

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 641**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/06** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/32** (2006.01)  
**B01D 15/36** (2006.01)  
**G01N 30/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10175706 .0**  
96 Fecha de presentación: **23.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2261252**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2010**

54 Título: **Método para purificar anticuerpos**

30 Prioridad:  
**25.05.2005 EP 05011302**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.10.2012**

73 Titular/es:  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**FALKENSTEIN, ROBERTO;**  
**KOLB, BURKARD y**  
**SMIDA, MARIA**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 389 641 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para purificar anticuerpos

5 **Ámbito de la presente invención**

La presente invención se refiere al campo de la purificación de polipéptidos. Se indica un método para determinar rápidamente las condiciones de purificación.

10 **Antecedentes de la presente invención**

Las proteínas y especialmente las inmunoglobulinas juegan un papel importante en el catálogo médico actual. Para el uso humano cualquier sustancia farmacéutica tiene que cumplir distintos criterios. Para garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos en las personas hay que eliminar, sobre todo, ácidos nucleicos, virus y proteínas de la célula huésped capaces de causar daños graves. Para satisfacer la especificación reglamentaria hay que llevar a cabo una o más etapas de purificación después del proceso de elaboración. Entre otros aspectos, la pureza, la productividad y el rendimiento tienen un papel importante en la definición de un proceso apropiado de purificación.

20 Para la purificación de proteínas hay varios métodos bien establecidos y generalizados, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (p.ej. cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (p.ej. de intercambio catiónico (resinas carboximéticas), de intercambio aniónico (resinas aminoélicas) y de intercambio iónico mixto), la adsorción tioflica (p.ej. con beta-mercaptoetanol u otros ligandos SH), la cromatografía de interacción hidrófoba o de adsorción aromática (p.ej. con fenil-sefarosa, con resinas aza-arenofílicas o con ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad con quelatos metálicos (p.ej. con material de afinidad de Ni(II) y Cu(II)), la cromatografía de exclusión de tamaños y métodos electroforéticos (como la electroforesis de gel, la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

30 Necina, R. y otros, Biotechnol. Bioeng. 60 (1998) 689-698, han informado de la captura de anticuerpos monoclonales humanos, directamente de sobrenadantes de cultivos celulares, mediante agentes de intercambio iónico con gran densidad de carga. En la patente WO 89/05157 se revela un método para purificar inmunoglobulinas, sometiendo directamente el medio de cultivo celular a un tratamiento de intercambio catiónico. Danielsson, A., y otros, J. Immun. Meth. 115 (1988), 79-88, describen una purificación en una sola etapa de anticuerpos IgG a partir de ascitis de ratón.

35 Raweerith, R. y otros (J. Immun. Meth. 282 (2003) 63-72) han empleado una combinación de métodos, a saber: precipitación con ácido caprílico y cromatografía de intercambio iónico, como recurso para fraccionar el anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> equino antiveneno digerido con pepsina. En la patente WO 2003/102132 se revela la combinación de una etapa de purificación por inafinidad y una filtración de flujo tangencial de gran rendimiento, para purificar proteínas. En la patente WO 92/19973 se divulga la combinación de dos etapas de cromatografía de afinidad.

40 Follman, D.K. y Fahrner, R.L. han publicado un análisis factorial de procesos de purificación de anticuerpos con el empleo de tres etapas cromatográficas sin proteína A (J. Chrom. A 1024 (2004) 79-85). Mhatre, R. y otros (J. Chrom. A 707 (1995) 225-231) han investigado la purificación de fragmentos Fab de anticuerpo por cromatografía de intercambio catiónico y elución con gradiente de pH.

45 La patente WO 94/00561 revela anticuerpos monoclonales humanos anti-rhesus y líneas celulares para producirlos. En la patente WO 2004/024866 se expone un método para purificar un polipéptido por cromatografía de intercambio iónico, en el cual se usa un lavado con gradiente para separar el polipéptido deseado de uno o más contaminantes. Schwarz, A. y otros (Laborpraxis 21 (1997) 62-66) informan de la purificación de anticuerpos monoclonales con una columna CM-HyperD.

50 La patente WO 2004/076485 revela un proceso para purificar anticuerpos mediante proteína A y cromatografía de intercambio iónico. En la patente EP 0 530 447 se expone un proceso para purificar anticuerpos monoclonales IgG mediante una combinación de tres etapas cromatográficas. La eliminación de proteína A de las preparaciones de anticuerpo se indica en la patente US 4,983,722.

55 La patente WO 95/16037 revela la purificación de anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-EGF-R/anti-CD3 de hibridoma híbrido, realizada mediante cromatografía de intercambio catiónico con proteína A. La separación de los anticuerpos monoméricos de sus multímeros, usando cromatografía de intercambio iónico, se expone en la patente EP 1 084 136. La patente US 5,429,746 se refiere a la aplicación de la cromatografía de interacción hidrófoba y la cromatografía de combinación para purificar moléculas proteicas de anticuerpo.

60 Ishihara, T. y otros (J. Chrom. 1069 (2005) 99-106) informan sobre la optimización de la purificación de anticuerpos monoclonales mediante cromatografía de intercambio iónico.

65

**Resumen de la presente invención**

La presente invención proporciona un método determinativo de la concentración de una sal para eluir en una sola etapa una inmunoglobulina a partir de un material de cromatografía de intercambio catiónico débil, que comprende las dos siguientes etapas:

a) etapa uno, que comprende las siguientes subetapas

a1) preparar una solución que contenga una inmunoglobulina, una sustancia tampón y opcionalmente una sal;

a2) poner en contacto un primer alícuota de la solución que contiene la inmunoglobulina con un material de intercambio catiónico débil que lleva un grupo carboxílico como sustituyente cargado, en unas condiciones que permitan la fijación de la inmunoglobulina al material de intercambio iónico;

a3) recuperar la inmunoglobulina del material de intercambio catiónico débil, usando una solución que lleve una sustancia tampón y una sal, cuya concentración se incrementa linealmente;

a4) determinar la concentración inicial de la sal, a la cual la primera fracción de la inmunoglobulina empieza a eluirse de la columna de intercambio catiónico débil;

b) etapa dos, que comprende las siguientes subetapas

b1) poner en contacto un segundo alícuota de la solución que contiene la inmunoglobulina con un material de intercambio catiónico débil que lleva un grupo carboxílico como sustituyente cargado, en unas condiciones que permitan la fijación de la inmunoglobulina al material de intercambio catiónico débil;

b2) recuperar la inmunoglobulina del material de intercambio catiónico débil, usando un método de elución en tres etapas donde

i) la concentración de sal en la primera etapa de elución se calcula como la suma de el producto de la concentración inicial de la sal determinada en la etapa a4) y el número total de cationes monovalentes diferentes de hidrógeno indicado en la fórmula molecular de la sal

y

el producto de la concentración de la sal tampón y el número total de cationes monovalentes diferentes de hidrógeno indicado en la fórmula molecular de la sal;

ii) la concentración de sal en la segunda etapa de elución es el producto de la concentración de sal en la primera etapa de elución y un factor entre 1,25 y 1,35;

iii) la concentración de sal en la tercera etapa de elución es el producto de la concentración de sal en la primera etapa de elución y un factor entre 1,50 y 1,70;

donde los factores de las etapas ii) y iii) se determinan de la manera siguiente: a una concentración inicial entre 10 mM y 40 mM los factores son 1,35 y 1,70 respectivamente; a una concentración inicial entre 40 mM y 70 mM los factores son 1,30 y 1,60 respectivamente, y a una concentración inicial superior a 70 mM los factores son 1,25 y 1,50 respectivamente;

b3) determinar a cuál de las tres subetapas del método de elución de la etapa b2) se eluye la inmunoglobulina de la columna de intercambio catiónico débil y definir así la concentración de una sal para eluir una inmunoglobulina de un material de intercambio catiónico débil en una única etapa de elución.

**Descripción detallada de la presente invención**

En esta solicitud de patente se usan estos términos conforme a la siguiente definición:

Tal como se usa en esta solicitud de patente, el término "resina de intercambio iónico" o "material de intercambio iónico" significa una matriz inmóvil de alto peso molecular que lleva sustituyentes cargados, unidos por enlace covalente. Para que la carga global sea neutra se unen, no covalentemente, contraiones a la matriz. El "material de intercambio iónico" tiene la capacidad de cambiar sus contraiones no unidos covalentemente por iones de carga similar de la solución circundante. Según la carga de sus contraiones intercambiables la "resina de intercambio iónico" se denomina resina de intercambio catiónico o resina de intercambio aniónico. Según la naturaleza del grupo cargado (sustituyente) la "resina de intercambio iónico" se denomina, p.ej., resina de ácido sulfónico (S) o resina carboximetilica (CM) en el caso de las resinas de intercambio catiónico. Según la naturaleza química del grupo/sustituyente cargado la "resina de intercambio iónico" se puede clasificar adicionalmente como resina de intercambio iónico fuerte o débil, dependiendo de la fuerza del enlace covalente del sustituyente cargado. Por ejemplo, las resinas de intercambio catiónico fuerte tienen un grupo de ácido sulfónico como sustituyente cargado; las resinas de intercambio catiónico débil tienen un grupo carboxilo, preferentemente un grupo carboximetilo, como sustituyente cargado, y las resinas de intercambio aniónico débil tienen un grupo dietilaminoetilo como sustituyente cargado.

Las resinas de intercambio catiónico pueden adquirirse, bajo diversas marcas, de una serie de compañías, como p.ej. Bio-Rex, Macro-Prep CM (de Laboratorios Biorad, Hercules, CA, USA), intercambiador catiónico débil WCX 2 (de Ciphergen, Fremont, CA, USA), Dowex<sup>®</sup> MAC-3 (de Dow chemical company - separaciones líquidas, Midly, MI, USA), Mustang C (de Pall Corporation, East Hills, NY, USA), Cellulose CM-23, CM-32, CM-52, hyper-D y partisphere (de Whatman plc, Brentford, UK), Amberlite<sup>®</sup> IRC 76, IRC 747, IRC 748, GT 73 (de Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania), CM 1500, CM 3000 (de BioChrom Labs, Terre Haute, IN, USA) y CM-Sepharose<sup>®</sup> Fast Flow (de GE Healthcare - Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania).

Al menos un 90%, más del 90% o más del 95% de los sustituyentes cargados del material de intercambio iónico débil son preferiblemente grupos de ácido carboxílico.

Los términos “elución en una sola etapa” y “elución de gradiente en una sola etapa”, que se usan indistintamente en esta solicitud de patente, indican un método en el cual, p.ej., la concentración de una sustancia eluyente, es decir la causante de la disolución de un compuesto unido a un material, es aumentada o disminuida inmediatamente, es decir directamente desde un valor/nivel inicial hasta un valor/nivel final, es decir, en una etapa única.

Un “polipéptido” es un polímero de restos de aminoácido unidos mediante enlaces peptídicos, ya sea de producción natural o sintética. Los polipéptidos con menos de unos 20 restos de aminoácido se denominan “péptidos”.

Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptido o una cadena polipéptida de más de 100 restos de aminoácido. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a la proteína por la célula en la cual se produce la proteína y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen aquí según las estructuras de la cadena aminoácida; en general no se especifican sustituyentes como los grupos carbohidrato, pero sin embargo pueden estar presentes.

Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina”, que pueden usarse indistintamente en esta solicitud, comprenden al menos dos cadenas polipéptidas ligeras y dos cadenas polipéptidas pesadas. Cada cadena polipéptida pesada y ligera contiene una región variable (en general la porción aminoterminal de la cadena polipéptida) que incluye un dominio de interacción con el antígeno. Cada cadena polipéptida pesada y ligera contiene además una región constante (en general la porción carboxílica terminal) que interviene en la unión del anticuerpo a tejidos huésped o a factores, incluyendo varias células del sistema inmune, algunas células fagocíticas y un primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Las cadenas polipéptidas pesadas y ligeras son normalmente completas y cada una consta esencialmente de una región variable,  $V_L$  o  $V_H$ , y de una región constante completa,  $C_L$  en el caso de una cadena polipéptida ligera o  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y opcionalmente  $C_{H4}$  en el caso de una cadena polipéptida pesada. Las regiones variables del anticuerpo según la presente invención pueden estar injertadas en regiones constantes de otros isotipos. Por ejemplo, un polinucleótido codificador de la región variable de una cadena pesada del isotipo 1 puede estar injertada en un polinucleótido codificador de la región constante de otra clase (o subclase) de cadena pesada.

Tal como se usa aquí, el término “anticuerpo” o “inmunoglobulina” se refiere a una proteína que consta de uno o más polipéptidos codificados esencialmente por genes de anticuerpo. Los genes de anticuerpo reconocidos comprenden distintos genes de región constante, así como innumerables genes de región variable. Pueden existir anticuerpos de varias formas, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como cadenas sencillas (p.ej. Huston, J.S., y otros, PNAS USA 85 (1988) 5879-5883; Bird y otros, Science 242 (1988) 423-426; y, en general, Hood y otros, Immunology, Benjamin N.Y., 2ª edición (1984) y Hunkapiller y Hood, Nature 323 (1986) 15-16). En una forma de ejecución los anticuerpos según la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos, por ejemplo cadenas aisladas pesadas o ligeras, o cadenas pesadas o ligeras formadas solo por regiones constantes o fragmentos de las mismas.

Los métodos cromatográficos generales y su uso son conocidos del especialista en la materia. Véase, por ejemplo, Chromatography, 5ª edición, parte A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed), Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1992); Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, Holanda, (1998); Chromatography Today, Poole, C. F. y Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1991); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J. y otros (ed), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; o Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. y otros (eds), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

El proceso de purificación de las inmunoglobulinas comprende generalmente una parte cromatográfica multietapa. En la primera etapa los polipéptidos y proteínas no inmunoglobulínicas se separan de la fracción inmunoglobulínica mediante una cromatografía de afinidad, p.ej. con proteína A. Después se puede efectuar una cromatografía de intercambio iónico para desunir las clases individuales de inmunoglobulina y eliminar trazas de proteína A coeluida de la primera columna. Finalmente se necesita una tercera etapa cromatográfica para separar las inmunoglobulinas monoméricas de las multiméricas y los fragmentos de la misma clase. A veces la cantidad de agregados es elevada (5% o más) y no es posible separarlos eficientemente en la tercera etapa de purificación, siendo necesarias otras etapas de purificación adicionales.

La producción recombinante de inmunoglobulinas específicas permite prescindir de la etapa de separación de las distintas clases de inmunoglobulina. Por consiguiente el proceso global de purificación de las inmunoglobulinas producidas por recombinación se puede reducir a dos etapas cromatográficas.

El eluato de proteína A acondicionado suele procesarse cromatográficamente a través de un material de intercambio catiónico, a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico de la respectiva proteína inmunoglobulínica.

En la fecha de la presente invención disponíamos en nuestros laboratorios de suficientes cantidades de anticuerpo anti IL-1R (WO 2005/023872) y de Herceptina<sup>®</sup>, un anticuerpo anti-HER2 (WO 99/57134), y por lo tanto la presente

invención se ejemplifica con estas dos inmunoglobulinas. En general la presente invención es igualmente practicable con inmunoglobulinas. Esta descripción es solo a modo de ejemplo y no limita en absoluto la presente invención. Estos ejemplos son una ayuda para la mejor comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones secundarias.

Una "etapa única" indica un proceso en que una o más condiciones, como por ejemplo el pH, la fuerza iónica, la concentración de una sal y/o el flujo de una cromatografía, varían inmediata y repentinamente de un valor inicial a un valor final, es decir las condiciones son cambiadas gradualmente, es decir escalonadamente, al contrario que un cambio continuo.

La presente invención ofrece un método de determinar la concentración de una sal para eluir una inmunoglobulina de un material de cromatografía de intercambio catiónico débil en un proceso de purificación de etapa única, que comprende los dos pasos siguientes:

a) etapa uno, que comprende las siguientes subetapas

a1) preparar una solución que contenga una inmunoglobulina, una sustancia tampón y opcionalmente una sal;

a2) poner en contacto un primer alícuota de la solución que contiene la inmunoglobulina con un material de intercambio catiónico débil que lleva un grupo carboxílico como sustituyente cargado, en unas condiciones que permitan la fijación de la inmunoglobulina al material de intercambio iónico;

a3) recuperar la inmunoglobulina del material de intercambio catiónico débil, usando una solución que lleve una sustancia tampón y una sal, cuya concentración se incrementa linealmente;

a4) determinar la concentración inicial de la sal, a la cual la primera fracción de la inmunoglobulina empieza a eluirse de la columna de intercambio catiónico débil;

b) etapa dos, que comprende las siguientes subetapas

b1) poner en contacto un segundo alícuota de la solución que contiene la inmunoglobulina con un material de intercambio catiónico débil que lleva un grupo carboxílico como sustituyente cargado, en unas condiciones que permitan la fijación de la inmunoglobulina al material de intercambio iónico;

b2) recuperar la inmunoglobulina del material de intercambio catiónico débil, usando un método de elución en tres etapas donde

i) la concentración de sal en la primera etapa de elución se calcula como la suma de

el producto de la concentración inicial de la sal determinada en la etapa a4) y el número total de cationes monovalentes diferentes de hidrógeno indicado en la fórmula molecular de la sal

y

el producto de la concentración de la sal tampón y el número total de cationes monovalentes diferentes de hidrógeno indicado en la fórmula molecular de la sal tampón;

ii) la concentración de sal en la segunda etapa de elución es el producto de la concentración de sal en la primera etapa de elución y un factor entre 1,25 y 1,35;

iii) la concentración de sal en la tercera etapa de elución es el producto de la concentración de sal en la primera etapa de elución y un factor entre 1,50 y 1,70;

donde los factores de las etapas ii) y iii) se determinan de la manera siguiente: a una concentración inicial entre 10 mM y 40 mM los factores son 1,35 y 1,70 respectivamente; a una concentración inicial entre 40 mM y 70 mM los factores son 1,30 y 1,60 respectivamente, y a una concentración inicial superior a 70 mM los factores son 1,25 y 1,50 respectivamente;

b3) determinar a cuál de las tres subetapas del método de elución de la etapa b2) se eluye la inmunoglobulina de la columna de intercambio catiónico débil y definir así la concentración de una sal para eluir una inmunoglobulina de un material de intercambio catiónico débil en un proceso de purificación de etapa única.

Los factores de la etapa b2) definen un intervalo que ha sido determinado experimentalmente. Estos valores no son absolutos, sino meramente un valor pretendido. Una desviación del 10% es sostenible.

La presente invención describe un método de determinar la concentración de una sal para eluir, en una etapa única de elución, una inmunoglobulina fijada a un material de cromatografía de intercambio catiónico débil que posee un grupo carboxílico como sustituyente cargado, a fin de purificar inmunoglobulinas de otras sustancias proteínicas.

La concentración a la cual comienza la elución de la inmunoglobulina de la resina de intercambio catiónico débil aporta la base para la segunda etapa de optimización b), un método de elución en tres etapas. Las concentraciones aproximadas de tampón/sal para la etapa de elución se calculan como sigue:

– la concentración de sal de la primera etapa de elución es igual a la suma de, como primer sumando, el producto de la concentración de la sal a la cual comienza la elución de la columna de intercambio catiónico débil, determinada por el incremento lineal del gradiente salino, y el número total de cationes monovalentes diferentes de hidrógeno indicado en la fórmula molecular de la sal eluyente

y,

como segundo sumando, el producto de la concentración de la sal tampón y el número total de cationes monovalentes diferentes de hidrógeno indicado en la fórmula molecular de la sal tampón;

– la concentración de sal de la segunda etapa de elución es igual al producto de la concentración de la sal de la primera etapa de elución y un factor entre 1,25 y 1,35;

– la concentración de sal de la tercera etapa de elución es igual al producto de la concentración de la sal de la

primera etapa de elución y un factor entre 1,50 y 1,70.

El factor incluido en el cálculo de concentración de las etapas está relacionado con el intervalo entre los niveles de concentración y se ajusta en función de la concentración inicial. A pequeñas concentraciones iniciales, es decir entre 10 mM y 40 mM, los factores son 1,35 y 1,70 respectivamente; a concentraciones iniciales medias entre 40 mM y 70 mM los factores son 1,30 y 1,60 respectivamente; y a concentraciones iniciales superiores a 70 mM los factores son 1,25 y 1,50 respectivamente. Estos factores definen un intervalo que ha sido determinado experimentalmente y no son absolutos, sino meramente un valor pretendido. Una desviación del 10% es sostenible.

La sal tampón debe tenerse en cuenta para el cálculo, porque, como se señala en el ejemplo 3, es posible que la elución de una proteína de la resina de intercambio catiónico pueda tener lugar por un cambio de la concentración de la sal tampón durante la cromatografía. Si la concentración de la sal tampón se mantiene constante durante la cromatografía o es pequeña en comparación con la concentración inicial de la sal eluyente, no hace falta tenerla en cuenta durante el cálculo, a fin de simplificar.

Según una forma de ejecución la sal eluyente no es la sal tampón y la concentración de sal de la etapa b2i) es el producto de la concentración de la sal a la cual comienza la elución de la columna de intercambio catiónico débil, determinada por el incremento lineal del gradiente salino en la etapa a4), y el número total de cationes monovalentes diferentes de hidrógeno indicado en la fórmula molecular de la sal eluyente.

El cálculo se ejemplifica tomando como base el ejemplo 4 con el anticuerpo anti IL-1R. Con una concentración inicial de 15 mM de citrato sódico, determinada como en el ejemplo 3, constituida por una concentración 10 mM de tampón y una aportación 5 mM del gradiente lineal, las tres etapas se calculan del modo siguiente:

- el cálculo de la concentración objeto de la etapa uno da 30 mM ( $5 \text{ mM} \times 2 + 10 \text{ mM} \times 2$ ) de citrato sódico en detalle: 5 mM (concentración inicial) multiplicada por dos (el ácido cítrico es trivalente y se emplea como sal disódica; por tanto en la fórmula molecular hay dos cationes monovalentes diferentes de hidrógeno) más 10 mM (concentración de sal tampón) multiplicada por dos (el ácido cítrico es trivalente y se emplea como sal disódica; por tanto en la fórmula molecular hay dos cationes monovalentes diferentes de hidrógeno)
- el cálculo de la concentración objeto de la etapa dos da 40,5 mM ( $30 \text{ mM} \times 1,35$ ) de citrato sódico en detalle: 30 mM de citrato sódico es la concentración de la etapa uno y se multiplica por 1,35 (la concentración inicial es 15 mM, por tanto se escoge el factor 1,35)
- el cálculo de la concentración objeto de la etapa tres da 51 mM ( $30 \text{ mM} \times 1,70$ ) de citrato sódico en detalle: 30 mM de citrato sódico es la concentración de la etapa uno y se multiplica por 1,70 (la concentración inicial es 15 mM, por tanto se escoge el factor 1,70)

Una forma de ejecución preferida de la presente invención es que el polipéptido sea una inmunoglobulina, con especial preferencia una inmunoglobulina de la clase IgG o IgE.

En una forma de ejecución de la presente invención el valor de pH del material/sustancia tampón es de 3,0 a 10,0, preferiblemente de 3,0 a 7,0, con mayor preferencia de 4,0 a 6,0 y sobre todo de 4,5 a 5,5.

Otro punto preferido de la presente invención es que el método de la misma es aplicable a las inmunoglobulinas que tienen un punto isoeléctrico ( $p_i$ ) de 6,0 o más ( $p_i \geq 6,0$ ) y por tanto una carga neta positiva en el intervalo de pH de 6,0 hasta 14.

El material/sustancia tampón se emplea preferiblemente en un intervalo de concentración entre 5 mM y 100 mM, tal como se ejemplifica.

Para recuperar las inmunoglobulinas fijadas al material de intercambio iónico débil se incrementa la conductividad del tampón/solución, lo cual se puede lograr aumentando la concentración salina del tampón o añadiendo otras sales, llamadas sales de elución, a la solución tampón. Las sales de elución preferidas son citrato sódico, cloruro sódico, sulfato sódico, fosfato sódico, cloruro potásico, sulfato potásico, fosfato potásico, así como otras sales de ácido cítrico y ácido fosfórico y cualquier mezcla de estos componentes. Se prefiere especialmente el citrato sódico, el cloruro sódico, el cloruro potásico y cualquier mezcla de mezclas de ellos.

La concentración de la sal eluyente está comprendida preferiblemente en un intervalo entre 5 mM y 500 mM, con mayor preferencia entre 5 mM y 400 mM, y sobre todo entre 5 mM y 250 mM.

Otra forma de ejecución preferida de la presente invención es el empleo paralelo de la sal eluyente como sustancia tampón, especialmente del ácido cítrico y sus sales o del ácido fosfórico y sus sales.

El método de la presente invención es, preferentemente, un método cromatográfico o discontinuo, con especial preferencia un método que comprende la elución de un lote.

Otra forma más de ejecución preferida de la presente invención es que el método incluye una etapa adicional de purificación de la inmunoglobulina mediante una cromatografía de afinidad con proteína A, antes de la etapa a) del

método.

Los siguientes ejemplos y figuras se ofrecen para ayudar a entender la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones secundarias.

- 5
- Descripción de las figuras**
- Figura 1** Etapa única de elución del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico fuerte SP-sefarosa; las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo receptor no se separan y se eluyen como un solo pico.
- 10 **Figura 2** Etapa única de elución del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-Toyopearl; las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo receptor se separan parcialmente y se eluyen como un pico principal que incluye la forma monomérica de la inmunoglobulina y como un pico secundario que incluye formas monoméricas y agregadas de la inmunoglobulina y la proteína A.
- 15 **Figura 3** Elución de gradiente lineal del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-Toyopearl con citrato sódico a pH 5,0; las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo receptor se separan parcialmente y se eluyen a una concentración inicial de citrato sódico de 15 mM como un pico principal que incluye la forma monomérica de la inmunoglobulina y como un pico secundario que incluye una mezcla de forma monomérica y formas agregadas de la inmunoglobulina y proteína A. El análisis SEC de las dos fracciones está insertado en el cromatograma de intercambio iónico. En el pico principal están ausentes los agregados. En cambio las formas agregadas de la inmunoglobulina están presentes en el segundo tipo.
- 20
- Figura 4** Elución de gradiente en tres etapas del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-Toyopearl con citrato sódico a pH 5,0; las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo receptor se separan parcialmente y se eluyen como un pico principal que incluye la forma monomérica de la inmunoglobulina a una concentración de citrato sódico de 34 mM y como un pico secundario que incluye formas monoméricas y agregadas de la inmunoglobulina y la proteína A, a una concentración de citrato sódico de 44 mM.
- 25
- Figura 5** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa con cloruro sódico 150 mM a pH 5,5; las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo receptor se separan y se eluyen como un pico principal que incluye la forma monomérica de la inmunoglobulina y como un pico secundario que incluye formas monoméricas y agregadas de la inmunoglobulina y la proteína A.
- 30
- Figura 6a** Perfil de elución en CM-sefarosa de flujo rápido; se pueden identificar dos picos: uno principal que corresponde al anticuerpo monomérico anti IL-1R y un pico secundario más pequeño que contiene fundamentalmente agregados y otras impurezas.
- 35 **Figura 6b** Perfil de elución del anticuerpo anti IL-1R en SP-sefarosa de flujo rápido; se puede identificar un pico que contiene inmunoglobulina monomérica, agregados y otras impurezas que no se han sido separadas en esta columna.
- 40 **Figura 7a** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa con cloruro sódico 100 mM a pH 5,5.
- Figura 7b** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa con cloruro sódico 150 mM a pH 5,5.
- 45 **Figura 7c** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa con cloruro sódico 200 mM a pH 5,5.
- Figura 8a** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa con cloruro sódico 150 mM a pH 4,0.
- Figura 8b** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa con cloruro sódico 150 mM a pH 6,0.
- 50 **Figura 9a** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa; cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) del material de partida que muestra ambas formas, monomérica y agregada, de la inmunoglobulina.
- Figura 9b** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa; las formas monomérica y agregada del anticuerpo receptor se separan parcialmente y se eluyen como un pico principal que incluye la forma monomérica de la inmunoglobulina y como un pico secundario que incluye formas monoméricas y agregadas de la inmunoglobulina y otra proteína. En esta figura se representa la cromatografía de exclusión de tamaños del primer pico (principal). Solo se eluye un pico de la columna SEC, que es inmunoglobulina monomérica.
- 55
- Figura 9c** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti IL-1R desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa; las formas monomérica y agregada del anticuerpo receptor se separan parcialmente y se eluyen como un pico principal que incluye la forma monomérica de la inmunoglobulina y como un pico secundario que incluye formas monoméricas y agregadas de la inmunoglobulina y otra proteína. En esta figura se muestra la cromatografía de exclusión de tamaños del segundo pico. En el cromatograma se pueden ver al menos tres picos, correspondientes a las formas monoméricas y agregadas de la inmunoglobulina y a otra proteína.
- 60
- 65

**Figura 10** Etapa única de elución del anticuerpo anti-HER-2 desde la resina de intercambio catiónico fuerte SP-sefarosa; las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo no se separan y se eluyen como un solo pico.

**Figura 11** Elución de gradiente lineal del anticuerpo anti-HER-2 desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa con cloruro sódico en tampón de citrato sódico a pH 5,5; las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo se separan parcialmente y se eluyen con una concentración inicial de cloruro sódico de 80 mM dando un pico principal que incluye la forma monomérica de la inmunoglobulina; en la cola del pico principal se eluye una mezcla de formas monoméricas y agregadas junto con la proteína A.

**Figura 12** Elución de gradiente en tres etapas del anticuerpo anti-HER-2 desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa con cloruro sódico en tampón de citrato sódico a pH 5,5; las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo se separan y eluyen como un pico principal que incluye la forma monomérica de la inmunoglobulina a una concentración de cloruro sódico de 80 mM y como un pico secundario que incluye formas monoméricas y agregadas de la inmunoglobulina y proteína A, a una concentración de cloruro sódico de 100 mM.

**Figura 13** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti-HER-2 desde la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarosa con cloruro sódico 80 mM a pH 5,5; la forma monomérica se eluye exenta de formas agregadas; las formas agregadas se eluyen tras una segunda etapa con cloruro sódico 120 mM dando un segundo pico definido.

**Figura 14** Elución de gradiente en etapa única del anticuerpo anti-HER-2 desde la resina de intercambio catiónico fuerte SP-sefarosa con cloruro sódico 80 mM a pH 5,5; se obtienen dos picos: el pico 1 solo contiene Herceptina<sup>®</sup> monomérica; el pico 2, eluido tras una segunda etapa con cloruro sódico 120 mM, contiene una gran cantidad de Herceptina<sup>®</sup> monomérica y agregados; el rendimiento de Herceptina<sup>®</sup> en su forma monomérica es menor del 60%.

## Parte experimental

### Material:

Un anticuerpo anti IL-1R del tipo inmunoglobulina IgG4 (designado de aquí en adelante como inmunoglobulina, WO 2005/023872) se purificó en una primera etapa mediante una cromatografía de afinidad con proteína A. La elución desde la columna de proteína A se efectuó en condiciones ácidas (tampón de citrato sódico 10 mM, pH 3,0 ± 0,5). Antes de la etapa de filtración, el pH de la fracción que contenía la inmunoglobulina se ajustó a 5,0 con una solución tampón concentrada, p.ej. 1 M, de pH 9,0 (p.ej. tampón de tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) o de fosfato). El eluato de proteína A es una solución que tiene una concentración de proteína entre 5 mg/ml y 15 mg/ml y que está tamponada con citrato sódico. Este material se designa en lo sucesivo como eluato de proteína A acondicionado y se prepara para cargarlo en una resina de intercambio catiónico.

### Ejemplo 1

En este ejemplo comparativo se describe una cromatografía de intercambio iónico con una resina catiónica fuerte y una etapa única de elución.

#### **Condiciones cromatográficas:**

Resina: SP-sefarosa

Flujo: 160 cm/h

Equilibración: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,0

Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Etapas de lavado: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,0

Elución: tampón de citrato sódico 25 mM con cloruro sódico 100 mM, ajustado a pH 5,0

El eluato de proteína A acondicionado se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico fuerte (SP-sefarosa). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de una sola etapa, manteniendo constante el valor del pH y variando la conductividad (aumentándola) por adición de cloruro sódico.

En la figura 1 se representa el cromatograma de elución correspondiente a la cromatografía de intercambio catiónico del anticuerpo anti IL-1R en la resina de intercambio catiónico fuerte SP-sefarosa. La elución consiste en una etapa única de sustitución con cloruro sódico, sin alterar el pH del sistema cromatográfico. Las moléculas monoméricas y agregadas de inmunoglobulina no se separan y por lo tanto con este método no se puede lograr ninguna purificación por reducción del contenido de agregados del eluato, en comparación con el material cargado.

### Ejemplo 2

En este ejemplo se describe una cromatografía de intercambio iónico con una resina de intercambio catiónico débil y

una elución en una sola etapa.

Para conseguir separar las formas monoméricas y agregadas de una inmunoglobulina se empleó una resina de intercambio catiónico débil. Al utilizar este tipo de resina el aumento de conductividad producido por una etapa de elución va acompañado de un desplazamiento particular del pH en la resina (incluso cuando el pH del tampón de elución permanece constante). Este efecto facilita la discriminación, p.ej., entre inmunoglobulinas monoméricas y formas agregadas. Además pueden separarse eficientemente de la fracción monomérica media otras impurezas, tales como trazas de proteínas de la célula huésped o proteína A, sin pérdida importante de rendimiento.

#### 10 **Condiciones cromatográficas:**

Resina: CM-Toyopearl

Flujo: 160 cm/h

Equilibración: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,0

15 Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Lavado: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,0

Elución: tampón de citrato sódico 25 mM con cloruro sódico 100 mM, ajustado a pH 5,0

20 El eluato de proteína A acondicionado se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico débil (CM-Toyopearl). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de una sola etapa, manteniendo constante el valor del pH en la fase móvil y variando la conductividad por adición de cloruro sódico.

25 En la figura 2 se representa el perfil de elución con las mismas condiciones cromatográficas que en el ejemplo 1, pero en este caso con la resina de intercambio catiónico débil CM-Toyopearl. Aquí aparece un segundo pico como hombro del pico principal. Este comportamiento en la separación es diferente del que sucede con una resina de intercambio catiónico fuerte como la SP-sefarosa. El análisis de las fracciones correspondientes al pico principal y al segundo pico mostró un aumento significativo de agregados en la fracción del pico con forma de hombro. En las fracciones del pico principal no se detectaron agregados (véanse también las figuras 9a hasta c).

### **Ejemplo 3**

#### **Optimización del método cromatográfico – primera etapa: gradiente de concentración lineal**

35 Para perfeccionar la cromatografía de intercambio catiónico en un material de intercambio catiónico débil se puso en práctica un procedimiento de optimización que consta de tres etapas:

La primera etapa es una cromatografía donde se usa un gradiente de concentración lineal de la sal del tampón, citrato sódico. Asimismo es posible mantener constante la concentración de la sal del tampón e incorporar una concentración linealmente creciente de una sal que produzca la elución de la inmunoglobulina. En ambos casos se incrementa la conductividad de la solución sin alterar el pH de la fase móvil. Son sales de elución adecuadas, p.ej., el cloruro sódico, sulfato sódico, fosfato sódico, cloruro potásico, sulfato potásico, fosfato potásico, ácido cítrico y sales del mismo, así como mezclas de estos componentes. Las concentraciones aplicadas, entre 10 mM y 500 mM, se ajustan de manera que la conductividad quede en el intervalo de 1 mili S/cm hasta 50 mili S/cm, aproximadamente.

#### **Condiciones cromatográficas:**

Resina: CM-Toyopearl

50 Flujo: 160 cm/h

Equilibración: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,0

Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Lavado: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,0

55 Elución: gradiente lineal; desde tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,0 hasta tampón de citrato sódico 100 mM ajustado a pH 5,0

60 El eluato de proteína A acondicionado se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico débil (CM-Toyopearl). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de gradiente lineal, manteniendo constante el valor del pH en la fase móvil. La concentración de la sal del tampón, el citrato sódico, se incrementó linealmente de 10 mM hasta 100 mM a lo largo de 40 volúmenes de columna. Una vez alcanzada la concentración final de citrato sódico se siguió eluyendo con 40 volúmenes más de columna.

65 En la figura 3 se representa el cromatograma de elución, con gradiente lineal de tampón, del anticuerpo IL-1R. La forma monomérica y agregada de la inmunoglobulina se eluye en un pico medio separado, desde una concentración inicial de citrato sódico 15 mM hasta una concentración final de citrato sódico 55 mM.

La recuperación de la inmunoglobulina fijada por la resina de intercambio catiónico depende de la conductividad de la solución aplicada. Por tanto debe considerarse que los cationes de la sal del tampón presentes en la solución eluyente durante la etapa de recuperación producen la elución de la inmunoglobulina desde la resina de intercambio catiónico. La conductividad y la fuerza iónica de la fase móvil son debidas al número total de iones presentes en la solución. Por consiguiente, en este caso hay que tener cuenta el número de cationes monovalentes distintos del hidrógeno existentes en la fórmula molecular de la sal del tampón y de la sal eluyente empleadas.

#### **Ejemplo 4**

#### **Optimización del método cromatográfico – segunda etapa: elución en tres etapas con gradiente de concentración**

La concentración con que se inicia la elución de la inmunoglobulina desde la resina de intercambio iónico, tal como se indica en el ejemplo 3, proporciona la base de la segunda etapa de optimización, un método de elución en tres etapas. Las concentraciones aproximadas de tampón/sal para la etapa de elución se calculan como sigue:

- la concentración salina de la primera etapa de elución es igual a la suma de como primer sumando el producto de la concentración de la sal a la cual se inicia la elución de la columna de intercambio iónico - determinada por el gradiente lineal de incremento salino - por el número total de cationes monovalentes distintos del hidrógeno indicados en la fórmula molecular de la sal eluyente y como segundo sumando el producto de la concentración de la sal del tampón por el número total de cationes monovalentes distintos del hidrógeno que figuran en la fórmula molecular de la sal del tampón;
- la concentración salina de la segunda etapa de elución es igual al producto de la concentración salina de la primera etapa de elución por un factor comprendido entre 1,25 y 1,35;
- la concentración salina de la tercera etapa de elución es igual al producto de la concentración salina de la primera etapa de elución por un factor comprendido entre 1,50 y 1,70.

El factor incluido en el cálculo de la concentración de dichas etapas representa el intervalo entre los niveles de concentración y se ajusta según la concentración inicial. A pequeñas concentraciones iniciales, es decir entre 10 mM y 40 mM, los factores son 1,35 y 1,70 respectivamente; a concentraciones iniciales medias, entre 40 mM y 70 mM, los factores son 1,30 y 1,60 respectivamente, y a concentraciones iniciales mayores de 70 mM los factores son 1,25 y 1,50 respectivamente.

Los factores definen un intervalo determinado experimentalmente. Estos valores no son absolutos, solo sirven de referencia. Es admisible una desviación del 10%.

La sal del tampón debe ser tenida en cuenta para el cálculo porque, tal como se ha comentado en el ejemplo 3, es posible que un cambio de concentración de la sal del tampón durante la cromatografía produzca la elución de una proteína desde la resina de intercambio iónico. Si la concentración de la sal del tampón se mantiene constante durante la cromatografía o es pequeña respecto a la concentración inicial ( $\leq 15\%$  de concentración de sal) se puede omitir en el cálculo, a fin de reducir la complejidad.

Con una concentración inicial de citrato sódico 15 mM, determinada como en el ejemplo 3, constituida por 10 mM del tampón y una contribución de 5 mM del gradiente lineal, se pueden calcular las tres etapas del modo siguiente:

- el cálculo de la concentración requerida para la etapa 1 da 30 mM ( $5 \text{ mM} \times 2 + 10 \text{ mM} \times 2$ ) de citrato sódico en detalle: 5 mM (concentración inicial) multiplicado por dos (el ácido cítrico es un ácido trivalente utilizado como sal disódica; por consiguiente en la fórmula molecular hay dos cationes monovalentes distintos de hidrógeno) más 10 mM (concentración de sal del tampón) multiplicado por dos (el ácido cítrico es un ácido trivalente utilizado como sal disódica; por consiguiente en la fórmula molecular hay dos cationes monovalentes distintos de hidrógeno)
- el cálculo de la concentración requerida para la etapa 2 da 40,5 mM ( $30 \text{ mM} \times 1,35$ ) de citrato sódico en detalle: citrato sódico 30 mM es la concentración de la etapa 1 y se multiplica por 1,35 (la concentración inicial es 15 mM, por tanto se elige 1,35 como factor)
- el cálculo de la concentración requerida para la etapa 3 da 51 mM ( $30 \text{ mM} \times 1,70$ ) de citrato sódico en detalle: citrato sódico 30 mM es la concentración de la etapa 1 y se multiplica por 1,70 (la concentración inicial es 15 mM, por tanto se elige 1,70 como factor)

#### **Condiciones cromatográficas:**

Resina: CM-Toyopearl

Flujo: 160 cm/h

Equilibración: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,0

Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Lavado: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,0

Elución: etapa 1: tampón de citrato sódico 34 mM ajustado a pH 5,0

etapa 2: tampón de citrato sódico 44 mM ajustado a pH 5,0

etapa 3: tampón de citrato sódico 54 mM ajustado a pH 5,0

5 El eluato de proteína A acondicionado se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico débil (CM-Toyopearl). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de gradiente gradual (= un método donde la concentración de sal eluyente se cambia progresivamente desde un valor/nivel inicial hasta un valor/nivel final), manteniendo constante el valor del pH en la fase móvil. La concentración de la sal del tampón, el citrato sódico, se incrementó desde un valor inicial de 10 mM hasta 34 mM en la primera etapa, hasta 44 mM en la segunda etapa y hasta 54 mM en la etapa final. Tras cada aumento de la concentración salina se pasó a través de la columna una cantidad de tampón de elución equivalente a diez volúmenes de columna, antes de la siguiente etapa. Una vez alcanzada la concentración final de citrato sódico se continuó eluyendo con otros 10 volúmenes de columna.

10 En la figura 4 se representa el perfil de la elución del anticuerpo anti IL-1R mediante un gradiente de tres etapas. La inmunoglobulina monomérica se eluye en la fracción de la primera etapa y los agregados en la fracción de la segunda etapa.

20

### **Ejemplo 5**

#### **Optimización del método cromatográfico – tercera etapa: elución de etapa única con cloruro sódico**

25 El paso final del procedimiento de optimización es la adaptación a un método de elución de una sola etapa (= un método en que la concentración de la sal eluyente se cambia de golpe desde un valor inicial a un valor final). Para ello se aumenta el pH de la cromatografía desde 5,0 a 5,5. Este desplazamiento de pH mejora la separación de la proteína A, porque ésta tiene un punto isoeléctrico inferior a 5,5. Además la sal eluyente se cambia de citrato sódico, que sigue usándose como sal tampón, a cloruro sódico. Tras esta operación cromatográfica se efectuaron análisis adicionales (ADN, proteína de la célula huésped, contenido de proteína A y patrón de glicosilación con LC-MS).

30

#### **Condiciones cromatográficas:**

Resina: CM-sefarosa

35 Flujo: 160 cm/h

Equilibración: citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Lavado: citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

Elución: citrato sódico 10 mM con cloruro sódico 150 mM, ajustado a pH 5,5

40 El eluato de proteína A acondicionado se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico débil (CM-sefarosa). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de gradiente de etapa única (= un método donde la concentración de sal eluyente se cambia de golpe desde un valor inicial a un valor final), manteniendo constante el valor del pH en la fase móvil. La concentración salina del tampón, el citrato sódico, se mantuvo constante y se añadió cloruro sódico 150 mM. Tras el aumento de la concentración de sal se pasó a través de la columna una cantidad de tampón de elución equivalente a quince volúmenes de columna, para eluir la inmunoglobulina fijada.

45 En la figura 5 se presenta el cromatograma de elución en una sola etapa con cloruro sódico. La cromatografía con gradiente de una sola etapa resuelve la fracción monomérica principal y la fracción de agregados/proteína A. El rendimiento de inmunoglobulina monomérica es superior al 80%. Incluso es posible un rendimiento mayor del 95%.

### **Ejemplo 6**

#### **Comparación entre la separación con una resina de intercambio catiónico fuerte (SP-sefarosa de flujo rápido) y con una resina de intercambio catiónico débil (CM-sefarosa de flujo rápido).**

55 Se realizó una comparación entre la fuerte SP-sefarosa de flujo rápido y la CM-sefarosa. Los ensayos se llevaron a cabo según el ejemplo 5 por duplicado (en las figuras 6a y b solamente se representa uno de cada columna) y se efectuaron análisis adicionales (ADN, proteína de célula huésped, contenido de proteína A y patrón de glicosilación con LC-MS).

#### **Métodos analíticos:**

65 Cromatografía de exclusión de tamaños: resina: TSK 3000 (Tosohaas)

columna: 300 x 7,8 mm  
 flujo: 0,5 ml/min.  
 tampón: fosfato potásico 200 mM con cloruro potásico 250 mM,  
 ajustado a pH 7,0

5 Sistema de umbral de ADN: véase p.ej. Merrick, H. y Hawlitschek, G., Biotech Forum Europe 9 (1992) 398-403

10 ELISA de proteína A: los pocillos de una placa de microvaloración se recubren con una proteína A-IgG policlonal derivada de pollo. Tras la fijación, el anticuerpo no reaccionado se elimina lavando con tampón de muestra. Para la fijación de la proteína A se añade a los pocillos un volumen definido de muestra. La proteína A presente en la muestra es fijada por el anticuerpo de pollo y retenida en los pocillos de la placa. Después de la incubación se elimina la solución de muestra y se lavan los pocillos. Para la detección se agrega sucesivamente un conjugado de anti-proteína A-IgG-biotina policlonal derivada de pollo y un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Después de otra etapa de lavado se añade solución de sustrato y como resultado se forma un producto de reacción coloreado. 15 La intensidad del color es proporcional al contenido de proteína A en la muestra. Al cabo de un tiempo determinado se para la reacción y se mide la absorbancia.

20 ELISA de proteína de la célula huésped (HCP): las paredes de los pocillos de una placa de microvaloración se recubren con una mezcla de albúmina de suero y estreptavidina. Se fija a las paredes de los pocillos de la placa de microvaloración un anticuerpo policlonal anti-HCP derivado de cabra. Después de una etapa de lavado se incuban diferentes pocillos de la placa de microvaloración con una serie calibradora de HCP de distintas concentraciones y solución de muestra. Después de la incubación el material de la muestra no fijado se elimina lavando con solución tampón. Los pocillos se incuban con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa para detectar proteína de célula huésped fijada. La actividad de la peroxidasa fijada se detecta por incubación con ABTS y detección a 405 nm. 25

#### Condiciones cromatográficas:

Resina: CM-sefarosa, SP-sefarosa

Flujo: 160 cm/h

30 Equilibración: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Lavado: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

Elución: tampón de citrato sódico 10 mM con cloruro sódico 150 mM, ajustado a pH 5,5

35 En las figuras 6a y 6b se muestra una comparación entre el cromatograma de elución de una resina de intercambio catiónico débil y el de una resina de intercambio catiónico fuerte. Al usar una resina de intercambio catiónico débil (figura 6a) se logra separar el anticuerpo monomérico anti IL-1R de otras impurezas. Con la resina de intercambio catiónico fuerte (figura 6b) no es posible la separación en las mismas condiciones. Se recogieron y se analizaron las fracciones correspondientes a los picos. Los resultados de análisis resumidos en la tabla 1 demuestran que la resina de intercambio catiónico débil puede eliminar efectivamente los agregados y otras impurezas de la preparación de 40 inmunoglobulina.

Los datos presentados en la tabla 1 indican que con una resina de intercambio catiónico débil es posible separar el anticuerpo monomérico anti IL-1R de sus formas agregadas. También se pueden eliminar las impurezas de ADN y 45 proteína A.

**Tabla 1: análisis de los eluatos: comparación entre SP-sefarosa y CM-sefarosa, resultados de dos separaciones diferentes**

analito	eluato de proteína A acondicionado	eluato de SP-sefarosa		eluato de CM-sefarosa			
		pico único		pico 1		pico 2	
cantidad de proteína A	entre 20 y 50 ng/mg	31 ng/mg	26 ng/mg	7,5 ng/mg	11 ng/mg	1638 ng/mg	550 ng/mg
HCP	entre 20 y 120 ng/mg	3,88 ng/mg	3,98 ng/mg	3,13 ng/mg	3,27 ng/mg	946 ng/mg	1424 ng/mg
ADN	entre 2800 y 3500 pg/mg	36 pg/mg	16 pg/mg	157 pg/mg	131 pg/mg	1918 pg/mg	1222 pg/mg
agregados	presentes	presentes	presentes	no presentes	no presentes	presentes en gran cantidad	presentes en gran cantidad
análisis de masas	no se encontraron diferencias entre SP- y CM-sefarosa						

50

**Ejemplo 7****Ejemplo comparativo - elución a diferentes conductividades****5 Condiciones cromatográficas:**

Resina: CM-sefarosa

Flujo: 160 cm/h

Equilibración: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

10 Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Lavado: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

Elución: tampón de citrato sódico 10 mM con cloruro sódico 100 mM, 150 mM o 200 mM, ajustado a pH 5,5

15 El eluato de proteína A acondicionado se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico débil (CM-sefarosa). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de gradiente de etapa única, manteniendo constante el valor del pH en la fase móvil. La concentración de la sal del tampón, citrato sódico, se mantuvo constante y en tres pasadas distintas se añadió cloruro sódico 100 mM, 150 mM y 200 mM, respectivamente. Tras el incremento de la concentración de sal se pasó a través de la columna una

20 cantidad de tampón de elución equivalente a quince volúmenes de columna, para eluir la inmunoglobulina fijada. Los cromatogramas de elución están representados en las figuras 7a hasta c.

25 Se consiguieron buenas separaciones empleando cloruro sódico 150 mM y 200 mM como concentración de sal eluyente.

**Ejemplo 8****Ejemplo comparativo - elución a diferentes valores de pH****30 Condiciones cromatográficas:**

Resina: CM-sefarosa

Flujo: 160 cm/h

Equilibración: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

35 Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Lavado: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

Elución: tampón de citrato sódico 10 mM con cloruro sódico 150 mM, ajustado a pH 4,0 o 6,0

40 El eluato de proteína A acondicionado se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico débil (CM-sefarosa). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de gradiente de etapa única, manteniendo constante el valor del pH en la fase móvil a 4,0 o 6,0 respectivamente. La concentración de la sal del tampón, citrato sódico, se mantuvo constante y se añadió cloruro sódico 150 mM. Tras el

45 aumento de la concentración de sal se pasó a través de la columna una cantidad de tampón de elución equivalente a quince volúmenes de columna, con el fin de eluir la inmunoglobulina fijada. Los cromatogramas de elución están representados en las figuras 8a y b.

50 A pH 4,0 la tendencia de esta inmunoglobulina a formar agregados es superior, pero la CM-sefarosa es capaz de separar en dos picos esta mayor cantidad de agregados.

**Ejemplo 9****Separación cromatográfica de un anticuerpo monoclonal anti-HER-2 (WO 99/57134) mediante una resina de intercambio catiónico fuerte (SP-sefarosa)**

55 La presente invención se ejemplifica en lo sucesivo con Herceptina<sup>®</sup>, un anticuerpo anti-HER-2.

60 Se purificó Herceptina<sup>®</sup> mediante cromatografía de intercambio catiónico con SP-sefarosa, una resina de intercambio catiónico fuerte. En las condiciones estándar de la presente invención, es decir elución gradual con, p.ej. cloruro sódico, no se separan las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo (figura 10).

**Condiciones cromatográficas:**

Resina: SP-sefarosa

Flujo: 160 cm/h

Equilibración: ácido 2-morfolinetanosulfónico 25 mM, cloruro sódico 50 mM, ajustado a pH 5,6

65

Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Lavado: ácido 2-morfolinetanosulfónico 25 mM, cloruro sódico 50 mM, ajustado a pH 5,6

Elución: ácido 2-morfolinetanosulfónico 25 mM, cloruro sódico 95 mM, ajustado a pH 5,6

5 El anticuerpo monoclonal anti-HER-2 (designado en lo sucesivo como Herceptina<sup>®</sup>) se purificó en una primera etapa mediante una cromatografía de afinidad con proteína A. La elución desde la columna de proteína A se efectúa en condiciones ácidas (tampón de citrato sódico 10 mM, pH 3,0 ± 0,5). Antes de la etapa de filtración, el pH de la fracción que lleva el anticuerpo se ajusta a 5,6 con un tampón de tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) concentrado. El eluato de proteína A es una solución que tiene una concentración de proteína entre 5 mg/ml y 15 mg/ml y que está tamponada con citrato sódico.

15 El eluato de proteína A acondicionado se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico fuerte (SP-sefarosa). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de etapa única, manteniendo constante el valor del pH y variando la conductividad por incremento (gradual) de la concentración de cloruro sódico. En la figura 10 se representa el cromatograma de elución.

No se consiguió la separación de las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo.

## 20 **Ejemplo 10**

### **Optimización del método cromatográfico – primera etapa: gradiente de concentración lineal**

25 Para mejorar la separación de las dos fracciones se optimizaron las condiciones según el procedimiento descrito en relación con el anticuerpo anti IL-1R.

30 A diferencia del proceso de optimización con el anticuerpo anti IL-1R se empleó un gradiente lineal de una sal (de elución), p.ej. cloruro sódico, en lugar de un gradiente de la sustancia tampón. El cromatograma de elución con el gradiente lineal de cloruro sódico, que corresponde a la primera etapa del procedimiento de optimización, está reproducido en la figura 11. El análisis confirmó que la cola del pico principal está enriquecida con formas agregadas del anticuerpo.

#### **Condiciones cromatográficas:**

35 Resina: CM-sefarosa

Flujo: 160 cm/h

Equilibración: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa

Lavado: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5

40 Elución: gradiente lineal; desde tampón de citrato sódico 10 mM, ajustado a pH 5,5, hasta tampón de citrato sódico 10 mM con cloruro sódico 400 mM, ajustado a pH 5,5

45 El eluato de proteína A acondicionado, descrito en el ejemplo 9, se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico débil (CM-sefarosa). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de gradiente lineal, manteniendo constante el valor del pH en la fase móvil y la concentración de la sal del tampón. La concentración de la sal eluyente, cloruro sódico, se elevó linealmente de 0 mM hasta 400 mM a lo largo de 40 volúmenes de columna. En la figura 11 se representa el cromatograma de elución.

50 La sustitución de la resina de intercambio catiónico fuerte por una resina de intercambio catiónico débil produjo la separación de un segundo pico en forma de hombro del primer pico principal. Esta observación es similar a la del caso del anticuerpo anti IL-1R. Las inmunoglobulinas empiezan a eluirse de la columna a una concentración de cloruro sódico 80 mM.

## 55 **Ejemplo 11**

### **Optimización del método cromatográfico – segunda etapa: elución con gradiente de concentración de tres etapas**

60 La concentración inicial a la cual empieza a eluirse la inmunoglobulina, determinada en el ejemplo 10 y derivada del cromatograma presentado en la figura 11, es cloruro sódico 80 mM. Para calcular las tres etapas de concentración de la segunda etapa de optimización se puede omitir la concentración del tampón, porque es baja y se mantiene constante durante la cromatografía.

65 La concentración inicial de cloruro sódico es 80 mM y el cloruro sódico tiene un catión distinto del hidrógeno en su fórmula molecular. Por lo tanto el cálculo de las concentraciones de cloruro sódico para la elución en tres etapas da

80 mM, 100 mM (= 80 mM multiplicado por 1,25) y 120 mM (= 80 mM multiplicado por 1,50) respectivamente.

#### Condiciones cromatográficas:

- 5 Resina: CM-sefarosa  
 Flujo: 160 cm/h  
 Equilibración: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5  
 Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa  
 Lavado: tampón de citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5  
 10 Elución: etapa 1: tampón de citrato sódico 10 mM con cloruro sódico 80 mM, ajustado a pH 5,5  
 etapa 2: tampón de citrato sódico 10 mM con cloruro sódico 100 mM, ajustado a pH 5,5  
 etapa 3: tampón de citrato sódico 10 mM con cloruro sódico 120 mM, ajustado a pH 5,5

15 El eluato de proteína A acondicionado, descrito en el ejemplo 9, se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico débil (CM-sefarosa). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron con un método de gradiente gradual, manteniendo constante el valor del pH en la fase móvil y la concentración de la sal del tampón, citrato sódico. La concentración de la sal eluyente, cloruro sódico, se incrementó desde 0 mM, como estado inicial, hasta 80 mM en la primera etapa, hasta 100 mM en la segunda etapa y hasta 120 mM en la etapa final. Después de cada aumento de la concentración salina se pasó a través de la columna una cantidad de tampón de elución con las concentraciones especificadas de cloruro sódico, equivalente a diez volúmenes de columna, antes de la siguiente etapa de concentración. Una vez alcanzada la concentración final de cloruro sódico se continuó eluyendo con otros 10 volúmenes de columna. En la figura 12 se representa el cromatograma de elución.

25 En el método de elución en tres etapas el anticuerpo monomérico se eluye en la etapa con una concentración de cloruro sódico 80 mM. El análisis por exclusión de tamaños confirmó que solo se eluye anticuerpo monomérico. Una vez alcanzada la concentración de cloruro sódico 100 mM en la segunda, etapa se eluyeron las formas agregadas (figura 12).

#### 30 Ejemplo 12

##### Optimización del método cromatográfico – tercera etapa: elución con cloruro sódico en una sola etapa

- 35 Resina: CM-sefarosa; SP-sefarosa  
 Flujo: 160 cm/h  
 Equilibración: citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5  
 Carga: máx. 20 g de proteína/l de matriz gelatinosa  
 Lavado: citrato sódico 10 mM ajustado a pH 5,5  
 40 Elución: citrato sódico 10 mM con cloruro sódico 80 mM, ajustado a pH 5,5

45 El eluato de proteína A acondicionado, descrito en el ejemplo 9, se introdujo en una columna cromatográfica que contenía una resina de intercambio catiónico débil (CM-sefarosa). Tras la etapa de carga, a un flujo de 160 cm/h, la columna se lavó con tampón de equilibración (10 volúmenes de columna). Las inmunoglobulinas fijadas se eluyeron empleando un método de gradiente de etapa única y manteniendo constante el valor del pH en la fase móvil. La concentración de la sal del tampón, el citrato sódico, se mantuvo constante a 80 mM y se añadió cloruro sódico. Después del aumento de la concentración salina se pasó a través de la columna una cantidad de tampón de elución con cloruro sódico equivalente a quince volúmenes de columna, para eluir en forma monomérica el anticuerpo anti-HER-2 fijado. Para reafirmar la separación de las formas monoméricas y agregadas del anticuerpo se llevó a cabo una segunda etapa, innecesaria en la preparación de anticuerpos monoméricos, a una concentración de cloruro sódico 120 mM. Tras este segundo aumento se eluyeron de la columna las formas agregadas del anticuerpo. En la figura 13 se representa el cromatograma de elución.

50 Al realizar el mismo método con una resina de intercambio catiónico fuerte, se observa una pérdida importante de anticuerpo monomérico (solo un 60%, aproximadamente, de rendimiento, frente a 95% y más en una columna de intercambio catiónico débil), aunque puede verse la separación de la forma monomérica y agregada del anticuerpo (figura 14).

60 La aplicación a una resina de intercambio catiónico fuerte, SP-sefarosa, de las mismas condiciones que son idóneas para la separación en una resina de intercambio catiónico débil no es beneficiosa. Aunque pueden separarse dos fracciones, el rendimiento de anticuerpo monomérico se reduce al 60% o menos.

**Tabla 2: análisis de los eluatos: comparación entre SP-sefarosa y CM-sefarosa, resultados de dos separaciones diferentes**

analito	eluato de proteína A acondicionado	SP-sefarosa		CM-sefarosa			
		pico único		pico 1		pico 2	
cantidad de proteína A	17 ng/mg	< 3,9 ng/mg	5,7 ng/mg	< 3,9 ng/mg	< 3,9 ng/mg	32,2 ng/mg	39,7 ng/mg
HCP	3243 ng/mg	49,0 ng/mg	183,4 ng/mg	107,5 ng/mg	126,2 ng/mg	1247 ng/mg	988 ng/mg
ADN	1615 pg/mg	830 pg/mg	2635 pg/mg	319 pg/mg	682 pg/mg	10554 pg/mg	< 9300 pg/mg
agregados (SEC)	0,97%	0%	32%	0%	0%	15,2%	23,0%

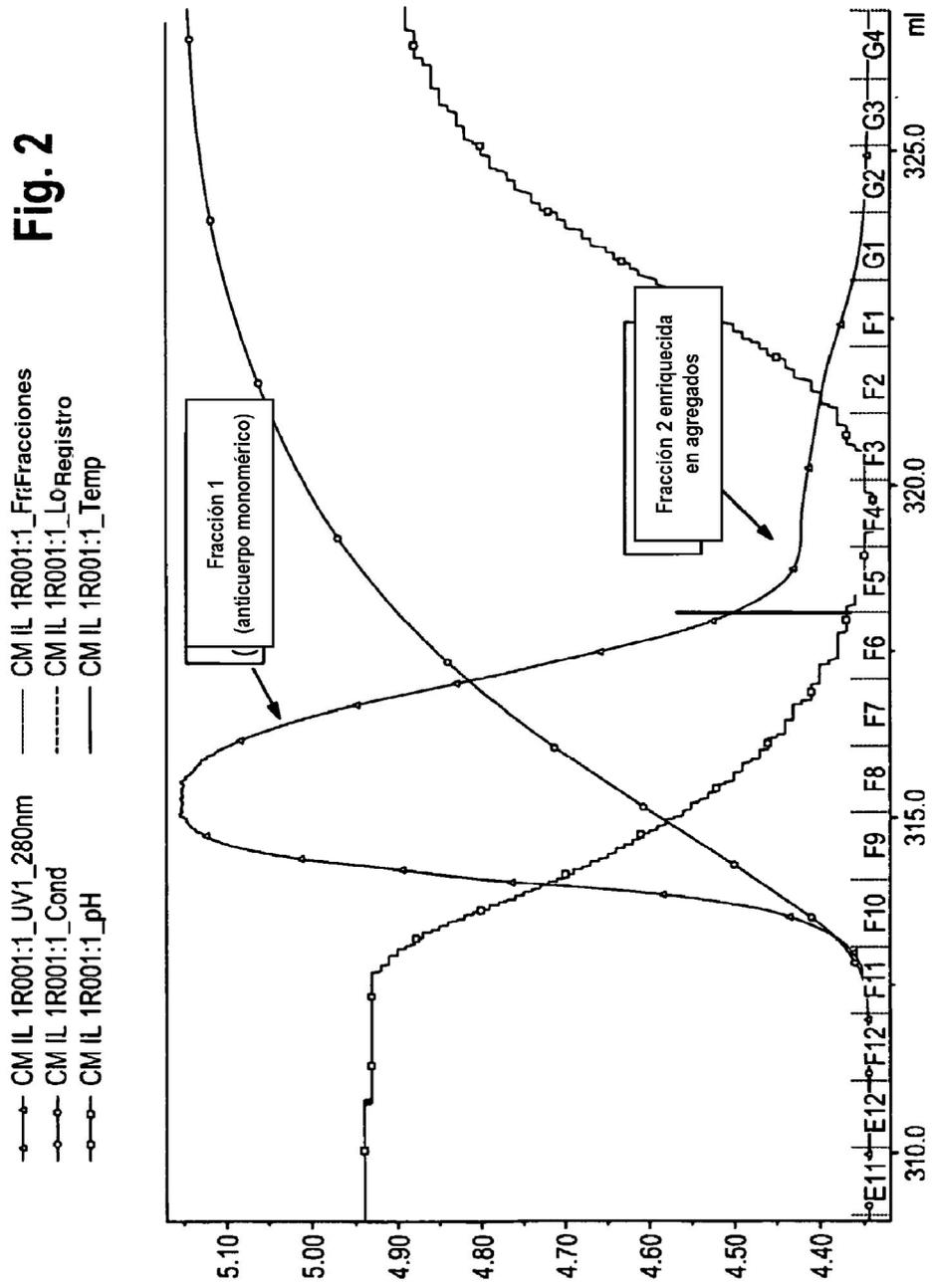
5

## REIVINDICACIONES

1. Método determinativo de la concentración de una sal para eluir en una sola etapa una inmunoglobulina a partir de un material de cromatografía de intercambio catiónico débil, que comprende las dos siguientes etapas:
- 5 a) etapa uno, que comprende las siguientes subetapas  
 a1) preparar una solución que contenga una inmunoglobulina, una sustancia tampón y opcionalmente una sal;  
 a2) poner en contacto un primer alícuota de la solución que contiene la inmunoglobulina con un material de intercambio catiónico débil que lleva un grupo carboxílico como sustituyente cargado, en unas condiciones que permiten la fijación de la inmunoglobulina al material de intercambio catiónico débil;
- 10 a3) recuperar la inmunoglobulina del material de intercambio catiónico débil, usando una solución que lleva una sustancia tampón y una sal, cuya concentración se incrementa linealmente;  
 a4) determinar la concentración inicial de la sal, a la cual la primera fracción de la inmunoglobulina empieza a eluirse de la columna de intercambio catiónico débil;
- 15 b) etapa dos, que comprende las siguientes subetapas  
 b1) poner en contacto un segundo alícuota de la solución que contiene la inmunoglobulina con un material de intercambio catiónico débil que lleva un grupo carboxílico como sustituyente cargado, en unas condiciones que permiten la fijación de la inmunoglobulina al material de intercambio catiónico débil;
- 20 b2) recuperar la inmunoglobulina del material de intercambio catiónico débil, usando un método de elución en tres etapas donde  
 i) la concentración de sal en la primera etapa de elución se calcula como la suma de el producto de la concentración inicial de la sal determinada en la etapa a4) y el número total de cationes monovalentes diferentes de hidrógeno indicado en la fórmula molecular de la sal  
 y  
 el producto de la concentración de la sal tampón y el número total de cationes monovalentes diferentes de hidrógeno indicado en la fórmula molecular de la sal tampón;
- 25 ii) la concentración de sal en la segunda etapa de elución es el producto de la concentración de sal en la primera etapa de elución y un factor entre 1,25 y 1,35;  
 iii) la concentración de sal en la tercera etapa de elución es el producto de la concentración de sal en la primera etapa de elución y un factor entre 1,50 y 1,70;
- 30 donde los factores de las etapas ii) y iii) se determinan de la manera siguiente: a una concentración inicial entre 10 mM y 40 mM los factores son 1,35 y 1,70 respectivamente; a una concentración inicial entre 40 mM y 70 mM los factores son 1,30 y 1,60 respectivamente, y a una concentración inicial superior a 70 mM los factores son 1,25 y 1,50 respectivamente;
- 35 b3) determinar a cuál de las tres subetapas del método de elución de la etapa b2) se eluye la inmunoglobulina de la columna de intercambio catiónico débil y definir así la concentración de una sal para eluir una inmunoglobulina de un material de intercambio catiónico débil en una única etapa de elución.
2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la inmunoglobulina es un miembro de la clase de las inmunoglobulinas G o E.
- 40 3. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la sustancia tampón es ácido cítrico o una sal del mismo o ácido fosfórico o una sal del mismo.
- 45 4. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** es un método cromatográfico o por lotes.
- 50 5. Método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la sal se elige del grupo formado por cloruro sódico, sulfato sódico, cloruro potásico, sulfato potásico, sales de ácido cítrico, sales de ácido fosfórico y mezclas de estos componentes.



**Fig. 2**



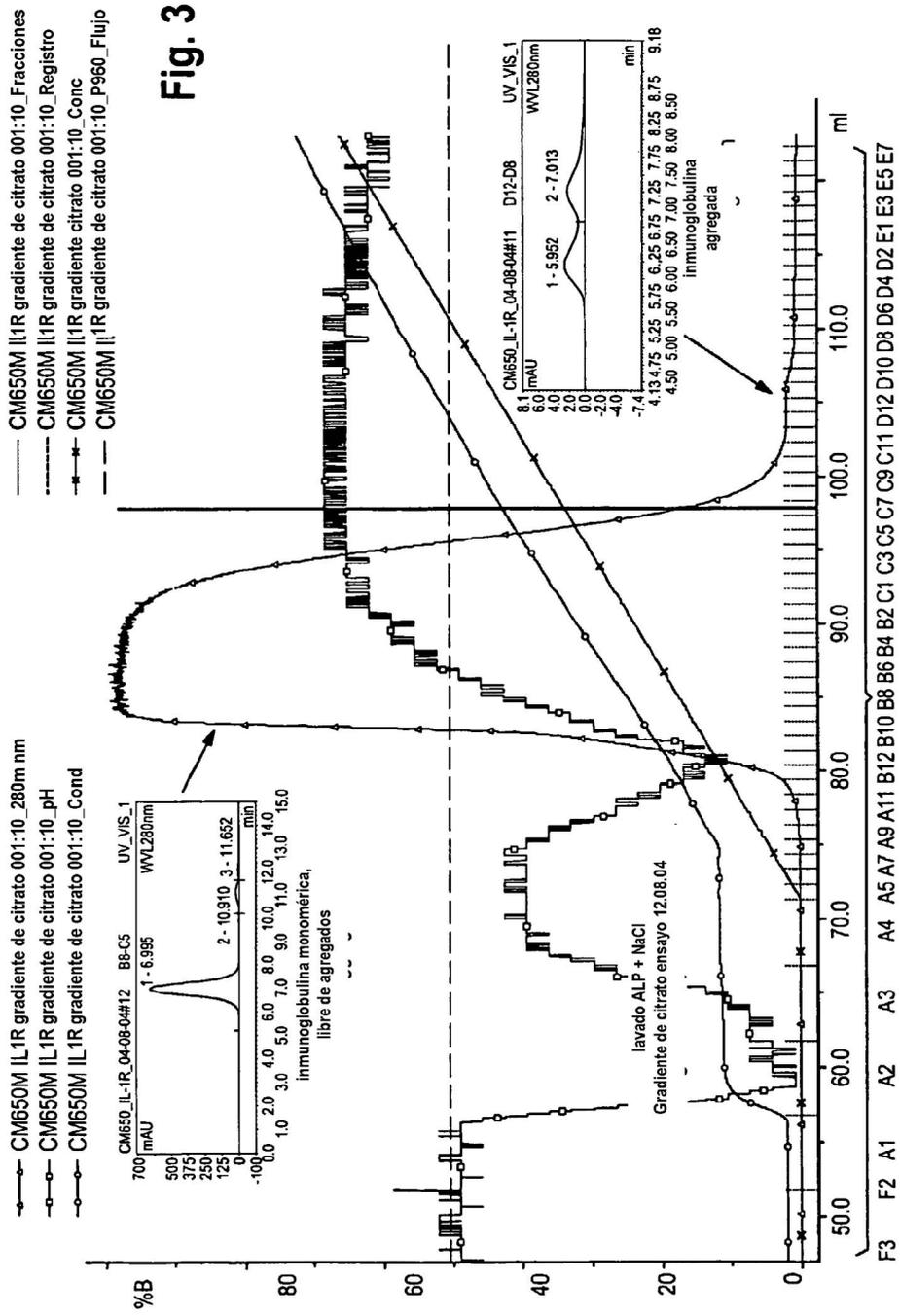
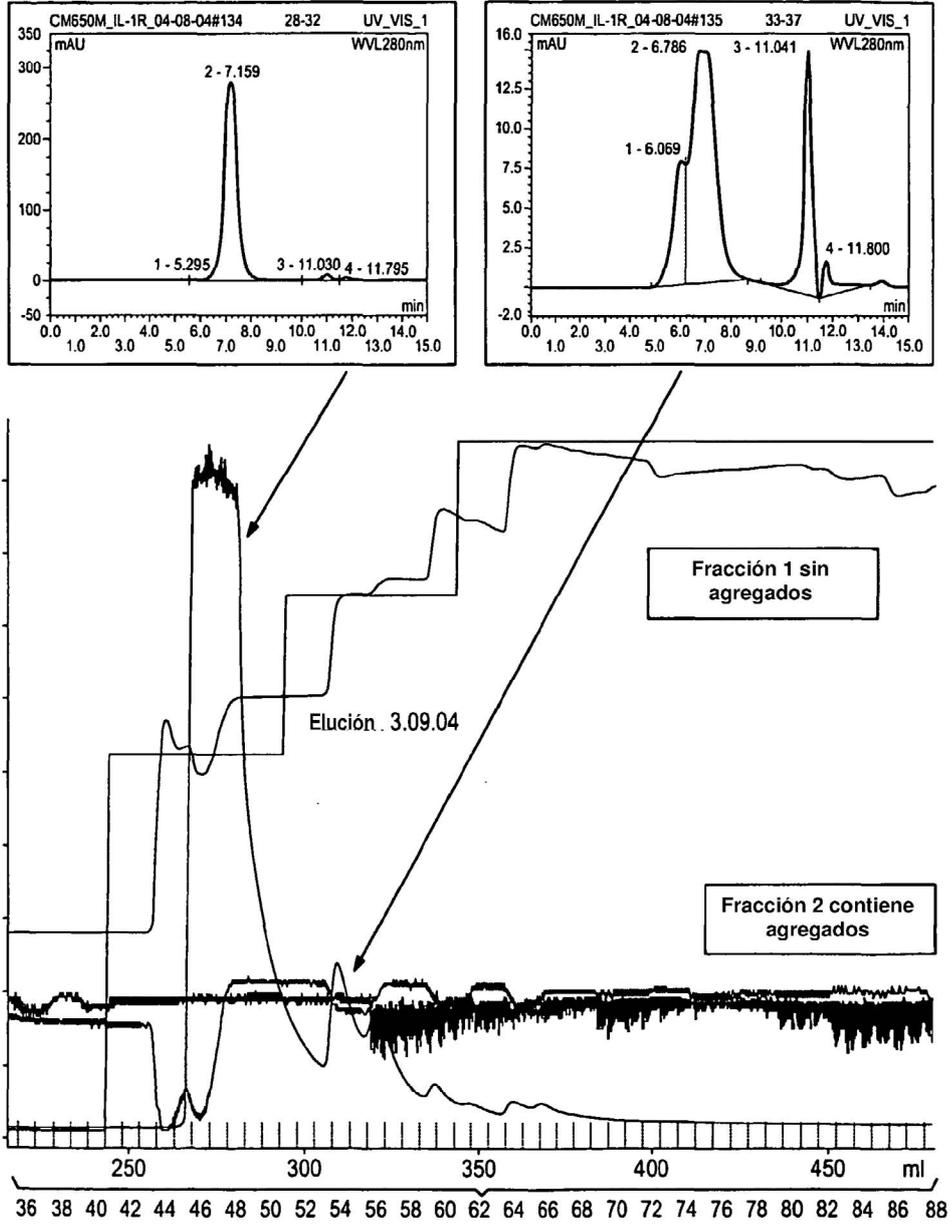
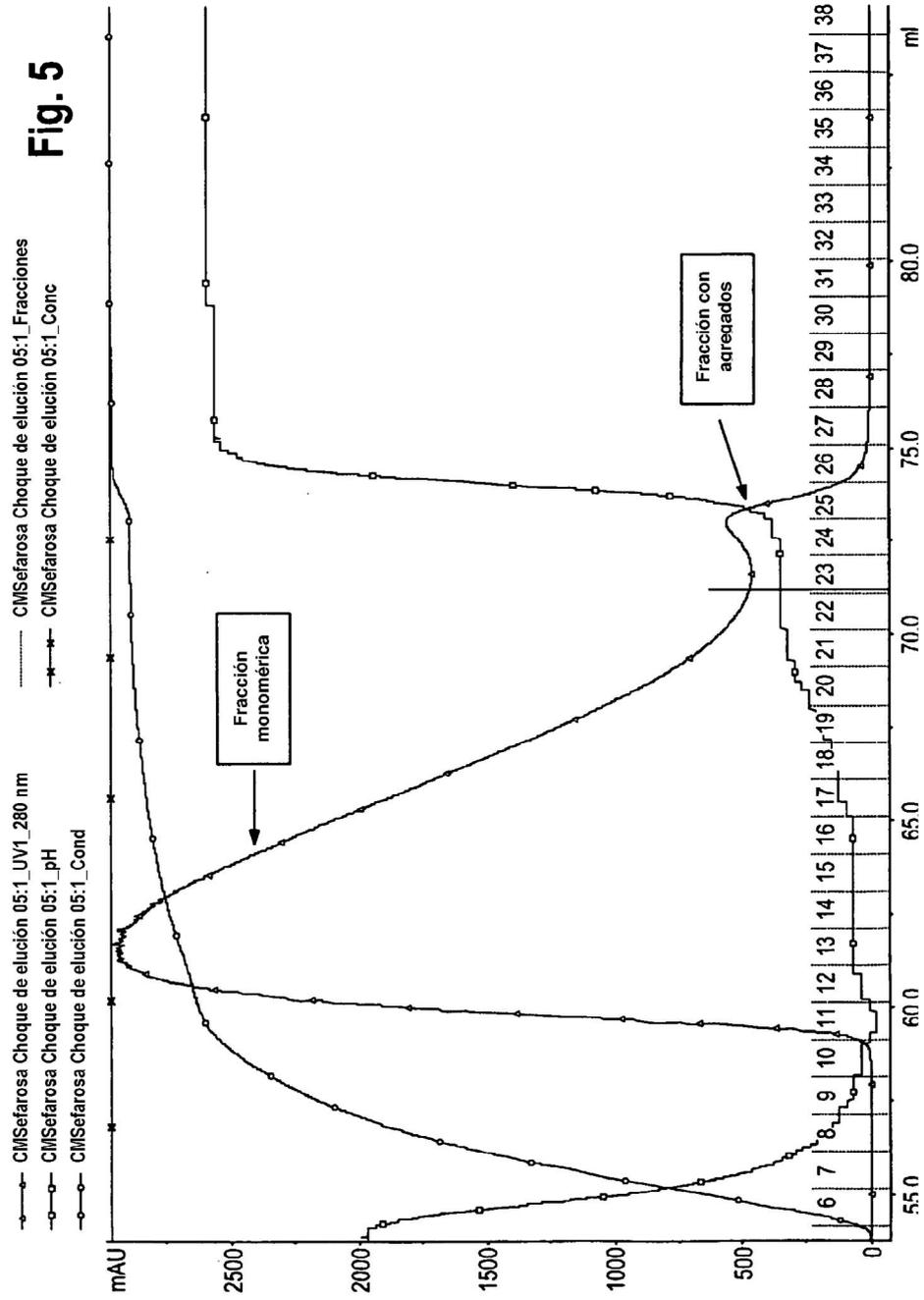


Fig. 4





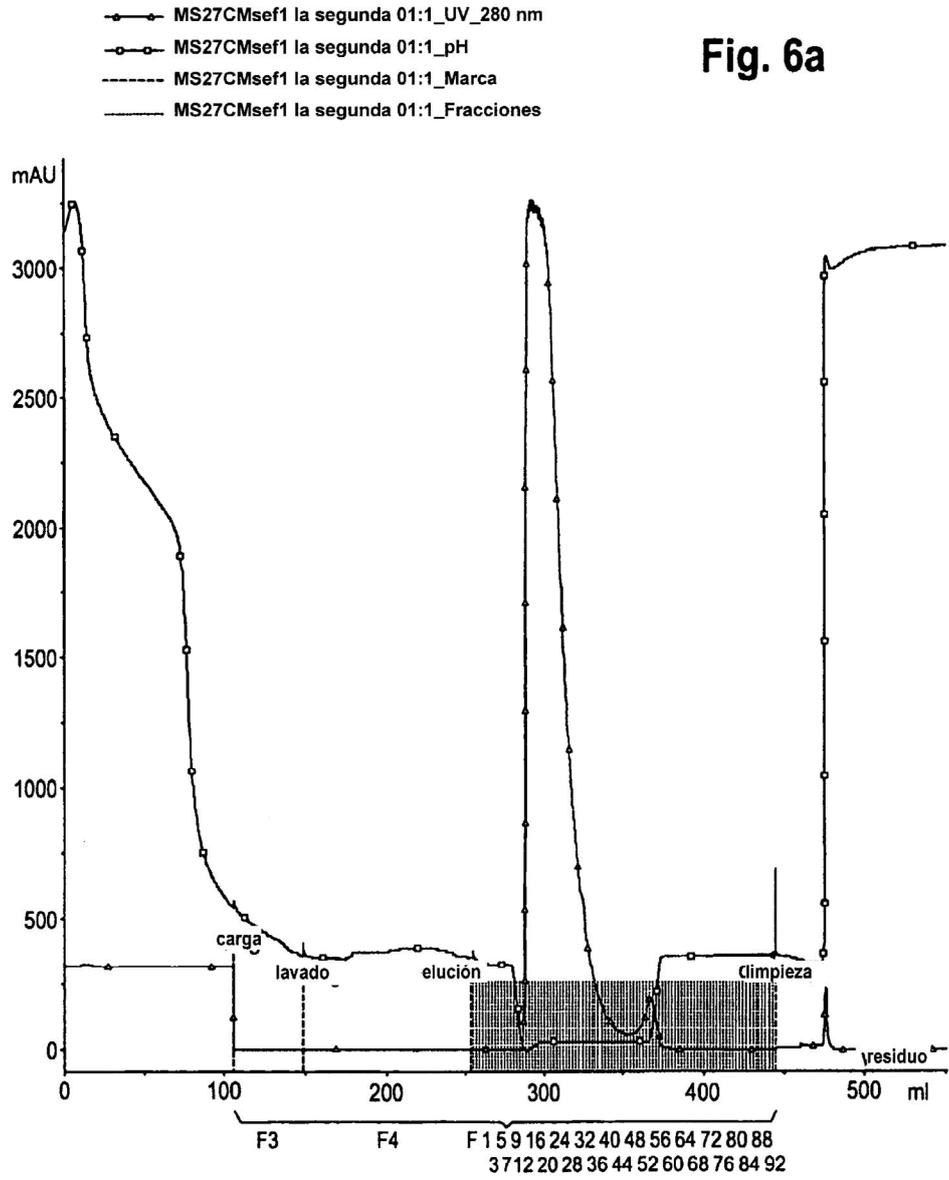


Fig. 6b

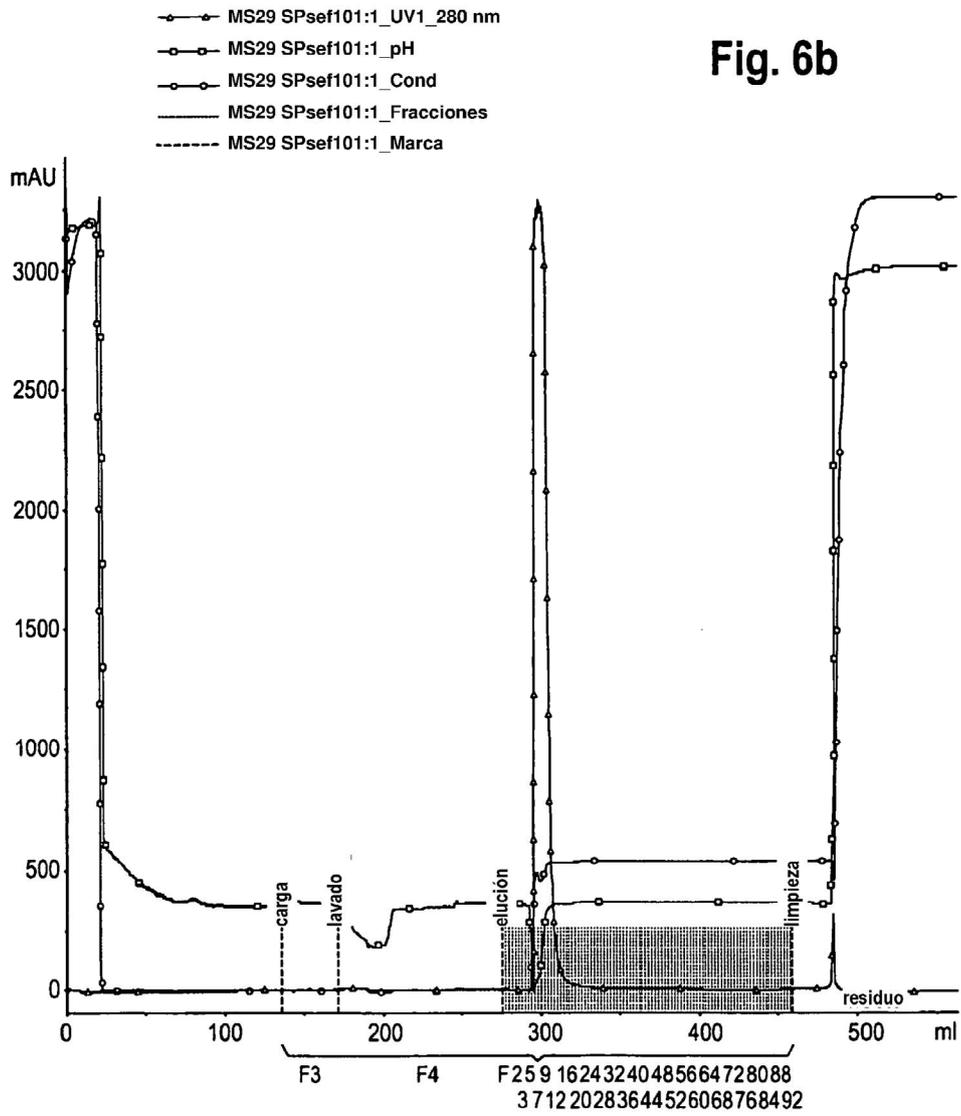
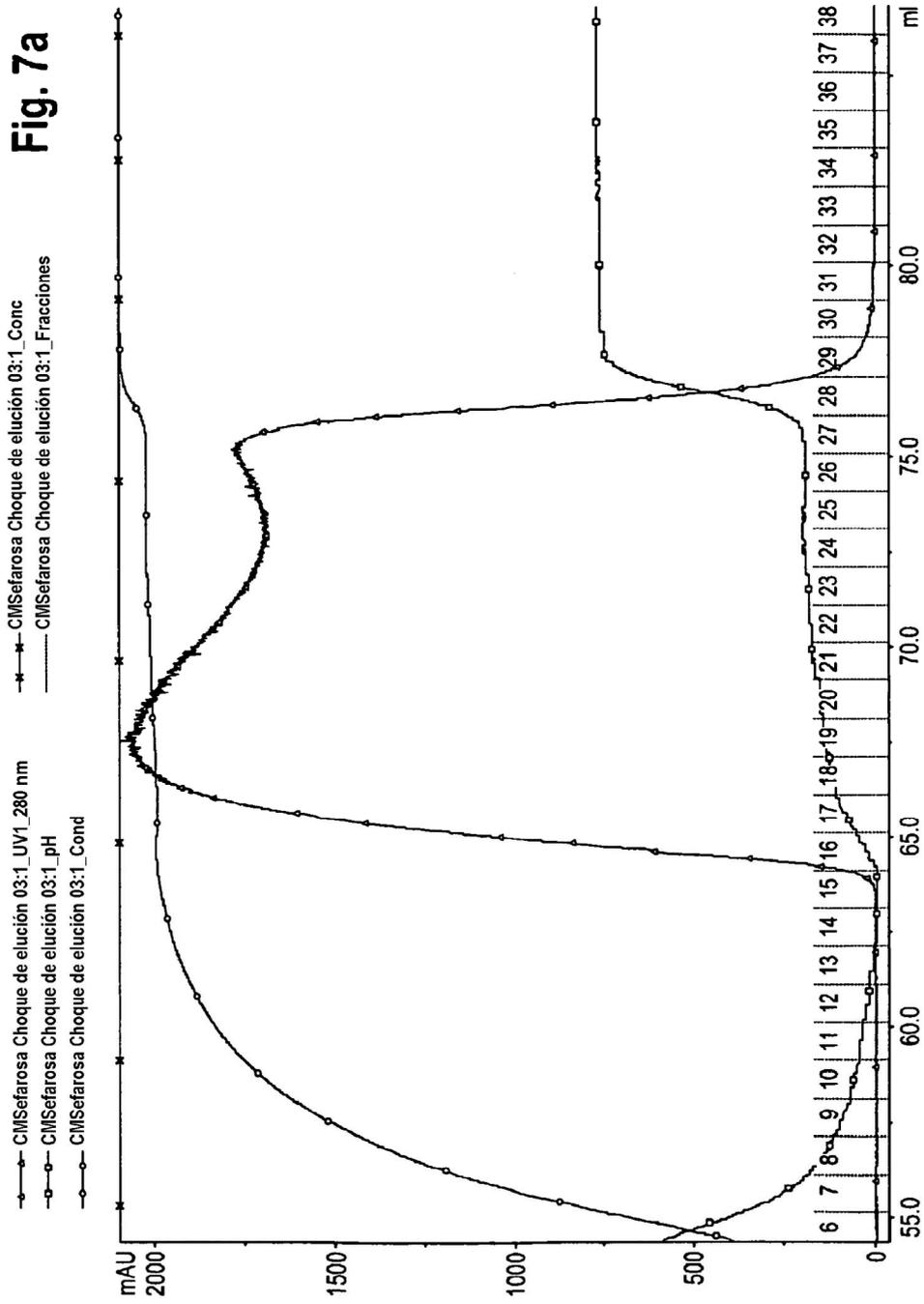
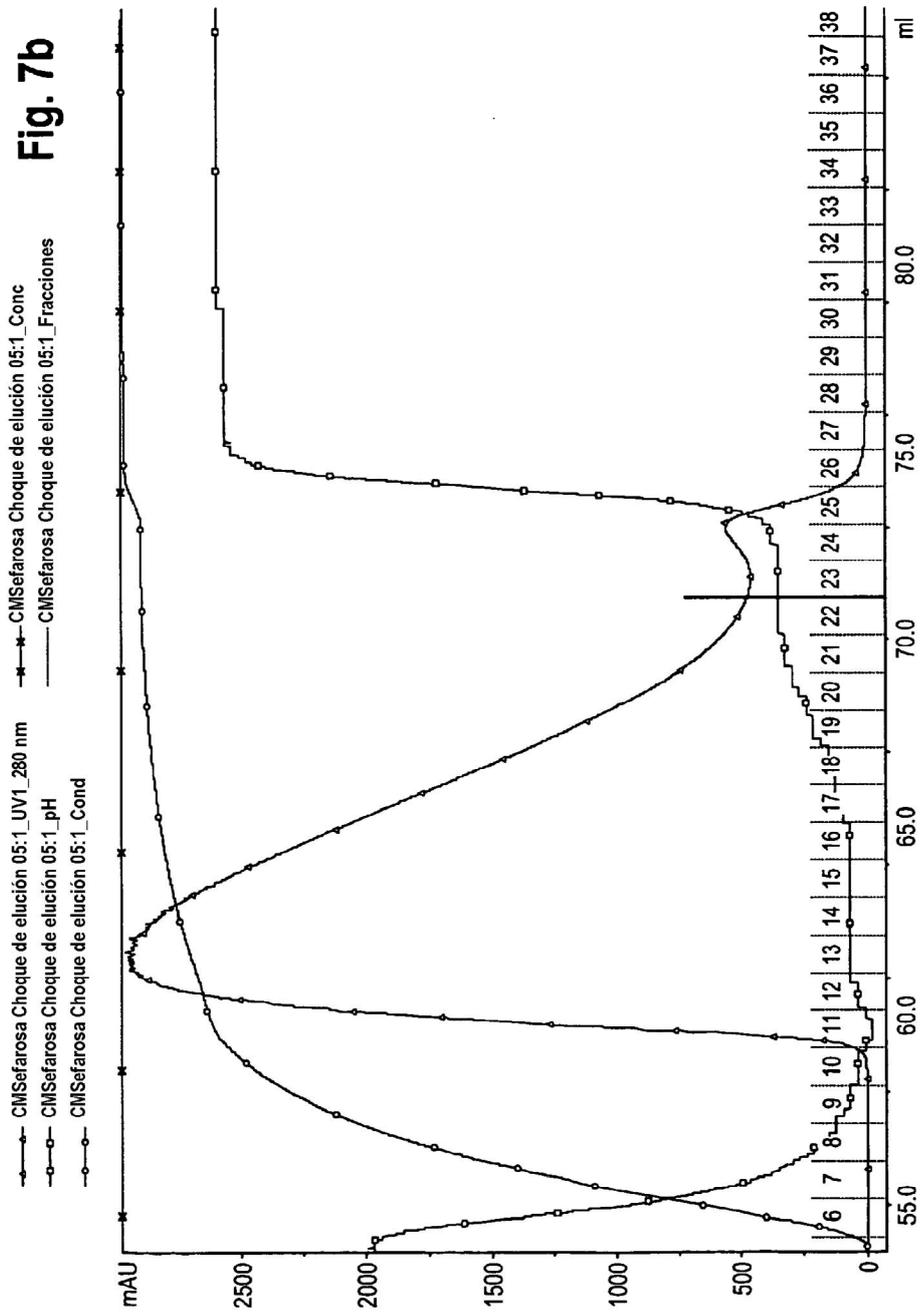


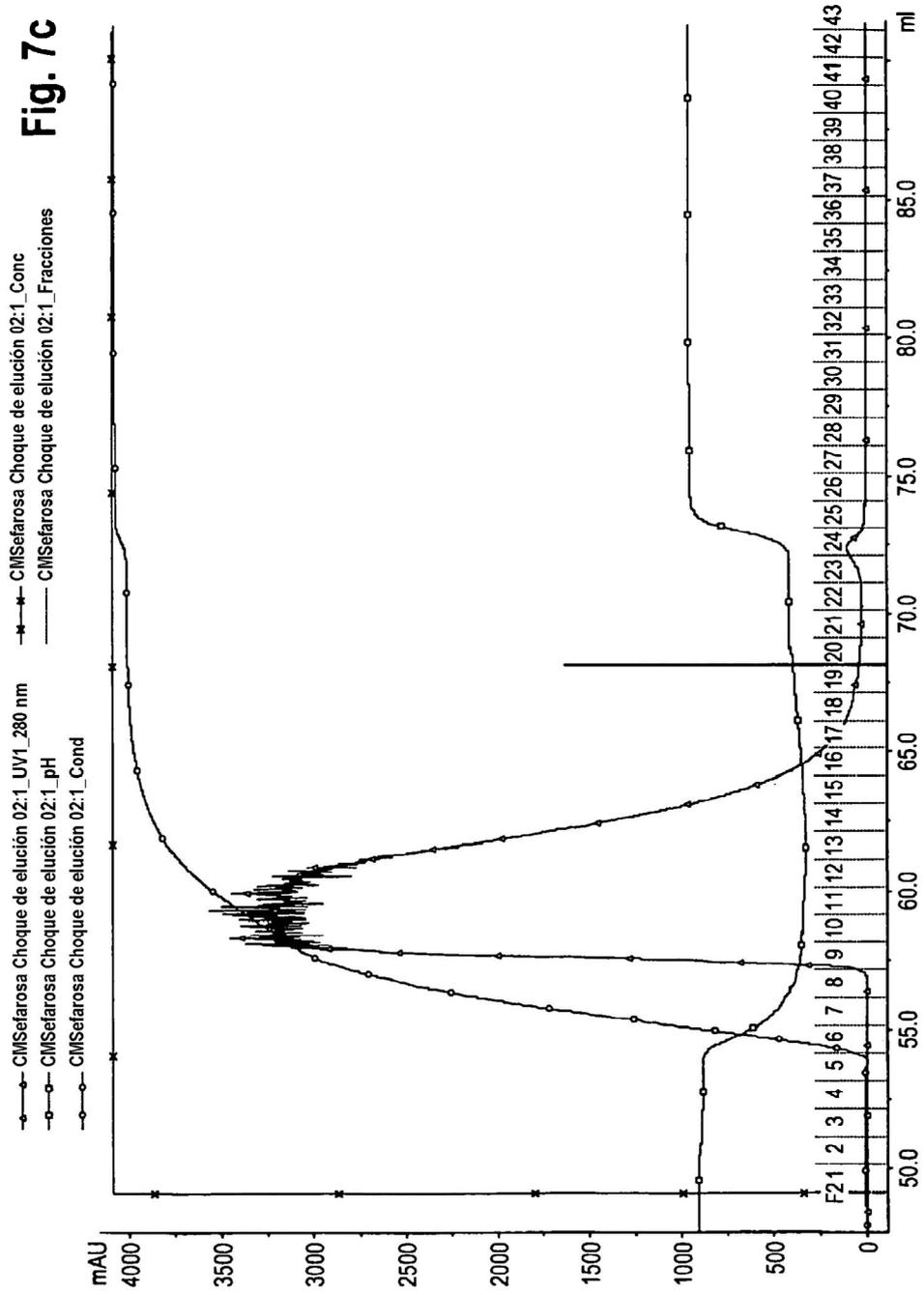
Fig. 7a



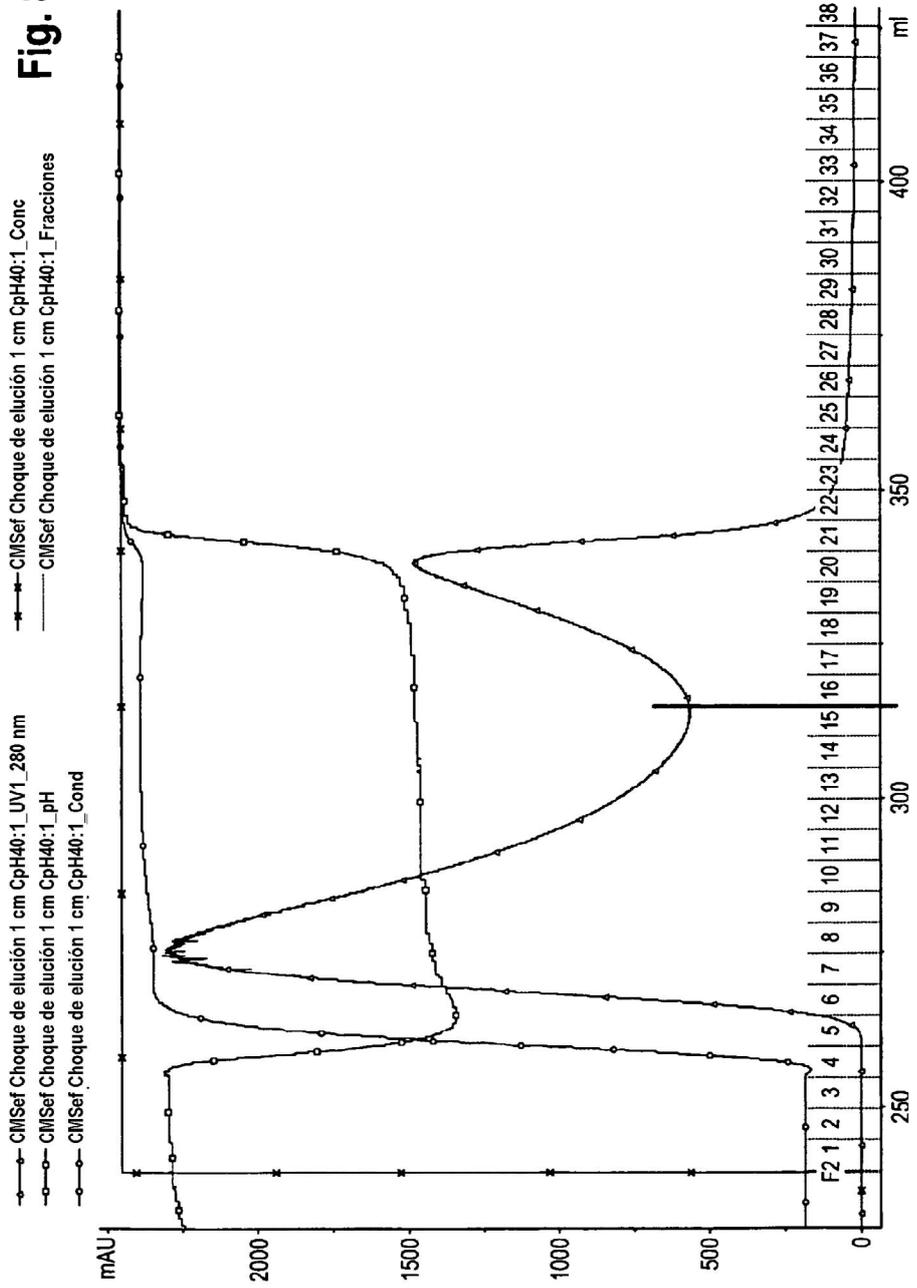
**Fig. 7b**

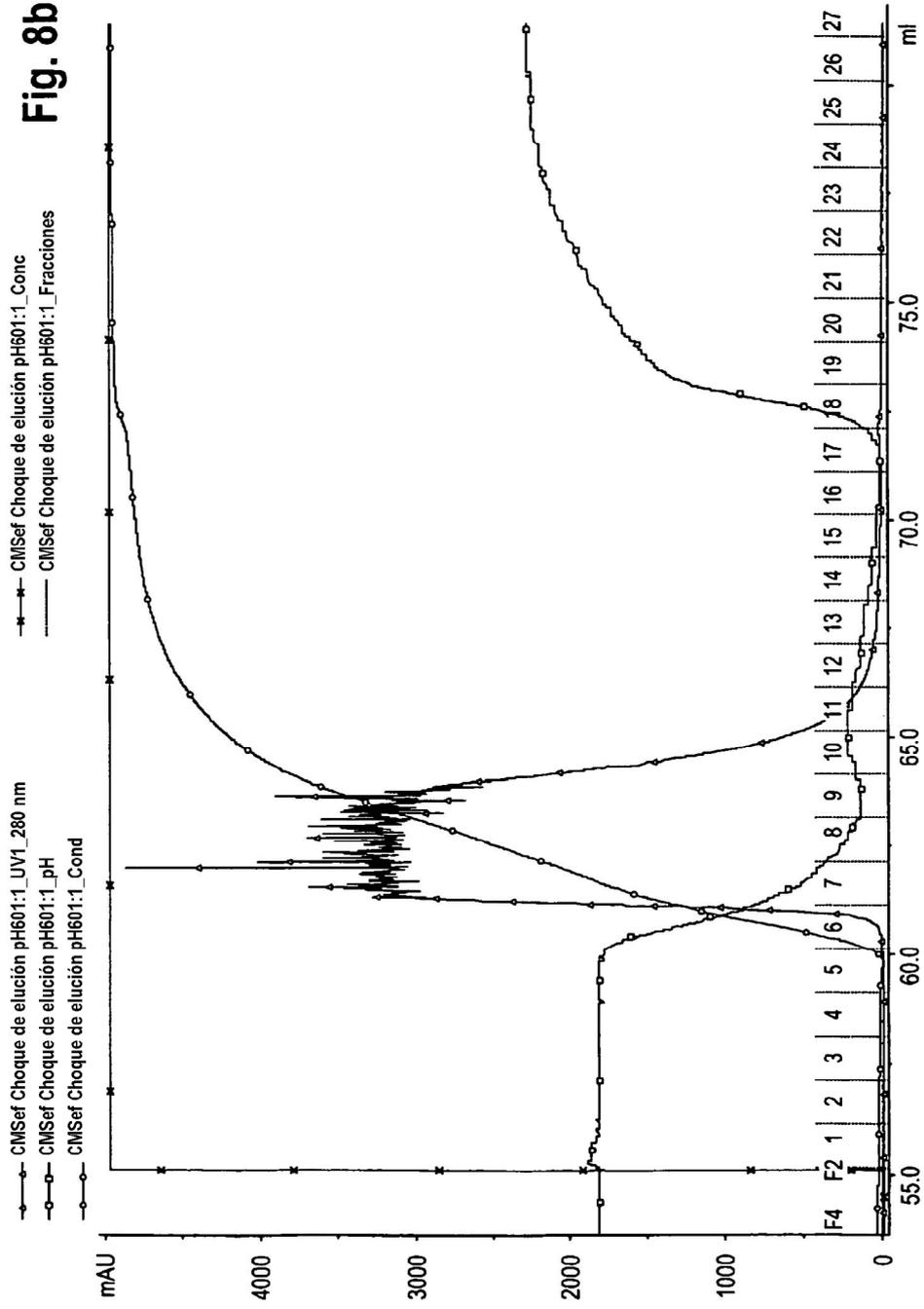


**Fig. 7c**



**Fig. 8a**





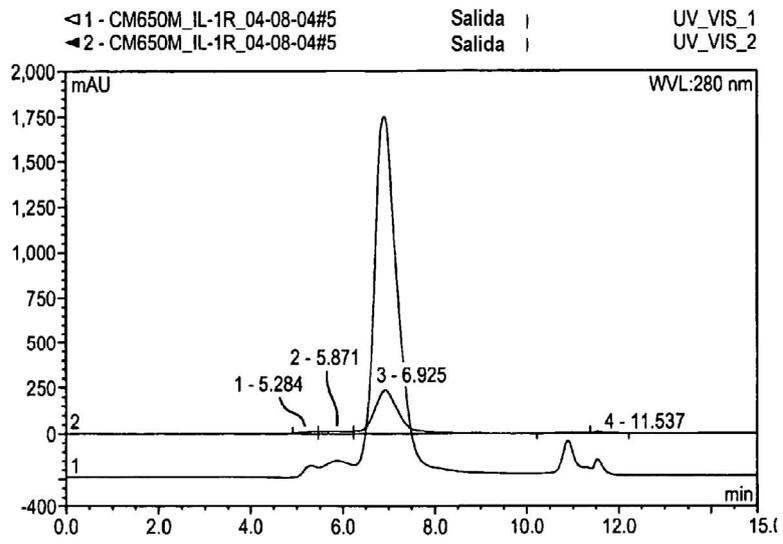
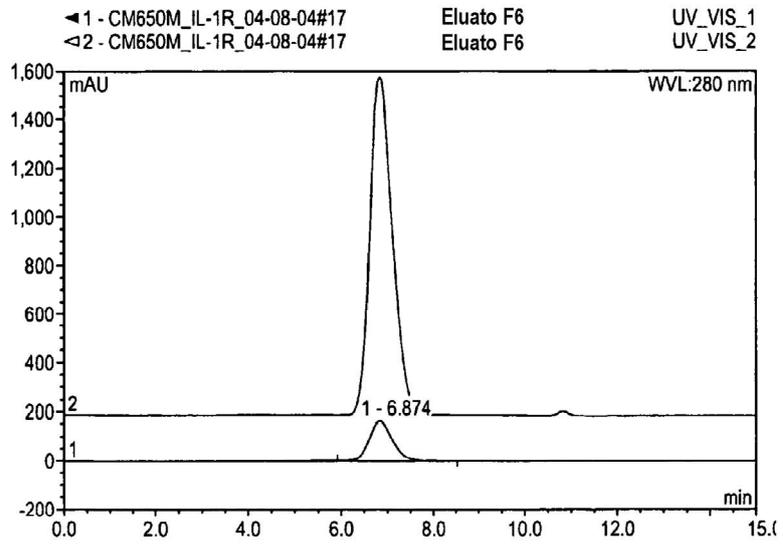


Fig. 9a



**Fig. 9b**

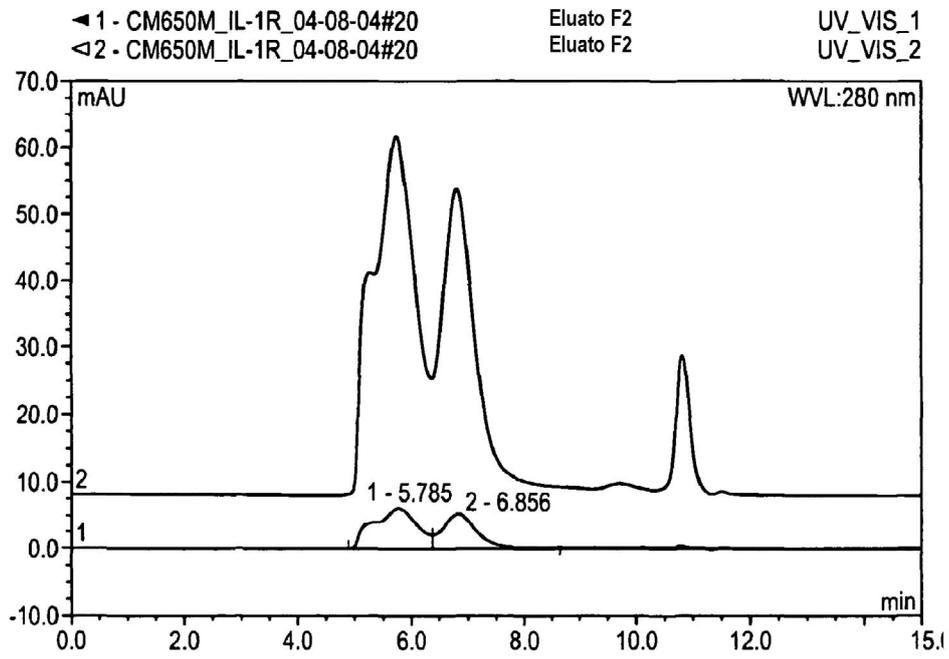
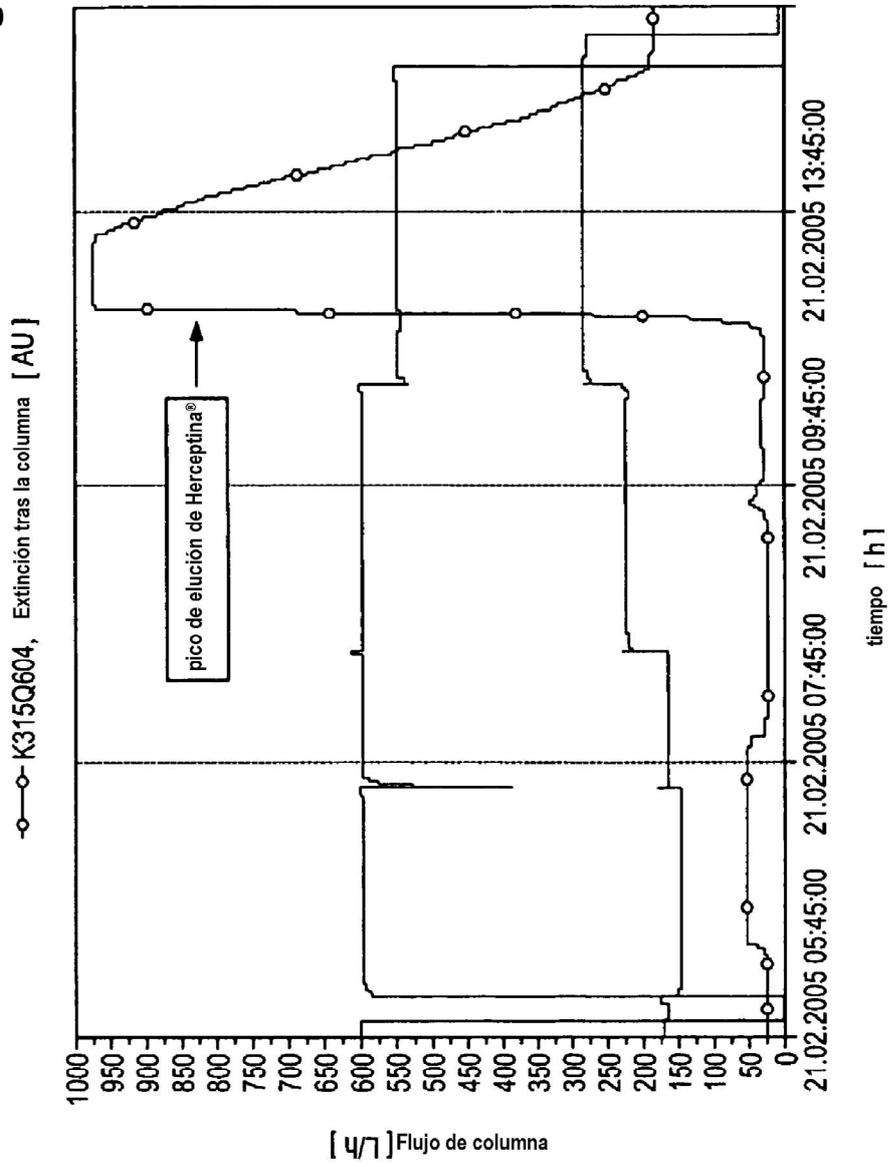


Fig. 9c

Fig. 10



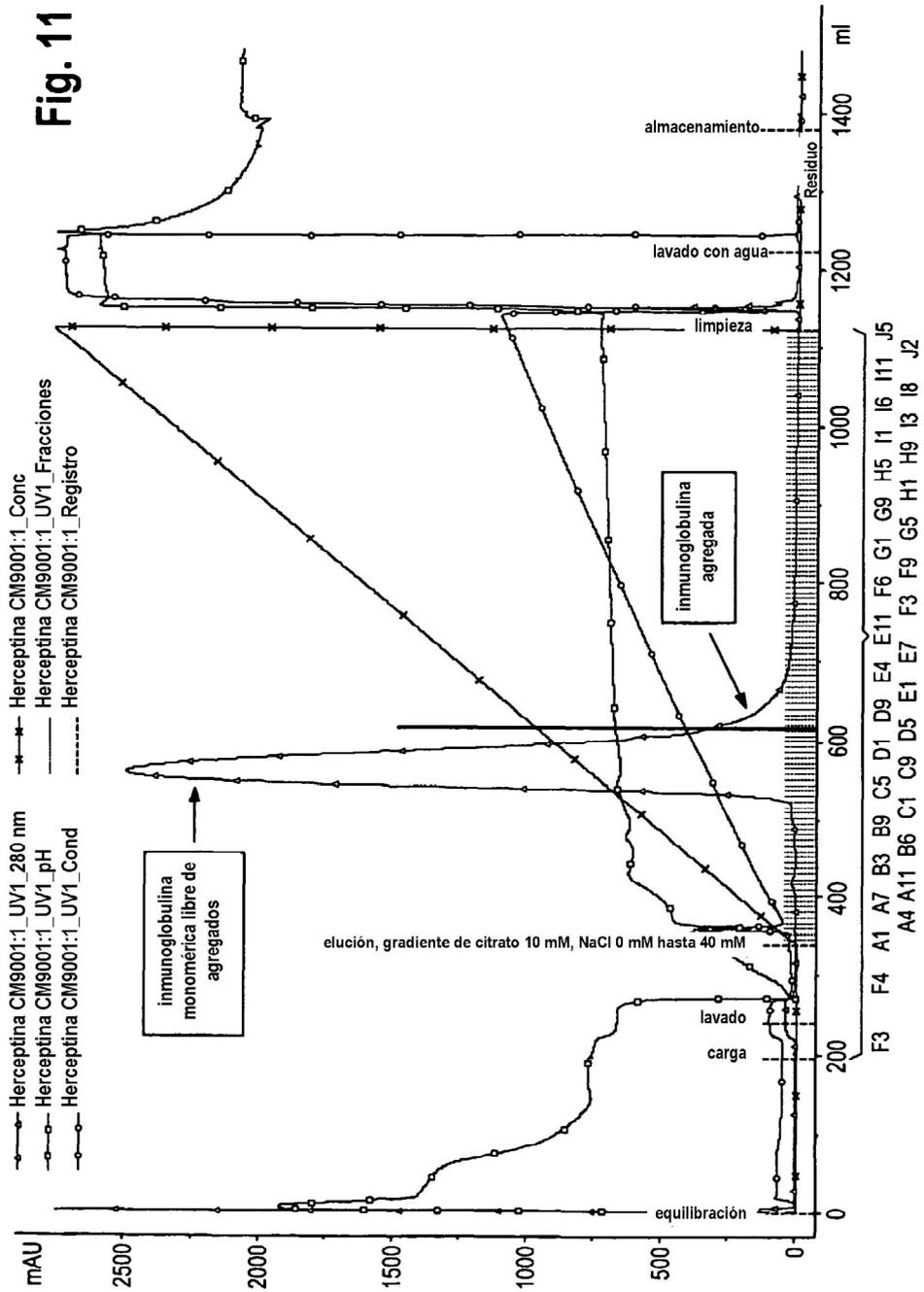


Fig. 12

