.ej., recombinante), una FSH, hCG o LH (p.ej., recombinante)], el cual método comprende un paso de tratar la proteína [p.ej., una

glucoproteína, p.ej., una glucoproteína recombinante, una gonadotropina (p.ej., recombinante), una FSH, hCG o LH (p.ej., recombinante) con una combinación de ácido caprílico y etanol.

El método puede comprender tratar una solución de la glucoproteína [p.ej., en agua,

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

10

El paso de tratar la glucoproteína con una combinación de ácido caprílico y etanol puede tener lugar a pH ácido, por ejemplo, a pH 2 a pH 6,5, por ejemplo, pH 3 a pH 6,5, por ejemplo, pH 4 a pH 6 (por ejemplo, pH $5,5 \pm 0,1$), de preferencia pH 4,5 a pH 5,5]. El uso de la condición ácida (p.ej., pH 4 –pH 6) se debe a la actividad del ácido caprílico. El ácido caprílico puede inactivar

15 virus encapsulados perturbando la membrana del virus; esto es habilitado por la forma no cargada de ácido caprílico, el cual puede penetrar la membrana hidrofóbica del virus. El ácido caprílico no está cargado a un pH que es cercano a su pKa (pH 4,9). A un Δ pH de 1 unidad arriba ($\sim$ pH 5,9), 100% de las moléculas de ácido caprílico están negativamente cargadas y por ello son menos eficientes para la inactivación viral.

20

La concentración de ácido caprílico puede ser de 10 mM a 30 mM de ácido caprílico, por ejemplo, 18 mM a 25 mM de ácido caprílico, por ejemplo, 19mM a 23 mM de ácido caprílico, por ejemplo, 20 mM de ácido caprílico. La concentración de EtOH puede ser de 20% a 50% de EtOH, por ejemplo, 25% a 50% de EtOH, por ejemplo, 30% a 50% de EtOH, por ejemplo, 30%

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

El método puede comprender tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico en

30

incubación durante 1 minuto a 6 h a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación, por ejemplo, tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico en incubación durante 0,5 h a 1h a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación. El método puede comprender tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico a una temperatura de $4^\circ\text{--}8^\circ\text{C}$ en incubación durante 1 minuto a 32 h, sin agitación, por ejemplo, tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido

35 caprílico a una temperatura de $4^\circ\text{--}8^\circ\text{C}$ para incubación durante 14 h a 16 h, sin agitación. En un ejemplo preferido el método comprende tratar la glucoproteína con etanol y ácido caprílico en incubación durante 0,5 h a 1h a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación, seguido de reducción a una temperatura de $4^\circ\text{--}8^\circ\text{C}$ y posterior incubación durante 14h a 16 h, sin agitación.

40

El método puede comprender tratar la proteína (glucoproteína) con etanol y ácido caprílico durante un tiempo de $1\text{h} \pm 10\text{min}$ a un pH de $5,5 \pm 0,1$ y una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

El método puede comprender un paso adicional de centrifugar o filtrar la (solución) proteína (glucoproteína) después del tratamiento con ácido caprílico y etanol (p.ej., a través de un filtro de fibra de vidrio).

- 5 El método puede comprender un paso adicional de concentrar la (solución) proteína (glucoproteína) a la concentración deseada (de proteína/glucoproteína) y/u otros pasos (p.ej., posteriores) de purificación/formulación.

- 10 La proteína puede ser una proteína recombinante o una proteína derivada de la orina. La proteína puede ser una glucoproteína. La proteína/glucoproteína puede ser un gonadotropina como, por ejemplo, FSH, hCG o LH. La proteína/glucoproteína puede ser una glucoproteína recombinante, p.ej., una gonadotropina recombinante, p.ej., FSH, hCG o LH recombinantes. De preferencia la proteína/glucoproteína es una glucoproteína recombinante (p.ej., gonadotropina recombinante, p.ej., FSH, hCG o LH recombinantes) producida en una célula (línea celular) por
- 15 un método que comprende cultivar la célula (línea celular) en un medio apropiado y cosechar la glucoproteína recombinante de la mencionada célula (línea celular) y/o el mencionado medio (p.ej., cosechar la proteína recombinante del sobrenadante del cultivo celular). La célula (línea celular) pueden ser una célula de mamífero (línea celular), por ejemplo, una célula CHO (línea), una célula PER.C6® (línea), una célula HEK293 (línea), una célula HT1080 (línea), una célula
- 20 COS (línea), una célula NOS (línea), una célula SP20 (línea) etc. De preferencia la célula (línea celular) es una célula PER.C6® (línea).

- De acuerdo con la presente invención en un aspecto adicional se proporciona una proteína que ha sido purificada y/o viralmente inactivada por un método como el descrito arriba. La proteína
- 25 puede ser una proteína recombinante o una proteína derivada de la orina. La proteína puede ser una glucoproteína. La glucoproteína puede ser una glucoproteína recombinante, p.ej., una gonadotropina recombinante, p.ej., FSH, hCG o LH recombinantes. De preferencia la glucoproteína es una glucoproteína recombinante (p.ej., gonadotropina recombinante, p.ej., FSH, hCG o LH recombinantes) producida en una célula (línea celular) por un método que
- 30 comprende cultivar la célula (línea celular) en un medio apropiado y cosechar la glucoproteína recombinante de la mencionada célula (línea celular) y/o el mencionado medio (p.ej., cosechar la proteína recombinante del sobrenadante del cultivo celular). La célula (línea celular) puede ser una célula de mamífero (línea celular), por ejemplo, una célula CHO (línea), una célula PER.C6® (línea), una célula HEK293 (línea), una célula HT1080 (línea), una célula COS (línea), una célula
- 35 NOS (línea), una célula SP20 (línea) etc. De preferencia la célula (línea celular) es una célula PER.C6® (línea).

- De acuerdo con la presente invención en un aspecto adicional se proporciona una composición farmacéutica [p.ej., para (usar en) el tratamiento de la infertilidad] que comprende una proteína
- 40 (p.ej., una glucoproteína, p.ej., una glucoproteína recombinante, p.ej., FSH recombinante, hCG recombinante) que ha sido purificada y/o viralmente inactivada por un método como el descrito arriba.

10

De acuerdo con la presente invención en un aspecto adicional se proporciona un método de tratamiento (p.ej., de la infertilidad) que comprende un paso de administración a un paciente que la necesita una composición farmacéutica que comprende una proteína (p.ej., una glucoproteína, p.ej., una glucoproteína recombinante, p.ej., FSH recombinante, hCG recombinante) que ha sido purificada y/o viralmente inactivada por un método como el descrito arriba.

El tratamiento de la infertilidad puede comprender tecnologías de reproducción asistida (TRA), ovulación inducción o inseminación intrauterina (IUI). La composición farmacéutica se puede usar, por ejemplo, en indicaciones médicas en las cuales se usan preparaciones conocidas de FSH, LH, hCG.

El producto o composición puede formularse en composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de medicamentos como, p.ej., oral, rectal, parenteral, transdérmica (p.ej., tecnología de parches), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, pomadas o gotas) o como un aerosol bucal o nasal. Una composición típica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, como solución acuosa, excipientes no tóxicos, incluidas sales y preservativos, amortiguadores y similares, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences 15ª edición (Matt Publishing Company, 1975), páginas 1405 a 1412 y 1461 – 87, y el formulario nacional XIV 14ª edición (American Pharmaceutical Association, 1975), entre otros.

Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticos, diluyentes adecuados acuoso y no acuosos, solventes o vehículos incluyen agua, etanol, polioles (como glicerol, propileno glicol, polietilenglicol, y similares), carboximetilcelulosa y mezclas apropiadas de los mismos, aceites vegetales (como aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. Las composiciones de la presente invención también pueden contener aditivos como pero sin limitaciones, preservativos, agentes humectantes, agentes emulsionantes, surfactantes y agentes dispersantes. Se pueden incluir agentes antibacterianos y antimicóticos para prevenir el crecimiento de los microbios e incluyen, por ejemplo, m-cresol, alcohol bencílico, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Si se incluye un preservativo, los preferidos son alcohol bencílico, fenol y/o m-cresol; no obstante, el preservativo de ninguna manera está limitado a estos ejemplos. Además, puede ser deseable incluir agentes isotónicos como azúcares, cloruro de sodio, y similares. El producto o la composición además pueden comprender una sal que comprende un catión de metal alcalino farmacéuticamente aceptable seleccionado de entre el grupo compuesto por sales de Na^+ o K^+ , o una combinación de los mismos. De preferencia la sal es una sal de Na^+ como, por ejemplo, NaCl o Na_2SO_4 .

De preferencia el producto o la composición comprenden una glucoproteína y uno o más de entre Polisorbato 20, L-metionina, fenol, sulfato disódico y amortiguador de fosfato de sodio, sacarosa y amortiguadores de citrato.

Las formulaciones inyectables pueden ser esterilizadas, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizadores en la forma de

composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes del uso. Las formulaciones inyectables pueden suministrarse en cualquier recipiente adecuado como, p.ej., vial, jeringa prellenada, cartuchos de inyección, y similares.

5

La composición puede ser formulada para un solo uso o para múltiples usos (dosis múltiples). Si el producto o composición es formulado para usos múltiples, se prefiere que se incluya un preservativo. Si se incluye un preservativo, los preferidos son alcohol bencílico, fenol y/o m-cresol; no obstante, el preservativo de ninguna manera está limitado a estos ejemplos. El producto o la composición formulados para un solo uso o para usos múltiples además pueden comprender una sal que comprende un catión de metal alcalino farmacéuticamente aceptable seleccionado de entre el grupo compuesto por sales de Na^+ o K^+ , o una combinación de las mismas. De preferencia la sal es una sal de Na^+ como, por ejemplo, NaCl o Na_2SO_4 .

10

15

El producto o la composición pueden ser incluidos en un recipiente como un vial, cartucho prellenado (p.ej., para una sola administración o para usos múltiples) o un dispositivo de inyección como un "lápiz" para p.ej., administración de dosis múltiples.

20

Los viales pueden venir empacados en un empaque blíster u otro medio para mantener la esterilidad. Cualquier producto opcionalmente puede contener instrucciones de uso de las formulaciones de FSH (y p.ej., de hCG si está presente). El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de conformidad con la práctica habitual de la industria. Véase GOODMAN AND GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7ª ed. En una modalidad preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para administración parenteral. Los métodos generales para la preparación de las formulaciones parenterales son conocidos en el estado de la técnica y descritos en REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, supra, páginas 780-820. Las composiciones parenterales pueden ser suministradas formulación líquida o como un sólido para mezclar con un medio estéril inyectable estéril justo antes de la administración.

25

30

En una modalidad especialmente preferida, las composiciones parenterales se suministran en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad posológica.

35

La presente invención ahora será descrita con referencia los dibujos que se anexan en los cuales: la Figura 1 muestra un esquema del proceso de purificación de la FSH recombinante (desactivación viral) de acuerdo con una modalidad de la presente invención; la Figura 2 muestra el patrón del gel tras la estimación cualitativa de la eliminación de las impurezas para varias muestras de FSH tratadas con UF2-AD (ultrafiltración después de diálisis) ejecutadas en PAGE reducido al 12% (electroforesis en gel de poliacrilamida), que se caracteriza porque el carril 1 es marcadores de LMW (bajo peso molecular), el carril 2 es Amortiguador de muestra, el carril 3 es UF2-AD, el carril 4 es UF2-AD + 10 mM de CA, pH 5,5, el carril 5 es UF2-AD + 10 mM de CA, 30% de etanol, pH 5,5, el carril 6 es Amortiguador de muestra, el carril 7 es MW de baja gama, el carril 8 es UF2-AD, el carril 9 es UF2-AD + 20 mM de CA, pH 5,5 y el carril 10 es UF2-AD + 20 mM de CA, 30% de etanol pH 5,5 (véase el Ejemplo 3); y la Figura 3 muestra el patrón del gel

40

tras la estimación cualitativa de la eliminación de las impurezas para varias muestras de hCG tratadas ejecutadas en PAGE reducido al 12% (electroforesis en gel de poliacrilamida), que se caracteriza porque el carril 1 es marcadores de LMW (bajo peso molecular), el carril 2 es hCG que contiene Cosecha-AD, el carril 3 es NR- No relevante, el carril 4 es sobrenadante de [Cosecha-AD + 15mM C.A pH 5,0], y el carril 5 es sobrenadante de [Cosecha-AD + 20mM C.A + 10% de etanol pH 5,0], véase el Ejemplo 4.

Ejemplo 1

La Figura 1 muestra un panorama del proceso completo de purificación de la FSH recombinante.

Como se puede ver en la Figura 1, la FSH recombinante es expresada en una línea celular PER.C6® modificada genéticamente por los métodos revelados en WO2013/020996 y WO2009/127826A usando un biorreactor.

El biorreactor es sembrado y el crecimiento celular es promovido por métodos conocidos de la persona medianamente versada en la materia técnica correspondiente, y el biorreactor corre en modo de perfusión para producir y cosechar continuamente la FSH recombinante, usando un sistema Hollofibre (ATF4) disponible de Repligen. La siembra de por lo menos 1×10^6 células/mL en un volumen total de 4 ± 1 L tiene lugar en medio 6GRO. La producción tiene lugar en el medio ProPer-1, y la cosecha del biorreactor se recoge en bolsas de polietileno. Así las cosas, en este ejemplo la proteína (glucoproteína) es una glucoproteína recombinante (FSH recombinante) producida en una línea celular PER.C6® por un método que comprende cultivar la línea celular en un medio apropiado (medio ProPer-1) y cosechar la glucoproteína recombinante del medio (cosechando la proteína recombinante del sobrenadante del cultivo celular).

La cosecha del biorreactor es agrupada y sometida al paso de ultrafiltración/diafiltración de 10 kDa (UF1) el cual reduce la concentración de la cosecha, acondiciona la cosecha (en términos de pH y conductividad) para cromatografía Capto-Q, y elimina pigmentos y componentes de bajo peso molecular del medio de cultivo. El retenido es filtrado a través de un filtro de fibra de vidrio de $0,8 + 0,65 \mu\text{m}$ para aclarar la solución de proceso (véase la Fig. 1), y posteriormente sometida a filtración $0,2 \mu\text{m}$ como un control de biocarga. Entonces se usa la cromatografía de intercambio aniónico Capto-Q, por métodos bien conocidos del estado de la técnica, para capturar la FSH recombinante, y eliminar ADN, endotoxinas, proteínas de la célula huésped e impurezas relacionadas con el proceso. Se hace otra filtración de $0,2 \mu\text{m}$ como un control de biocarga.

El eluato filtrado Capto-Q es sometido a un paso adicional de ultrafiltración/diafiltración (UF2) 10 kDa con el propósito de desalinizar y reducir el volumen antes de la purificación/inactivación viral, por métodos bien conocido del estado de la técnica.

Paso CA/EtOH

El retenido de UF2 es una solución de FSH recombinante en un amortiguador (100 mM de acetato de amonio, 30 mM de NaCl, pH 9,3 – pH 9,7). El pH de la solución de proteína primero

se reduce de pH 9,3 - pH 9,7 a pH $6,3 \pm 0,3$ a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación, luego se trata con una combinación de 20 mM de ácido caprílico/30% de etanol (CA/EtOH) seguido de ajuste adicional del pH a 4,5 - 5,6 (el pH es ajustado con 1 M HCl). Después de este tratamiento la solución de proteína permanece en incubación durante 0,5 h a 1 h a $23 \pm 2^\circ$ con agitación (durante este tiempo tiene lugar la inactivación viral y se observa una precipitación blanca en forma de escamas). Al final de la 0,5h-1h, la temperatura de la solución de proteína se reduce a $4^\circ\text{--}8^\circ\text{C}$, y la solución se incuba durante otras 14h a 18h, p.ej., 14 a 16 h, sin agitación (esto permite que la precipitación de HCP y virus no encapsulados continúe). El paso de tratamiento con CA/ETOH tiene una triple actividad: (i) inactivación de virus encapsulados; (ii) depuración de virus no encapsulados por precipitación seguida de paso de clarificación dirigido a remover el precipitado; y (iii) eliminación de las proteínas relacionadas con el huésped por precipitación.

Las impurezas precipitadas (virus no encapsulados y proteína relacionada con el huésped) son removidas por un paso de filtración a través de un filtro de fibra de vidrio de $0,8 + 0,65$ micras, un paso de filtración que también aclara la solución de FSH recombinante.

Se realiza otra filtración de $0,2 \mu\text{m}$ como un control de biocarga.

La solución entonces se somete a cromatografía de intercambio catiónico Sulfopropil-Sepharose (SP-FF) por métodos bien conocidos del estado de la técnica para eliminar el ácido caprílico, el etanol y más proteínas de la célula huésped. Se realiza otra filtración de $0,2 \mu\text{m}$ como un control de biocarga, seguida de un paso adicional de purificación usando Cromatografía de interacción hidrofóbica en Fenil-Sepharose (PS-FF) para eliminar las subunidades de FSH recombinante libre y proteínas de la célula huésped.

El eluato PS es sometido a un tercer paso de paso de ultrafiltración/diafiltración 10 kDa (UF3) para eliminar la sal y acondicionar la solución para el siguiente paso. Se realiza otra filtración de $0,2 \mu\text{m}$ como control de biocarga, antes de cromatografía de adsorción en hidroxipatita (HyA), dirigida a eliminar subunidades disociadas de FSH y heterodímeros básicos, seguido de una filtración adicional de $0,2 \mu\text{m}$ como control de biocarga.

Una cromatografía de intercambio aniónico Q-Sepharose (QS-FF) "paso de pulimiento" se lleva a cabo en modo de aglutinar/eluir para eliminar proteínas del huésped, ADN, endotoxinas y posibles virus. Entonces tiene lugar un control adicional de biocarga por filtración de $0,2 \mu\text{m}$, antes de agrupar los MPs QS y la nanofiltración para eliminar posibles virus. El sobrenadante es sometido a un cuarto paso de ultrafiltración/diafiltración 10 kDa (UF4) para concentrar la FSH recombinante a $0,5$ a $1,1 \text{ mg/ml}$, seguido de la adición de polisorbato 20 a una concentración final de $0,005 \text{ mg/mL}$. Estos son pasos de diálisis y ajuste de amortiguador, los cuales son bien conocidos del estado de la técnica. La FSH recombinante es sometida a un paso final de filtración de $0,2 \mu\text{m}$ antes de dividirla en alícuotas en el empaque primario y almacenar a -20°C hasta el envío.

14

- Los Solicitantes han encontrado que el tratamiento con ácido caprílico/etanol es capaz de reducir marcadamente las impurezas relacionadas con el huésped. De acuerdo con varias ejecuciones de manufactura (los datos no se muestran) 64 a 79% de las impurezas relacionadas con el huésped son removidas por el paso de CA/EtOH (y la posterior filtración con fibra de vidrio) que se describió arriba, en tanto que se recuperó un alto rendimiento de cerca de 90 a 95% de FSH. Esto supone una significativa reducción de las impurezas relacionadas con el huésped que es proporcionada por un simple proceso, con mínima pérdida de producto de proteína (producto de glucoproteína).
- La notable eficiencia de depuración viral de este paso se resume en la Tabla 1, la cual muestra un resumen de los factores de reducción $\log_{10}$, los cuales se encuentran en la región de $\geq 4,25$ a $\geq 5,41$. Un factor de log-reducción (LRF) $\geq 4 \text{ Log}_{10}$ (p.ej., hasta 8 Log_{10} o más) suele considerarse alto, robusto y efectivo.

15

Tabla 1 Resumen de los factores de reducción $\log_{10}$ (rFSH)

Paso del Proceso	Número del estudio	Virus encapsulados		Virus no encapsulados
		MuLV	PRV	EMCV ⁽¹⁾
Tratamiento con Ácido caprílico / Etanol (concentración de proteína 2 mg/mL)	K1/B28/12 K1/B28/13 ⁽¹⁾	$\geq 4,88 / \geq 5,12$	$\geq 5,29 / \geq 5,41$	$\geq 4,42 / \geq 4,47$
Tratamiento con Ácido caprílico / Etanol (concentración de proteína 6 mg/mL)	K1/B28/12 K1/B28/13 ⁽¹⁾	$\geq 4,94 / \geq 4,58$	$\geq 5,11 / \geq 5,29$	$\geq 4,25 / \geq 4,36$

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

20

El anterior ejemplo se relaciona con rFSH, pero la persona medianamente versada en la materia técnica correspondiente apreciará que el proceso [p.ej., el paso de CA/EtOH (y la posterior filtración con fibra de vidrio)] que se describió arriba es fácilmente aplicable a la purificación/inactivación viral de otras proteínas (p.ej., glucoproteínas) como, por ejemplo, rhCG [p.ej., rhCG producida en una línea celular PER.C6® por el método de PCT/GB2010/001854 (publicada como WO2011/042688)].

25

Ejemplo 2

En otro ejemplo de un método de la invención, se proporciona un proceso de purificación/inactivación viral de la hCG. Un método similar al Ejemplo 1 de arriba (menos el paso de cromatografía de intercambio catiónico Sulfopropil-Sepharose (SP-FF)) se usó para la purificación/inactivación viral de rhCG producida en una línea celular PER.C6 por el método de PCT/GB2010/001854 (publicada como WO2011/042688). Los Solicitantes encontraron que la inactivación química por ácido caprílico y etanol a pH ácido, es decir, usando el paso de

30

CA/EtOH descrito en el Ejemplo 1, eliminó cerca de 65% de impurezas distintas de hCG (por precipitación), en tanto que se recuperó un alto rendimiento de cerca de 90% de hCG.

La excelente eficiencia de depuración viral del paso de CA/EtOH en el ejemplo se resume en la Tabla 2. La inactivación viral de MuLV fue efectiva a juzgar por los elevados LRF obtenidos, en un intervalo de $\geq 5,31$ a $\geq 5,48$. Se obtuvieron LRF entre $\geq 2,03$ y $\geq 2,74$ para el tratamiento con CA/EtOH y la eliminación del precipitado.

10

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

Paso del Proceso	Número del Estudio	LRF	
		Virus encapsulados (MuLV)	Virus no encapsulados (PPV)
Tratamiento con Ácido caprílico / Etanol (concentración de proteína 2 mg/mL)	KOP1-B01-15	$\geq 5,43 / \geq 5,31$	$\geq 2,03 / \geq 2,21$
Tratamiento con Ácido caprílico / Etanol (concentración de proteína 6 mg/mL)	KOP1-B01-15	$\geq 5,31 / \geq 5,48$	$\geq 2,68 / \geq 2,74$

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

15

Descripción del experimento:

El intermediario UF2-AD (ultrafiltración después de diálisis) obtenido usando el proceso de purificación de la rFSH del Ejemplo 1 (hasta el paso de CA/EtOH) contenía 100 mM de acetato de amonio + 30 mM de NaCl pH 9,50 $\pm$ 0,20, 11,00 $\pm$ 0,50 mS/cm. Esto se dividió en alícuotas y cada alícuota fue sometida a diferentes condiciones de precipitación para la eliminación de las impurezas (rFSH es soluble en la solución). Las condiciones de precipitación examinadas son las siguientes:

20

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

25

Todas las muestras tratadas fueron incubadas durante 30 min a RT con agitación seguida de incubación adicional durante 30 min sin agitación. Se hizo incubación adicional a 2-8°C durante 16-20 h. Los precipitantes generados fueron eliminados por centrifugación en tanto que los sobrenadantes se recogieron.

5 Parámetros de desempeño del proceso de precipitación:

Recuperación de rFSH

La concentración de rFSH en todas las muestras fueron determinadas por FSH ELISA y los rendimientos de cada muestra después de tratamiento se calcularon y se muestran en la Tabla 3.

Como se ve en la Tabla 3, 96%, 106%, 106% y 98% de la rFSH en las soluciones del proceso UF2-AD se recuperaron tras la precipitación con 10 mM de CA, 10 mM de CA+30% de etanol, 20 mM de CA y 20 mM de CA+ 30% de etanol, respectivamente. Esto indica que la rFSH no se es precipita y permanece soluble en la solución.

Eliminación de las impurezas

Se midió la absorbancia a 280 nm en el UF2-AD sin tratar y en cada uno de los sobrenadantes de los UF2-AD tratados y se calculó la eliminación de las impurezas, como se puede ver en la Tabla 3. Se eliminaron 33,9%, 64,9%, 65,9% y 68,8% de la impureza total A_{280} en el UF2-AD después de precipitación con 10 mM de CA, 10 mM de CA + 30% de etanol, 20mM de CA y 20 mM de CA + 30% de etanol, respectivamente.

El UF2-AD sin tratar y los sobrenadantes de los varios UF2-AD tratados fueron ejecutados en PAGE reducido al 12% (electroforesis en gel de poliacrilamida) para la estimación cualitativa de la eliminación de las impurezas. El patrón del gel se muestra en la Figura 2. El sobrenadante obtenido tras la precipitación por 10 mM de CA + 30% de etanol (carril 5) y 20 mM de CA + 30% de etanol pH 5,5 (carril 10) es sustancialmente más puro que el sobrenadante obtenido tras la precipitación con 10 mM de CA pH 5,5 (carril 4) y 20 mM de CA (carril 9), respectivamente. Esto muestra el efecto sinérgico de la adición de etanol al ácido caprílico en el paso de precipitación.

Conclusiones del experimento:

1. La precipitación de UF2-AD por Etanol y Ácido caprílico dio lugar a producto más puro en comparación con el obtenido usando ácido caprílico solamente.
2. La combinación de Etanol y Ácido caprílico no precipitó la rFSH, la cual permanece soluble en la solución, es decir, que se trata de un paso de purificación e inactivación viral de alto rendimiento.

17
17

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

Sobrenadante de	Absorbancia a 280 nm			rFSH (por ELISA)		
	A ₂₈₀	A ₂₈₀ total	Eliminación (%)	µg/mL	Total µg	Recup. (%)
1. UF2-AD	3,265	32,650	-----	677	6,770	-----
2. UF2-AD + 10 mM de CA, pH 5,5	2,066	21,571	33,9	207,1	6,487	96
3. UF2-AD + 10 mM de CA, 30% de etanol, pH 5,5	0,760	11,457	64,9	158,6	7,173	106
4. UF2-AD + 20 mM de CA, pH 5,5	1,060	11,122	65,9	227,80	7,170	106
5. UF2-AD + 20 mM de CA, 30% de etanol pH 5,5	0,678	10,197	68,8	146,5	6,610	98

Ejemplo 4: Evaluación de las condiciones de precipitación para la eliminación de impurezas en una cosecha que contiene hCG

Descripción del experimento:

Una cosecha que contenía hCG se concentró ~ 40 veces y se dializó con 100 mM de glicina, 50 mM de NaCl pH 9,0, 6 mS/cm de amortiguador por sistema de ultrafiltración 10kDa (UF). Al final de la UF, la solución de proteína recuperada, material de Cosecha-AD (después de diálisis), se fraccionó en alícuotas y cada alícuota fue sometida a diferentes condiciones de precipitación para la eliminación de las impurezas (en tanto que la hCG permanece soluble en la solución). Las condiciones de precipitación examinadas son las siguientes (Tabla 4):

- 1. Cosecha-AD sin tratamiento como control;
- 2. Cosecha-AD + 15mM de CA, pH 5,0
- 3. Cosecha-AD + 20mM de CA, pH 5,0
- 4. Cosecha-AD + 20mM de CA+ 10% de etanol, pH 5,0.

Todas las muestras tratadas fueron incubadas durante 1hr a RT con agitación. Los precipitantes generados fueron eliminados por centrifugación en tanto que los sobrenadantes fueron recogidos.

Parámetros de desempeño del proceso de precipitación:

Recuperación de hCG

Se determinó la concentración de hCG en la cosecha sin tratar y en cada uno de los sobrenadantes de las Cosecha AD tratadas y las recuperaciones se calcularon como se detalla en la Tabla 4.

Eliminación de las impurezas

Se determinó la absorbancia a 280 nm (A₂₈₀) en la cosecha sin tratar y en cada uno de los sobrenadantes de las Cosecha AD tratadas y la eliminación de las impurezas se calculó como se detalla en la Tabla 4.

La cosecha sin tratar y los sobrenadantes de las diversas Cosechas AD tratadas fueron ejecutadas en PAGE reducido al 12% (electroforesis en gel de poliacrilamida) para la estimación cualitativa de la eliminación de las impurezas. El patrón del gel se muestra en la Figura 3.

5

Discusión:

1. Recuperación de hCG: Se recuperaron 91%, 86% y 83% de la hCG en la cosecha-AD después de precipitación con 15mM de CA, 20mM de CA y 20mM de CA+10% de etanol respectivamente.

10

2. Eliminación de las impurezas por A₂₈₀: Se eliminaron 56,6%, 55,8% y 63,0% de la A₂₈₀ total en la cosecha-AD después de precipitación con 15mM de CA, 20mM de CA y 20mM de CA+10% de etanol respectivamente.

15

3. Eliminación de las impurezas por gel: El sobrenadante obtenido tras la precipitación por 20mM de CA + 10% de etanol pH 5,0 (carril 5) es sustancialmente más puro que el sobrenadante obtenido tras la precipitación por 15mM de CA pH 5,0 (carril 4)

Conclusiones:

20

1. La precipitación de una cosecha que contenía hCG adicionada con Etanol y Ácido caprílico dio lugar a un producto más puro en comparación con el obtenido usando Ácido caprílico solamente.

25

30

Tabla 4. Resultados obtenidos de diferentes condiciones de precipitación para la eliminación de las impurezas en una cosecha que contenía hCG

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