

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 786**

51 Int. Cl.:

B01J 20/32 (2006.01)
B01J 45/00 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C07K 1/13 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08785398 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2183049**

54 Título: **Uso de quelantes inmovilizados para purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de iones metálicos inmovilizados y método de purificación de proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

06.08.2007 EP 07015389
06.08.2007 US 954144 P
14.07.2008 EP 08012686

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2014

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.**
(100.0%)
HOFGARTENSTRASSE 8
80539 MÜNCHEN, DE

72 Inventor/es:

GÖRLICH, DIRK y
FREY, STEFFEN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 524 786 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

Uso de quelantes inmovilizados para purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de iones metálicos inmovilizados y método de purificación de proteínas recombinantes.

5 La presente invención se refiere al uso de una fase sólida que tiene un ácido policarboxílico inmovilizado en ella y métodos de utilización de la fase sólida, para purificación de polipéptidos recombinantes.

Una estrategia muy potente para purificación de proteínas recombinantes es el uso de un "marcador His", que comprende típicamente 6-10 histidinas consecutivas. Los marcadores His se fijan fuertemente a los sitios de coordinación libres de los iones Ni^{2+} . Los mismos pueden desprenderse por una concentración alta de imidazol, que compite para los sitios de coordinación en Ni^{2+} . Dicho ciclo de absorción y desorción específica puede utilizarse para purificación en un solo paso de una proteína deseada, conduciendo a factores del enriquecimiento de 100 o incluso mayores.

15 La variante de esta técnica utilizada más generalmente emplea N_0N_0 -bis(carboximetil)-lisina acopada por el grupo ϵ -amino a cuentas de agarosa. El grupo activo es NTA (ácido nitrilo-triacético) cargado con Ni^{2+} , mientras que el espaciador es un grupo aminobutilo. Dicha matriz Ni^{2+} -NTA presenta, sin embargo, varias desventajas importantes, tales como los elevados costes de la N_0N_0 -bis(carboximetil)-lisina.

Una desventaja adicional es la inestabilidad de los iones Ni^{2+} inmovilizados. Dado que NTA tiene sólo cuatro sitios de coordinación para Ni^{2+} , los iones Ni^{2+} se escapan fácilmente de la matriz y contaminan las muestras de proteína. Este es un problema grave por al menos dos razones: Ni^{2+} es un metal pesado bastante tóxico y cataliza la oxidación indeseable de la muestra de proteína. Adicionalmente, el Ni^{2+} unido a NTA es reducido fácilmente por agentes protectores de las proteínas tales como DTT (ditiotreitól) y desprendido luego de la matriz. Finalmente, los inhibidores de proteasas quelantes metálicos tales como EGTA o EDTA no pueden combinarse con una matriz Ni^{2+} -NTA, debido a que extraen los iones Ni^{2+} de esta matriz.

25 US 2005/0272116 da a conocer un proceso para purificación de proteínas recombinantes marcadas con histidina que utilizan una composición quelante que comprende un soporte polímero y un precursor de agente quelante unido al mismo por dos enlaces éster o carboxamida. Precursores adecuados de agentes quelantes incluyen dianhídrido etilendiaminatetraacético (EDTA) y dianhídrido dietileno-triaminapentaacético (DTPA).

US 6.670.159 describe un método para la preparación de conjugados de quelatos metálicos basados en NTA, en donde NTA o una sal del mismo se hace reaccionar en un medio acuoso a un pH alcalino de al menos 8 con una molécula proteínica que contiene un grupo amino primario en presencia de carbodiimida.

30 WO 2004/036189 da a conocer un método de separación para polipéptidos que utiliza un soporte modificado con quelato metálico. Este soporte comprende NTA unido a una fase sólida modificada con amino por la vía de un cuerpo carboxamida.

35 GB 2.067.203 da a conocer agentes quelantes metálicos que comprenden un soporte y unida al mismo una mezcla de amidas de EDTA unidas a su vez por un solo grupo carboxamida o por dos grupos carboxamida. El uso de este soporte para la purificación de polipéptidos no se da a conocer ni se sugiere.

US 2004/204569 da a conocer una proteína con marcador His que comprende un marcador (His-Asn)₆.

US 2002/164718 da a conocer péptidos de afinidad para cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC) que comprenden un marcador His espaciado con una secuencia de aminoácidos constituida por His, dos aminoácidos alifáticos o amídicos, His, tres aminoácidos básicos o ácidos, His, y un aminoácido alifático o amida.

40 El objeto conforme a la presente invención fue proporcionar nuevos métodos para cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC) a fin de soslayar los problemas asociados con la técnica anterior.

Sorprendentemente, se encontró que una fase sólida basada en EDTA complejada con Ni^{2+} , particularmente una fase sólida en la que un grupo carboxilo de EDTA está unido a grupos amino en la fase sólida, tiene propiedades excelentes en aplicaciones de cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC), particularmente para la purificación de polipéptidos recombinantes que comprenden marcadores poli-histidina. Este descubrimiento era totalmente inesperado: conforme a la bibliografía existente, una fase sólida basada en EDTA no debería ser adecuada para cromatografía de quelatos de níquel, dado que este quelante hexadentado debería ocupar la totalidad de las seis coordinaciones en Ni^{2+} , no dejando supuestamente ninguna para la fijación de un residuo histidina. En contraste con esta expectativa, se encontró que una fase sólida basada en EDTA exhibe no sólo una fijación estable de iones metálicos de transición, particularmente de iones Ni^{2+} , sino que los complejos resultantes con Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} o Cu^{2+} tienen también una selectividad alta para proteínas marcadas con histidina.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un quelante inmovilizado que tiene seis o más grupos de coordinación para cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC), particularmente para purificación de proteínas marcadas con poli-histidina. El quelante inmovilizado es una amida de ácido policarboxílico

que tiene seis o más grupos de coordinación, que se seleccionan particularmente de grupos amino, carboxilo, carboxamida e hidroxamato.

El quelante inmovilizado es una fase sólida que tiene un ácido policarboxílico inmovilizado a ella con una estructura de fórmula (Ia):

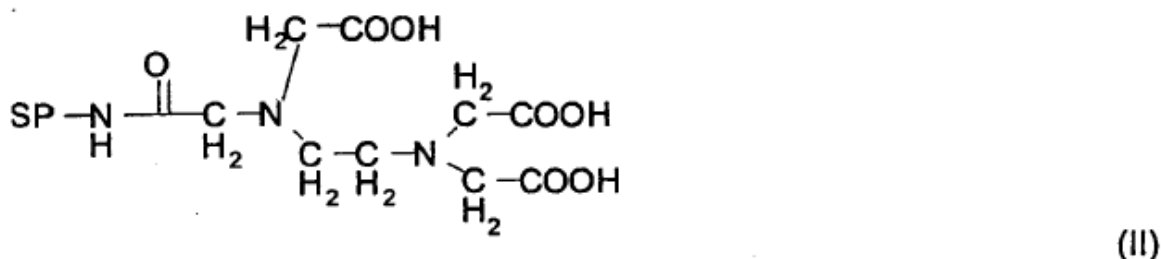


en donde SP es una fase sólida;

R¹ es hidrógeno o un residuo orgánico que no interfiere con la aplicación de la fase sólida, v.g. un radical alquilo C₁-C₃, y

PCA es el residuo de un ácido policarboxílico, particularmente de un ácido amino-policarboxílico, o una sal del mismo.

Aún más preferiblemente, la fase sólida tiene una estructura de fórmula (II):



en donde SP es la fase sólida; y

uno o más de los grupos ácido carboxílico puede estar desprotonizado.

El ácido policarboxílico unido a la fase sólida (Ia), o (II) está complejoado con un ion metálico polivalente, v.g. un ion Ni²⁺.

En algunas realizaciones de la invención, el grupo carboxamida -NR¹-CO- está unido directamente a la fase sólida. En otras realizaciones, el grupo carboxamida está unido a la fase sólida por un enlazador, que puede tener una longitud de 1 átomo hasta 20 átomos, preferiblemente 2-12 átomos, v.g. 2-6 átomos que pueden seleccionarse de átomos de carbono y opcionalmente heteroátomos tales como O y/o N.

Otro aspecto adicional de la presente invención es un método de purificación de un polipéptido recombinante que comprende los pasos: (a) proporcionar una muestra que comprende un polipéptido con una pluralidad de residuos histidina, v.g. una pluralidad de residuos histidina consecutivos, (b) poner en contacto la muestra con una fase sólida como se describe arriba que contiene un ion metálico formador de complejos precombinado, v.g. un ion Ni²⁺, en condiciones en las cuales el polipéptido recombinante se une selectivamente a la fase sólida, (c) separar el polipéptido recombinante unido de otros componentes de la muestra, y (d) eluir el polipéptido recombinante de la fase sólida.

El ácido policarboxílico tiene 6 o más, v.g., 6, 7 u 8 grupos de coordinación. Preferiblemente, el ácido policarboxílico tiene 4, 5 o más grupos ácido carboxílico. El ácido policarboxílico puede ser un ácido amino-, nitrilo- o éter policarboxílico, prefiriéndose los ácidos amino-policarboxílicos, particularmente ácidos amino-policarboxílicos o grupos amino terciarios. Ejemplos específicos de ácidos policarboxílicos son ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido dietileno-triamino-pentaacético (DTPA) y ácido trietilenotetraamina-N,N,N',N',N'',N''-hexaacético (TTHA). Es especialmente preferido EDTA.

El ácido policarboxílico está unido preferiblemente a una fase sólida que comprende grupos amino primarios o secundarios. La unión se lleva a cabo en condiciones que permiten la fijación selectiva de un solo grupo carboxilo del ácido policarboxílico a la fase sólida sin necesidad de aislar una forma activada o derivatizada del ácido policarboxílico tal como un anhídrido, un éster activo, o una forma en la que un grupo amino primario o secundario del ácido policarboxílico se ha mantenido accesible para un paso de acoplamiento subsiguiente. Por medio de la reacción entre el grupo carboxilo y los grupos amino, se forma un enlace carboxamida. La fase sólida puede ser, v.g., un soporte cromatográfico amino-funcionalizado. Por ejemplo, la fase sólida puede seleccionarse de carbohidratos amino-funcionalizados tales como agarosa, Sepharosa, o celulosa, metales o semimetales tales como

silicio u óxidos de los mismos tales como sílice, vidrio, plásticos tales como poliestireno o lípidos tales como fosfolípidos que contienen fosfatidiletanolamina o fosfatidilserina. Adicionalmente, la fase sólida puede comprender partículas, v.g. vesículas, cuentas magnéticas, vesículas de puntos cuánticos, o proteínas. Los grupos amino en la fase sólida son preferiblemente grupos amino primarios o secundarios, v.g. grupos amino primarios alifáticos.

- 5 La amino-funcionalización de la fase sólida puede llevarse a cabo por métodos conocidos, v.g., por reacción de un silano que contiene el grupo amino tal como aminopropil-trietoxisilano con una fase sólida tal como sílice o vidrio o por reacción de amoníaco con una fase sólida activada con epoxi. Preferiblemente, la amino-funcionalización de sílice o vidrio se lleva a cabo con aminopropil-trimetoxi-silano o aminopropil-trietoxi-silano. Los carbohidratos, tales como agarosa, Sepharosa, o celulosa se activan preferiblemente en primer lugar con epoxi, v.g., con epíclorhidrina o epibromhidrina para dar matrices activadas con epoxi y se tratan luego con exceso de amoníaco, una amina primaria, o una hidroxilamina para proporcionar matrices modificadas con amino.

- 10 La densidad de grupos amino en la fase sólida puede variar por las condiciones de reacción de la amino-funcionalización, v.g., temperatura, duración y/o concentración de las sustancias reaccionantes. Por ejemplo, el agente de aminofuncionalización puede diluirse con un agente pasivante, v.g., un silano que no contiene grupos amino, a fin de reducir la densidad de grupos amino en la superficie, en caso necesario. La sustancia reaccionante que contiene grupos amino puede diluirse a una concentración de v.g. 1-50% con un agente pasivante, preferiblemente con el producto de reacción entre glicidil-oxipropil-trimetoxi-silano y 3-mercapto-1,2-propanodiol. Alternativamente, la densidad de grupos amino puede aumentarse utilizando agentes di- o polifuncionales, que contienen dos o más grupos amino primarios o secundarios tales como 1,13-diamino-4,7,10-trioxatridexano. De este modo puede aumentarse la afinidad de la matriz para las proteínas marcadas con His. Así, las condiciones de reacción pueden seleccionarse de modo que se obtenga un producto final con características deseadas, v.g. tal que las proteínas marcadas con His se unan específicamente al producto final, mientras que la unión por ruido de fondo de otras proteínas es mínima. La densidad óptima de grupos amino puede determinarse empíricamente para cada soporte sólido con arreglo a procedimientos descritos en los Ejemplos.

- 25 Por ejemplo, la purificación de proteínas con un marcador histidina largo, que contiene v.g. ≥ 10 residuos histidina, se lleva a cabo preferiblemente con una superficie que tiene una densidad menor de grupos amida de ácido policarboxílico complejados con Ni^{2+} que la purificación de proteínas que tienen un marcador de 6 residuos histidina. Inversamente, la purificación en condiciones desnaturizantes, v.g. en presencia de cloruro de guanidinio, se lleva a cabo preferiblemente con una densidad mayor de grupos quelantes que una purificación en condiciones naturales.

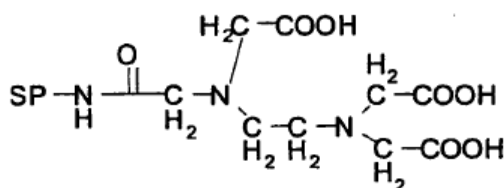
- 30 En el paso inmediatamente siguiente, se lleva a cabo una reacción de condensación entre un grupo carboxilo del ácido policarboxílico y un grupo amino en la superficie. La Figura 1 muestra una representación esquemática de esta reacción ilustrada con EDTA como ácido policarboxílico.

- La reacción se lleva a cabo en presencia de un agente de condensación, que puede seleccionarse de carbodiimidas, carbonatos tales como carbonato de di(N-succinimidilo), tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio o compuestos análogos. Se prefieren carbodiimidas tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), o N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Se encontraron condiciones de reacción en las que un solo grupo carboxilo del ácido policarboxílico reacciona con los grupos amino en la fase sólida cuando el ácido policarboxílico está presente en un exceso molar suficiente referido a los grupos amino y/o el agente de condensación. En una realización preferida, para obtener una matriz altamente específica para IMAC, se seleccionan condiciones de reacción en las que los grupos amino se hacen reaccionar de modo sustancialmente cuantitativo con el ácido policarboxílico. Para ello, debería utilizarse un exceso molar de al menos dos veces, preferiblemente un exceso molar de al menos 4 veces del agente de condensación y un exceso de al menos 5 veces, preferiblemente un exceso molar de al menos 10 veces y más preferiblemente un exceso molar de al menos 25 veces, del ácido policarboxílico referido a grupos amino (véanse los Ejemplos).

- 45 La reacción se lleva a cabo preferiblemente en una fase acuosa. Las condiciones de reacción son preferiblemente pH 5-9, más preferiblemente pH 7-8,5. El ácido policarboxílico se utiliza preferiblemente próximo al límite de saturación (v.g. 0,5 M para EDTA y 0,1 M para EGTA) y el agente de condensación a 1/10-1/50 de la concentración del ácido policarboxílico.

- 50 El producto de reacción es una fase sólida que tiene un ácido policarboxílico inmovilizado a ella por un enlace estable de amida de ácido carboxílico. Preferiblemente, la fase sólida tiene la estructura de la fórmula (Ia) inmovilizada como se ha indicado arriba. Preferiblemente, el residuo de ácido policarboxílico inmovilizado tiene todavía al menos 3, 4 o más grupos carboxilo y opcionalmente grupos quelantes adicionales tales como grupos amino o éter.

Si el ácido policarboxílico es EDTA, la fase sólida tiene preferiblemente una estructura de fórmula (II):



(II)

en donde SP es la fase sólida.

La fase sólida, v.g. la fase sólida EDTA-amida tiene una afinidad alta para iones metálicos polivalentes, tales como iones metálicos de transición, v.g. iones Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} o Cu^{2+} . Varias combinaciones de estos iones metálicos con quelantes inmovilizados conforme a esta invención proporcionan matrices altamente selectivas para fijación de proteínas marcadas con histidina, con menos fijación inespecífica que el grupo NTA inmovilizado tradicionalmente (véanse las Figuras 2 y 3).

En una realización preferida, la fase sólida está exenta de modo sustancialmente cuantitativo de grupos amino accesibles, v.g. grupos amino primarios, y/o grupos hidroxilo, dado que los grupos amino sin reaccionar pueden causar unión de Ni^{2+} con afinidad baja y unión altamente inespecífica por ruido de fondo de polipéptidos que no son portadores de marcador His. Por tanto, puede ser deseable que $\geq 90\%$, preferiblemente $\geq 95\%$ y más preferiblemente $\geq 99\%$ de los grupos amino accesibles, particularmente grupos amino primarios en la superficie de la fase sólida estén bloqueados, v.g. por reacción con el ácido policarboxílico mediada por el agente de condensación. La cantidad de grupos accesibles sin reaccionar, v.g. grupos amino primarios, puede determinarse conforme a métodos conocidos, v.g. por un test de ninhidrina o una reacción OPA (aldehído orto-ftálico/mercaptopano).

Adicionalmente, se prefiere que la fase sólida, v.g. la fase sólida EDTA-amida, esté sustancialmente exenta de iones metálicos polivalentes débilmente unidos, tales como iones Ni^{2+} . Los presentes inventores han encontrado que cuando se satura inicialmente una matriz EDTA-amida con iones Ni^{2+} , una cantidad significativa de los mismos puede permanecer unida sólo débilmente a ella, en particular cuando el soporte sólido contiene todavía grupos amina sin reaccionar. Esta fracción de Ni^{2+} unida débilmente puede detectarse con reactivos adecuados, v.g. dimetilglioxima. Por ejemplo, después de añadir 0,2-1 volumen de dimetilglioxima al 1% p/v disuelta en etanol a una matriz cargada con Ni^{2+} en tampón Tris de pH 7,5 y agitar la mezcla mediante sacudidas durante 15 minutos a 60°C , cualesquiera iones Ni^{2+} débilmente unidos pueden detectarse como un precipitado de color rosado. Los iones metálicos débilmente unidos pueden causar problemas, a saber una contaminación de una muestra que contiene proteína con iones Ni^{2+} tóxicos y oxidantes, y una unión inespecífica incrementada de proteínas no marcadas con His.

Así pues, la fase sólida está con preferencia sustancialmente exenta de iones metálicos débilmente unidos, particularmente iones Ni^{2+} débilmente unidos. Los iones metálicos débilmente unidos pueden, v.g., separarse de la fase sólida poniendo en contacto la fase sólida con un quelante de ácido policarboxílico libre, v.g. NTA o EGTA o EDTA, con preferencia a aproximadamente pH 7,5, v.g. con NTA 40 mM o EGTA 10 mM o EDTA 10 mM, hasta que los iones metálicos débilmente unidos llegan a ser indetectables, v.g. por contacto de la matriz con un reactivo de detección adecuado para el ion metálico respectivo, v.g. dimetilglioxima para detección de iones Ni^{2+} . Después de la separación de los iones metálicos débilmente unidos, los iones remanentes se mantienen unidos tan fuertemente que incluso una incubación durante una noche a la temperatura ambiente con un volumen igual de EDTA 0,5 M (pH 7,5) es insuficiente para una separación completa de la matriz EDTA-amida. En contraste, debería indicarse que el pre-lavado de Ni-NTA-agarosa (Qiagen) disponible comercialmente o de una matriz Ni-NTA-amida con NTA 40 mM, o EGTA 10 mM, o EDTA 10 mM, separa no sólo los iones Ni^{2+} débilmente unidos, sino al parecer la totalidad de los iones Ni^{2+} unidos (Fig. 4).

Sorprendentemente, no se encontró indicación alguna de que la conversión de un grupo carboxilo en EDTA a un grupo carboxamida pudiera debilitar la afinidad para Ni^{2+} a pH neutro. En lugar de ello, el oxígeno del carbonilo o el grupo amino de la carboxamida pueden incorporarse aparentemente en un enlace coordinado a Ni^{2+} , lo que sugiere que EDTA-amida es un quelante realmente hexadentado. El hecho de que un grupo carboxamida puede coordinar Ni^{2+} es evidente, v.g., a partir de metil-coenzima M-reductasas, donde cuatro sitios de coordinación para Ni^{2+} son proporcionados por la Coenzima F430 y el quinto por la carboxamida de una cadena lateral glutamina (Ermler et al, Science 278 (1997), 1457).

La fase sólida puede utilizarse para cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC). En este método cromatográfico, polipéptidos que comprenden una pluralidad de residuos histidina, v.g. residuos histidina consecutivos, v.g. al menos 6 residuos histidina consecutivos se unen selectivamente a la fase sólida del complejo metálico y se separan de otros componentes. El polipéptido puede eluirse de la fase sólida por adición de un agente de elución adecuado tal como imidazol. La concentración de imidazol está comprendida preferiblemente en el intervalo de 1 a 100 mM, dependiendo de la densidad de grupos activos inmovilizados, la longitud del marcador polihistidina, y el estado múltiplo de la proteína marcada.

Para que la purificación por IMAC de las proteínas marcadas con His funcione, se creía hasta ahora que el quelante inmovilizado debería ocupar sólo 3-5 de los 6 sitios de coordinación de Ni^{2+} . Por tanto, es un aspecto inesperado de esta invención que quelantes hexadentados inmovilizados tales como EDTA-amida o EDTA-hidroxamida e incluso quelantes con más de 6 grupos de coordinación funcionen extremadamente bien para esta aplicación. Al parecer, las cadenas laterales de histidina pueden desplazar transitoriamente grupos débilmente coordinantes en un quelante dado. Así, conforme a una realización de la invención, el quelante inmovilizado, es decir la amida de ácido policarboxílico inmovilizada tiene 6 o más grupos de coordinación, seleccionados particularmente de grupos amino, carboxilo, carboxamida, e hidroxamato.

En la fase sólida de la invención, v.g. EDTA-amida, pueden formarse complejos muy estables cinéticamente, v.g. con Ni^{2+} . Las matrices resultantes son extremadamente resistentes a la extracción de Ni^{2+} , v.g. por EGTA o NTA. Incluso EDTA 0,5 M extrae Ni^{2+} sólo muy lentamente, es decir en una escala de tiempo de horas a días. La resistencia a la extracción de Ni^{2+} aumenta adicionalmente por inclusión de imidazol, v.g. imidazol 1 mM en el tampón. Por tanto, IMAC con una fase sólida de la invención, v.g. una matriz EDTA-amida, puede realizarse en presencia de un quelante inhibidor de metaloproteasas, v.g. EDTA en concentraciones de 1-10 mM, v.g. 5 mM.

Las matrices tradicionales Ni-quelato, tales como Ni-NTA-agarosa, son fácilmente reducidas por agentes protectores de proteínas tales como ditiotretol (DTT). Incluso concentraciones milimolares bajas de DTT extraen níquel en la forma de productos de reducción parduscos. En contraste, las matrices Ni^{2+} EDTA-amida, de las cuales se había separado Ni^{2+} débilmente unido, no presentan estos problemas. En lugar de ello, sobre Ni^{2+} -EDTA-amida-sílice los autores de esta invención pudieron purificar con éxito proteínas marcadas con His en presencia de concentraciones extremadamente altas de DTT, v.g. de 0,5 M o 1 M DTT (Figura 5), que es una concentración de DTT 100 a 1000 veces mayor que la utilizada en los esquemas típicos de purificación de proteínas. Así, en una realización preferida, el ion metálico, v.g. la fase sólida que contiene el ion Ni^{2+} de la invención es estable en presencia de un agente reductor que contiene tiol o que contiene ditiol, v.g. DTT, en una concentración de al menos 10 mM, preferiblemente de al menos 20 mM, más preferiblemente de al menos 50 mM, y aún más preferiblemente de al menos 100 mM o incluso de al menos 500 mM, y hasta 1000 mM o mayor aún, con preferencia durante al menos 1 hora a la temperatura ambiente.

En una realización especialmente preferida de la presente invención, la cromatografía se lleva a cabo con un polipéptido recombinante que comprende una pluralidad de residuos histidina en un "marcador histidina espaciado", preferiblemente en una secuencia $[\text{H}_n\text{S}_m]_k$ en donde H es histidina, S es un residuo espaciador seleccionado de glicina y/o serina y/o treonina, n es 1-4, m es 1-6, preferiblemente 1-4, y k es 2-8, preferiblemente 2-6. La longitud del marcador es preferiblemente de 8 a 50 aminoácidos, más preferiblemente de 12 a 40 aminoácidos. La presente invención comprende también marcadores histidina espaciados irregularmente, donde las longitudes de las agrupaciones de oligo-histidina y las longitudes de las regiones espaciadoras varían dentro de una secuencia de marcador dada. El marcador histidina espaciado está localizado preferiblemente en el término N y/o en el término C del polipéptido recombinante y/o insertado en la secuencia del polipéptido recombinante.

Adicionalmente, la invención se explica con mayor detalle por las Figuras y Ejemplos que siguen.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Esquema para el acoplamiento de EDTA a un soporte que contiene amina. La reacción se lleva a cabo en condiciones en las que tiene lugar una reacción selectiva entre un solo grupo carboxilo de EDTA con el grupo amino en el soporte.

Figura 2: Comparación de la especificidad de fijación de proteínas de diversas matrices cromatográficas que contienen Ni^{2+} en IMAC. Se muestran las características de fijación de proteínas de diversas proteínas marcadas con His, a saber una matriz comparativa (NTA-Qiagen) y tres matrices de inventiva (EDTA-amida-sílice I, EDTA-amida-sílice II y EDTA-amida-Sepharosa) (véase el Ejemplo 5 para detalles).

Figura 3: Combinación de diversos quelantes e iones metálicos de transición para IMAC.

Se muestran las propiedades de fijación de proteínas de diversas matrices (matrices EDTA, EGTA y TTHA de inventiva y una matriz NTA) con diferentes quelantes en presencia de diversos iones metálicos de transición (véase el Ejemplo 6 para detalles).

Figura 4: Resistencia de las matrices Ni-quelato contra la extracción de Ni^{2+} por quelantes libres.

Se muestra la fuerza de la unión de Ni^{2+} a una matriz EDTA-amida de inventiva y matrices NTA comparativas (véase el Ejemplo 7 para detalles).

Figura 5: Resistencia de varias matrices Ni-quelato contra agentes reductores que contienen tiol.

Se muestra la resistencia de diversas matrices quelantes que contienen Ni^{2+} (una matriz EDTA-amida de inventiva y matrices NTA comparativas) contra la extracción y reducción de Ni^{2+} en presencia de DTT (véase Ejemplo 8 para detalles).

Figura 6: Caracterización de marcadores poli-histidina espaciados.

A) Se muestran las características de fijación de marcadores poli-His de inventiva espaciados (H14 espaciados, H21 espaciados y H28 espaciados) y marcadores His comparativos (MRGS6 y H10).

5 B) Se muestran la expresión de proteínas que contienen un marcador His espaciador de inventiva y un marcador His comparativo (H10) (véase el Ejemplo 9 para detalles).

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de Ni-EDTA-amida Sepharosa 4B

Se somete a prelavado 1 litro de Sepharosa 4B en un embudo de vidrio con 1 litro de NaOH 0,1 M (en agua), seguido por 5 veces 1 litro de agua pura, se transfiere a un matraz de 5 litros, y se completa con agua hasta un volumen de 2 litros. Se añaden 0,8 moles de NaOH, se ajusta la temperatura a 25°C, seguido por adición de 1,0 moles de epibromhidrina. La mezcla se agita luego mediante sacudidas durante 2 horas a 25°C, y se enfría luego en hielo. La Sepharosa epoxi-activada resultante se recupera subsiguientemente por filtración a través de un embudo de vidrio, se lava con agua, y se resuspende en NH₄Cl 2 M (concentración final en agua, volumen final 2 litros). Se añaden 4 moles de NH₃ a partir de una solución acuosa al 25% y la mezcla se agita mediante sacudidas durante una noche a la temperatura ambiente.

La NH₂-Sepharosa 4B resultante se recupera por filtración, se lava con agua hasta que el NH₃ libre se hace indetectable, y se resuspende en EDTA/Na⁺ 0,5 M de pH 8,0 (concentración final, volumen final 2 litros). Se añaden finalmente 50 mmoles de EDC y la mezcla se sacude durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de ello, se añade otra parte alícuota adicional de 50 mmoles de EDC y se deja transcurrir la reacción durante una noche.

20 La EDTA-amida-Sepharosa resultante se recupera por filtración y se lava hasta que la concentración de EDTA libre ha descendido por debajo de 1 mM. Se carga luego la Sepharosa con NiCl₂ 20 mM en tampón Tris de pH 7,5, hasta que aparece Ni²⁺ libre en la fracción no combinada. Se eliminan luego los iones Ni²⁺ libres y débilmente unidos por lavado con agua, NTA 10 mM de pH 7,5, agua, y finalmente se resuspende en 30% etanol + imidazol/HCl 10 mM + NTA 1 mM, de pH 7,5, para almacenamiento a largo plazo.

25 Las propiedades de la Ni²⁺-EDTA-amida Sepharosa pueden ajustarse por variación del paso epoxi-activación. El acoplamiento a temperatura más alta (hasta 40°C) y la utilización de concentraciones mayores de epiclorhidrina y NaOH (hasta epiclorhidrina 1,2 M y NaOH 1,0 M, respectivamente) dará como resultado mayor densidad de acoplamiento, pero también mayor fijación de ruido de fondo. Una temperatura más baja (hasta 18°C) utilizando una concentración menor de epiclorhidrina y NaOH (hasta epiclorhidrina 0,2 M y NaOH 0,1 M, respectivamente) dará como resultado menor densidad de acoplamiento, y menor fijación aún de ruido de fondo, pero también menor capacidad de fijación específica, en particular para proteínas con marcadores His cortos.

Ejemplo 2: Preparación de cuentas magnéticas EDTA-amida.

35 Se lavan en agua 5 ml de cuentas magnéticas terminadas en amina (Sigma #17643-5ml) y se resuspenden en un volumen final de 5 ml en EDTA/Na⁺ 0,5 M de pH 8,0. Se añade una parte alícuota de 125 µmoles de EDC y la reacción se agita mediante sacudidas durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de ello, se añade otra parte alícuota de 125 µmoles de EDC y se continúa la reacción durante una noche.

Las cuentas magnéticas EDTA-amida resultantes se recuperan por separación magnética, se lavan con agua, y se cargan con Ni²⁺ u otro ion metálico análogamente al Ejemplo 1.

Ejemplo 3: Preparación de EDTA-amida-sílice de alta densidad.

40 Se resuspenden 100 g de Davisil XWP1000A 90-130 (Grace) en 500 ml de aminopropil-trietoxi-silano al 3% (v/v), 4% de agua, 93% etanol y se agita suavemente mediante sacudidas durante 2 horas a 40°C y luego durante una noche a la temperatura ambiente. La sílice modificada con amino se recupera por filtración y se elimina el silano libre por lavado con agua pura. El acoplamiento covalente a EDTA y la carga con Ni²⁺ se realizan como se describe para Sepharosa 4B. Para almacenamiento de larga duración, el producto puede secarse a fin de dejarlo exento de agua o isopropanol.

Ejemplo 4: Preparación de EDTA-amida-sílice con una superficie pasivada.

50 La Ni²⁺ EDTA-amida-sílice del Ejemplo 3 adolece todavía de fijación fuerte a ruido de fondo cuando se utiliza en IMAC. Este ruido de fondo puede ser probablemente resultado de grupos silanol y amino residuales (que por razones estéricas podrían no reaccionar con el EDTA activado) y/o de concentraciones superficiales altas de EDTA-amida. El problema del ruido de fondo puede resolverse por inclusión de un silano pasivador durante la modificación de la sílice con aminopropil-silano. El silano pasivador óptimo hasta ahora es el producto de reacción entre glicidil-oxipropil-trimetoxi-silano y 3-mercaptopropanodiol.

Se mezclan 3 ml de glicidil-oxipropil-trimetoxi-silano con 3 ml de 2-mercapto-1,3-propanodiol, 90 ml de metanol, 4 ml de agua y 10 μ L de 4-metil-morfolina, y se deja transcurrir la reacción durante 30 minutos a 25°C. Se añaden 150 μ L de aminopropil-trimetoxi-silano, y la mezcla resultante se utiliza para modificar 30 g de Davisil XWP1000A 90-130 como se ha descrito arriba. La ratio entre el aminosilano y el silano pasivante se define en este Ejemplo como 5%.

- 5 Sin embargo, la misma puede modificarse entre 1% y 50%. La amino-sílice pasivada resultante se hace reaccionar luego con EDTA u otro grupo quelante, se carga con iones metálicos, y se trata para separar los iones metálicos unidos débilmente como se ha descrito arriba.

Ejemplo 5: Comparación de soportes cromatográficos que contienen Ni^{2+} en IMAC

Se ensayaron los soportes cromatográficos siguientes:

"NTA-Qiagen":	Ni^{2+} -NTA Agarosa adquirida de Qiagen
"EDTA-amida-sílice I":	EDTA-amida-sílice cargada con Ni^{2+} con 20% de densidad de acoplamiento (Ejemplo 4)
"EDTA-amida-sílice II":	EDTA-amida-sílice cargada con Ni^{2+} con 5% de densidad de acoplamiento (Ejemplo 4)
"EDTA- amida-Sepharosa":	EDTA-amida cargada con Ni^{2+} Sepharosa 4B (Ejemplo 1)

10

Se resuspendieron células de *E. coli* en tampón (Tris 50 mM/HCl pH 7,5, acetato de magnesio 2 mM, NaCl 50 mM, mercaptoetanol 5 mM). Se preparó un lisado y se clarificó por ultracentrifugación. A continuación, se añadieron 1 μ M de una proteína de fusión ("NES-YFP- H_{10} ") que comprendía una señal de exportación nuclear (NES), la proteína fluorescente amarilla (YFP) y un marcador deca-His C-terminal, o 1 μ M de una fusión entre la proteína de fijación de maltosa (MBP) con un marcador hexa-His C-terminal ("MBP- H_6 "), o 0,5 μ M de una proteína de fusión que contenía una proteína deca-His, un marcador zz y la exportina de ratón CRM1 (" H_{10} -ZZ-CRM1"), y se utilizaron como materiales de partida para los experimentos de fijación. Para purificación de las proteínas marcadas con deca-His, los materiales de partida se suplementaron con imidazol 1 mM.

15

Se mantuvieron en rotación en cada caso 400 μ L del material de partida durante una noche a 4°C con 10 μ L de soporte cromatográfico. Después de lavado con 5 ml de tampón, se eluyeron las proteínas fijadas con imidazol 0,4 M de pH 7,5. El análisis se realizó por SDS-PAGE sobre gel de acrilamida al 12%, seguido por tinción con Coomassie. La carga corresponde a 0,5 μ L de matriz.

20

La Figura 2 muestra los resultados para NES-YFP- H_{10} (panel A), MBP- H_6 (panel B) y H_{10} -ZZ-CRM1 (panel C). Todas las matrices ensayadas exhiben fijación eficiente de las proteínas marcadas con His. Las matrices de la presente invención presentan sin embargo ruidos de fondo significativamente menores comparadas con la matriz NTA-Qiagen.

25

Ejemplo 6: Ensayos de diversos quelantes e iones metálicos de transición para IMAC

Se conjugó amino-sílice con 5% de densidad de acoplamiento (como se describe en el Ejemplo 4) con EDTA, EGTA, NTA, o TTHA. Cada una de las matrices resultantes se cargó luego con Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} o Cu^{2+} . Los ensayos de fijación para NES-YFP- H_{10} se realizaron como se describe en el Ejemplo 5; sin embargo, se incluyeron 100 mM de NaCl en el tampón de lavado.

30

La Figura 3 muestra que las combinaciones ensayadas de matrices e iones metálicos exhiben fijación eficiente de NES-YFP- H_{10} .

Ejemplo 7: Resistencia de las matrices Ni-quelato contra la extracción de Ni^{2+} por quelantes libres.

Se lavaron en cada caso 1 ml de Ni^{2+} -EDTA-amida-sílice (densidad de acoplamiento 50%; preparada conforme al Ejemplo 4) Ni^{2+} -NTA-amida-sílice (densidad de acoplamiento 50%), o Ni^{2+} -NTA-agarosa (Qiagen) durante un tiempo de 45 minutos con 30 ml de tampón Tris, o EDTA 10 mM de pH 7,6, o EGTA 10 mM de pH 7,6, o NTA 40 mM de pH 7,6, seguido por equilibración en tampón de fijación (Tris 50 mM/HCl, de pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl_2 5 mM). Se utilizaron luego 10 μ L de cada matriz pretratada para fijar una fusión His₁₀-MBP-GFP (concentración 10 μ M) a partir de 600 μ L de lisado de *E. coli*. La fracción fijada se eluyó con 75 μ L de imidazol 1 M/HCl de pH 7,5. Se analizó luego 1 μ L de cada eluato por SDS-PAGE seguido por tinción con Coomassie. Los resultados se muestran en la Figura 4A. La matriz de inventiva Ni^{2+} -EDTA-amida-sílice era completamente resistente contra todas las soluciones de quelantes ensayadas. Las matrices comparativas eran significativamente menos resistentes. Se descargó Ni^{2+} -NTA-agarosa por cualquiera de los tratamientos con quelantes libres. Ni^{2+} -NTA-amida-sílice era descargada completamente por EDTA 10 mM y NTA 40 mM, pero tenía una pequeña actividad después del tratamiento con EGTA.

35

40

45

Las matrices lavadas con quelantes del panel representado en la Figura 4A se equilibraron en Tris/HCl 100 mM de pH 7,5, se mezclaron con un volumen igual de dimetilglioxima al 1% (disuelta en etanol) y se incubaron durante 15 min a 60° y subsiguientemente durante una noche a la temperatura ambiente, antes de realizar las fotografías. Los resultados se muestran en la Figura 4B. Se produjo un precipitado de dimetilglioxima-Ni²⁺ de color rosado que representaba Ni²⁺ unido débilmente, con Ni²⁺-NTA-amida-sílice sin tratar y con Ni²⁺-NTA-agarosa sin tratar, pero no con la Ni²⁺-EDTA-amida-sílice de inventiva. El prelavado de Ni²⁺-NTA-amida-sílice o de Ni²⁺-NTA-agarosa con los quelantes arriba mencionados separaba el Ni²⁺ unido débilmente en la misma proporción que reducía la capacidad para fijar la proteína marcada con histidina.

Así pues, la fijación de los iones Ni²⁺ a la matriz EDTA-amida de inventiva es significativamente más fuerte que a las matrices de NTA comparativas.

Ejemplo 8: Resistencia de las matrices Ni-quelante contra los agentes reductores que contienen tiol.

Se ensayó la resistencia de diversas matrices quelantes que contienen Ni²⁺ contra ditioneitol (DTT), un agente reductor que contiene tiol.

NTA-agarosa (Qiagen), NTA-amida-sílice y EDTA-amida-sílice se dejaron sin tratar o se incubaron durante una noche a la temperatura ambiente con DTT 1 mM, tamponado con Tris/HCl 1 M de pH 7,5. Los resultados se muestran en la Figura 5A. El tratamiento con DTT convertía Ni²⁺ de NTA-agarosa (Qiagen) y NTA-amida-sílice en productos de reducción parduscos. En contraste, la Ni²⁺-EDTA-amida-sílice se mantenía totalmente inafectada.

Las matrices anteriores (≈ 50 µL) se resuspendieron en 1 ml de Tris/HCl 1 M de pH 7,5 o Tris/HCl 1 M de pH 7,5 + DTT 1 M. Cinco minutos más tarde, se añadió una proteína fluorescente roja marcada con His₁₀ y se mantuvieron en rotación las reacciones de fijación durante una noche a la temperatura ambiente. Las matrices se dejaron sedimentar por gravedad y se tomaron fotografías. Los resultados se muestran en la Figura 5B (panel superior). El color rojo en las cuentas indica fijación de la proteína marcada con His. En ausencia de DTT, todas las matrices fijaban muy bien la proteína marcada con His. El tratamiento con DTT anulaba por completo la fijación a Ni²⁺-NTA-agarosa (Qiagen) y Ni²⁺-NTA-amida-sílice. Las formaciones no fijadas contenían productos de reacción parduscos de Ni²⁺ que se desprendían de las cuentas. En contraste, la fijación de la proteína fluorescente roja marcada con His a la Ni²⁺-EDTA-amida-sílice de inventiva se mantenía inafectada por el tratamiento con DTT.

Las fracciones fijadas se eluyeron con imidazol 1 M de pH 7,3, y se analizaron por SDS-PAGE seguida por tinción con Coomassie. Los resultados se muestran en la Figura 5B (panel inferior). Los análisis confirmaron que DTT 1 M anulaba por completo la fijación de la proteína marcada con His a Ni²⁺-NTA-agarosa o Ni²⁺-NTA-amida-sílice, mientras que la fijación a la Ni²⁺-EDTA-amida-sílice de inventiva no se veía afectada en absoluto.

Ejemplo 9: Caracterización de marcadores poli-histidina espaciados

Una mezcla de derivados de DHFR marcados con diversos marcadores de histidina se fijó a Ni²⁺-EDTA-amida-sílice y se eluyó lentamente con un gradiente de concentración creciente de imidazol. Los resultados se muestran en la Figura 6A. (Las concentraciones reales se dan encima de las pistas). El panel muestra el análisis de las fracciones eluidas por SDS-PAGE/tinción con Coomassie. Los marcadores con números mayores de histidina confieren fijación más fuerte a la matriz, elución a concentración mayor de imidazol, y por consiguiente mejor separación de los contaminantes que no están marcados con poli-histidina. Se han utilizado los marcadores siguientes (los aminoácidos en código de una sola letra):

MRGS6= MRGSHHHHHH (SEQ ID NO:1)

H10= MHHHHHHHHH (SEQ ID NO:2)

H14 espaciado = MSKHHHHS GHHHTGHHHSGSHHH (SEQ ID NO:3)

H21 espaciado = MSKHHHHS GHHHTGHHHSGSHHHHTGHHHSGSHHH (SEQ ID NO:4)

H28 espaciado = MSKHHHHS GHHHTGHHHSGSHHHHTGHHHSGSHHHHTGHHHSGSHHH (SEQ ID NO: 5)

Aunque los marcadores His con más histidinas confieren una fijación más específica a las matrices Ni-quelato, plantean el problema de que tramos continuos de demasiadas histidinas ponen en compromiso los niveles de expresión y la solubilidad en *E. coli*. La interrupción de los tramos continuos de poli-histidina con espaciadores que contienen Gly, Ser, y/o Thre corrige estos problemas. En el Ejemplo representativo que se muestra, la marcación de DHFR con un marcador His₁₄ espaciada duplicaba el rendimiento de proteína soluble durante la expresión recombinante en *E. coli* en comparación con un marcador His₁₀ continua convencional (Figura 6B).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sociedad Max Planck para el Fomento de las Ciencias e.V.

<120> Inmovilización de grupos quelantes para cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC)

<130> 40759P WO

<140> PCT/EP2008

<141> 2008-08-05

<160> 5

<170> PatentIn Versión 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Marcador His MRGS6

<400> 1

Met Arg Gly Ser His His His His His His
1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Marcador His H10

<400> 2

Met His His His His His His His His His His
1 5 10

<210> 3

<211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> | Marcador His "H14 espaciado"

<400> 3

Met Ser Lys His His His His Ser Gly His His His Thr Gly His His
 1 5 10 15

His His Ser Gly Ser His His His
 20

<210> 4
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> | Marcador His "H21 espaciado"

<400> 4

Met Ser Lys His His His His Ser Gly His His His Thr Gly His His
 1 5 10 15

His His Ser Gly Ser His His His Thr Gly His His His His Ser Gly
 20 25 30

Ser His His His
 35

<210> 5
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> | Marcador His "H28 espaciado"

<400> 5

Met Ser Lys His His His His Ser Gly His His His Thr Gly His His
 1 5 10 15

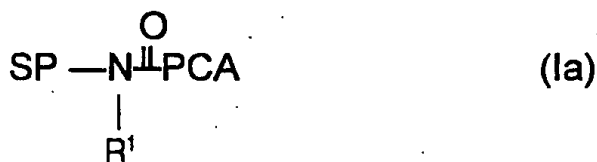
His His Ser Gly Ser His His His Thr Gly His His His His Ser Gly
 20 25 30

Ser His His His Thr Gly His His His His Ser Gly Ser His His His
 35 40 45

REIVINDICACIONES

1. Uso de un quelante que tiene 6 o más grupos de coordinación inmovilizados por un solo grupo carboxilo por medio de un enlace carboxamida para cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC) en la purificación de proteínas recombinantes con una pluralidad de residuos histidina

5 en donde el quelante inmovilizado es una fase sólida que tiene un ácido policarboxílico inmovilizado en ella que tiene una estructura de fórmula (Ia):



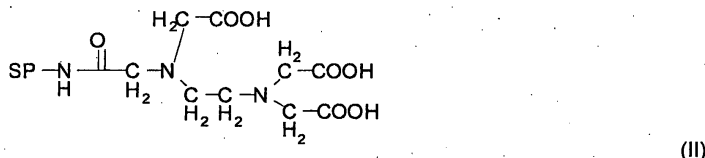
en donde SP es una fase sólida;

10 R^1 es hidrógeno o un residuo orgánico que no interfiere con la aplicación de la fase sólida y PCA es el residuo de un ácido policarboxílico, particularmente de un ácido amino-policarboxílico, o una sal del mismo, y en donde

el quelante está complejoado con un ion metálico polivalente, v.g. un ion metálico de transición, tal como un ion Ni^{2+} .

15 2. El uso de la reivindicación 1, en donde el quelante inmovilizado es una amida de ácido policarboxílico que tiene 6 o más grupos de coordinación, que se seleccionan particularmente de grupos amino, carboxilo, carboxamida e hidroxamato, y en donde el ácido policarboxílico se selecciona particularmente de ácido etileno-diamina-tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético, (EGTA), ácido dietilentriamino-pentaacético (DTPA), y ácido trietilen-tetraamina-N,N,N',N',N'',N''-hexaacético (TTHA), más particularmente de EDTA o sales del mismo.

20 3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en donde la fase sólida tiene una estructura de fórmula (II)

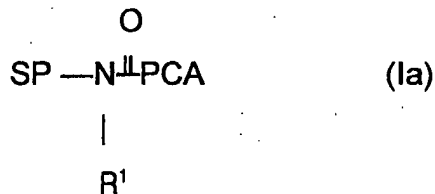


en donde SP es la fase sólida, y

en donde uno o más de los grupos ácido carboxílico puede estar desprotonizado.

4. Un método de purificación de un polipéptido recombinante que comprende los pasos:

25 (a) proporcionar una muestra que comprende un polipéptido con una pluralidad de residuos histidina,
(b) poner en contacto la muestra con una fase sólida que contiene un ácido policarboxílico inmovilizado a ella por un solo grupo carboxilo por medio de un enlace carboxamida que tiene una estructura de fórmula (Ia):



en donde SP es la fase sólida;

30 R^1 es hidrógeno o un residuo orgánico que no interfiere con la aplicación de la fase sólida, y PCA es el residuo de un ácido policarboxílico, particularmente de un ácido amino-policarboxílico, o una sal del mismo, y más preferiblemente el residuo de EDTA o una sal del mismo.

35 en donde la amida o éster del ácido policarboxílico inmovilizado tiene al menos 6 o más grupos de coordinación, que se seleccionan particularmente de grupos amino, carboxilo, carboxamida e hidroxamato; en donde dicha fase sólida contiene un ion metálico complejante pre-combinado, v.g. un ion Ni^{2+} , en condiciones en las cuales el polipéptido recombinante está fijado selectivamente en la fase sólida,

(c) separar el polipéptido recombinante fijado de los otros componentes de la muestra, y

(d) eluir el polipéptido recombinante de la fase sólida.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el polipéptido comprende al menos 6 residuos histidina consecutivos, o en donde el polipéptido comprende al menos 4 residuos histidina en una secuencia $[H_n S_m]_k$, en donde H es un residuo histidina y S es un residuo espaciador, seleccionado de glicina y/o serina y/o treonina, n es en cada caso independientemente 1-4, m es en cada caso independientemente 1-6 y k es 2-6.

Figura 1

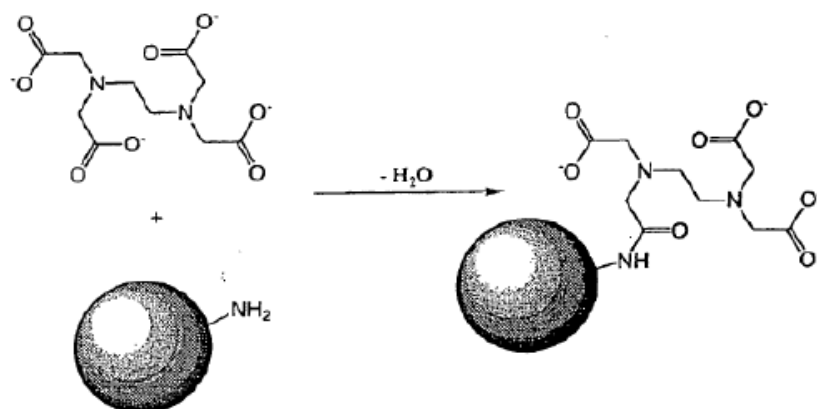


Figura 2

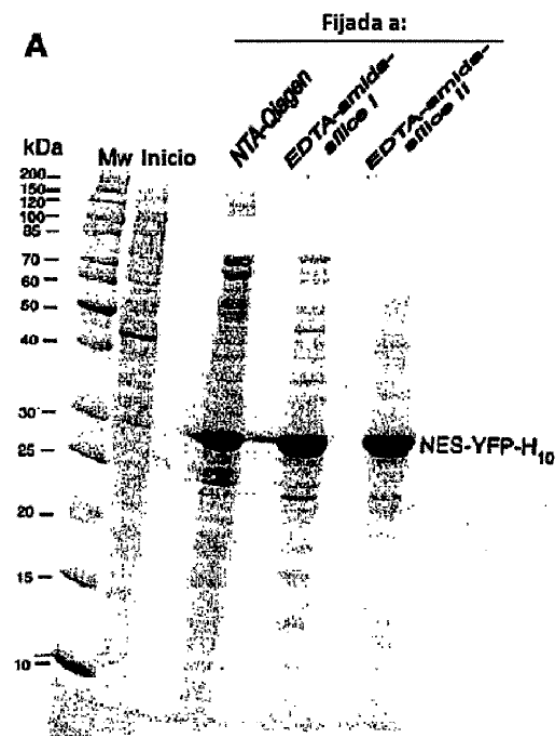


Figura 2

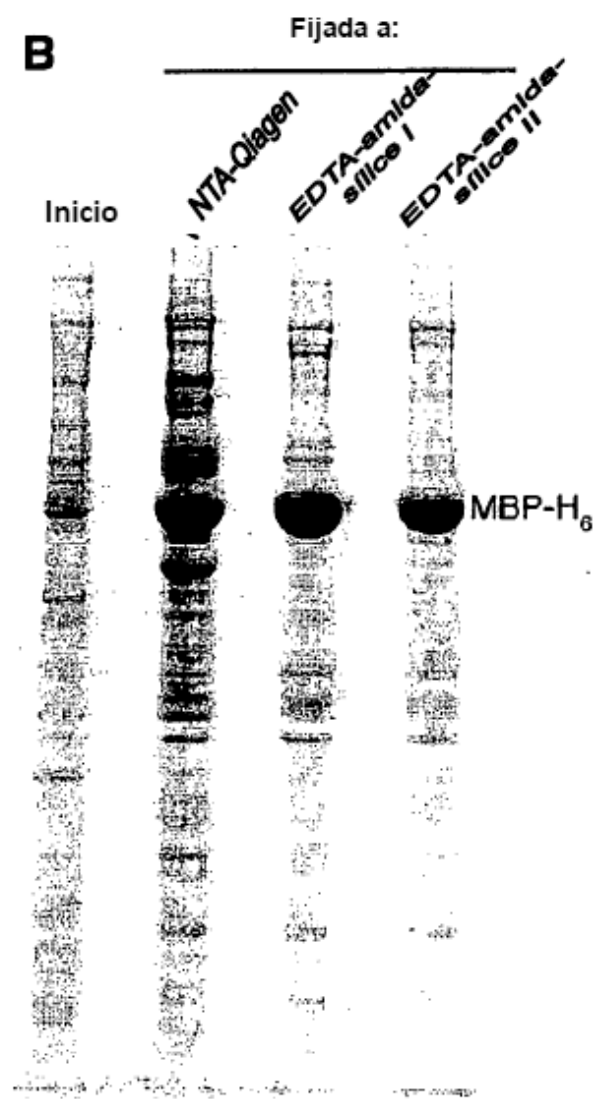


Figura 2

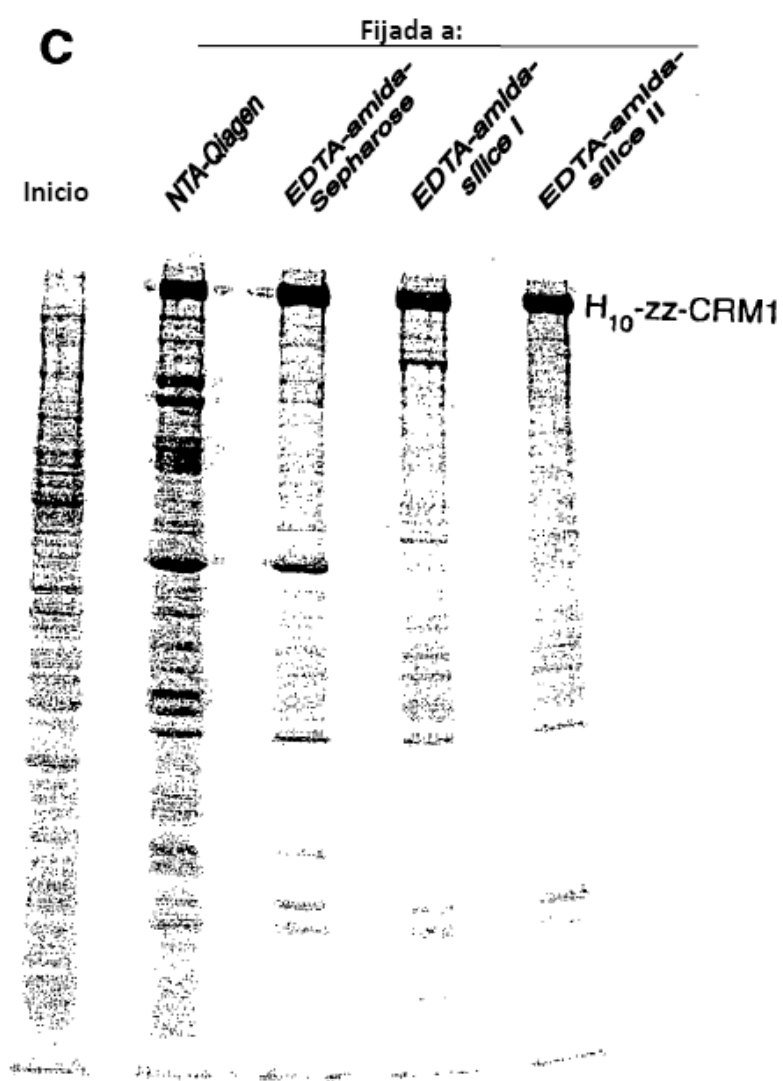


Figura 3

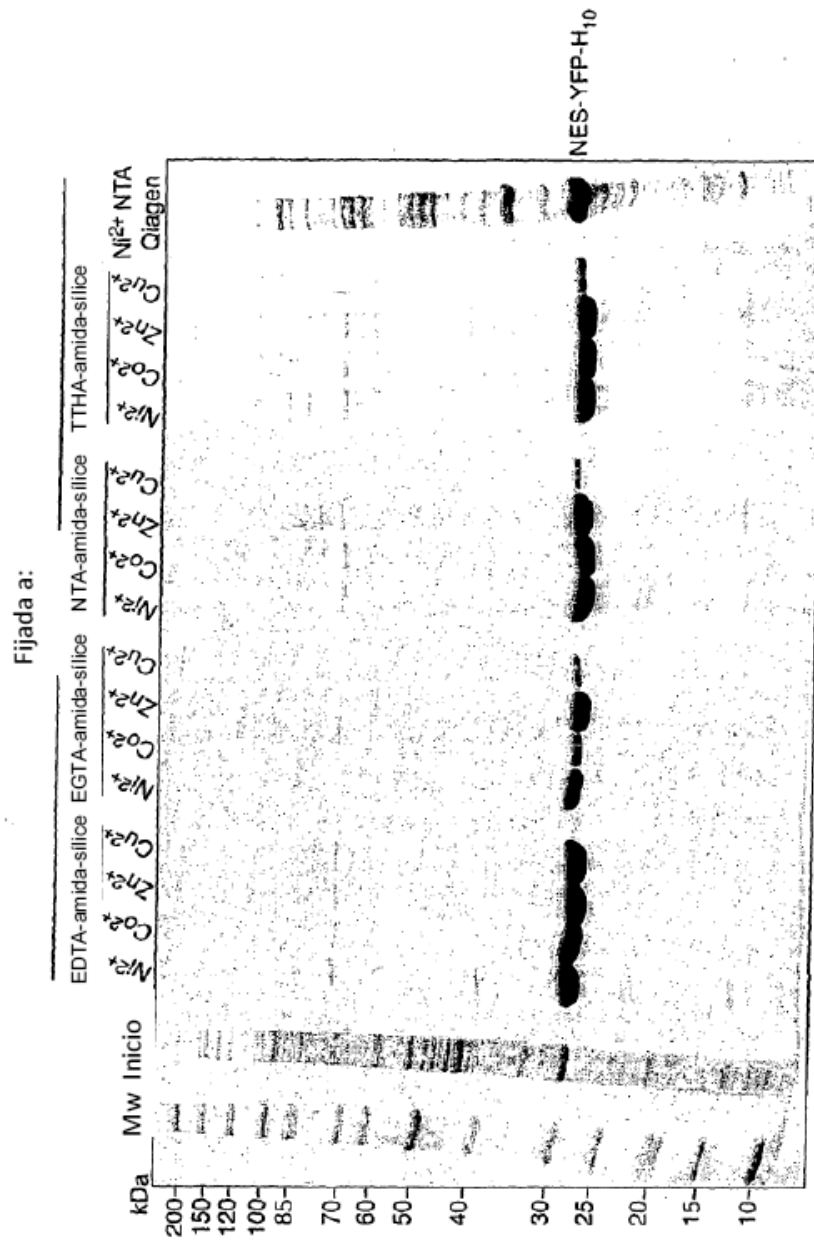


Figura 4

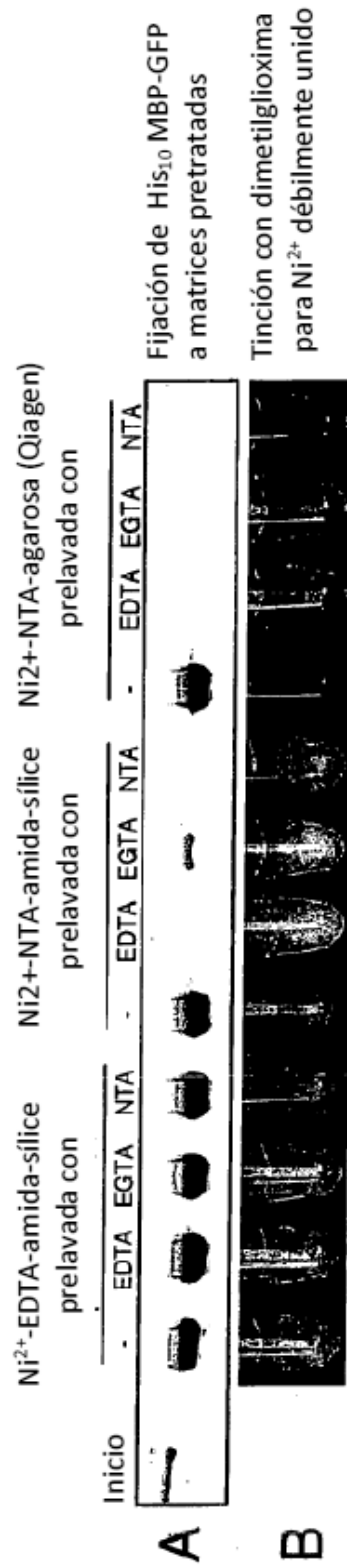


Figura 5

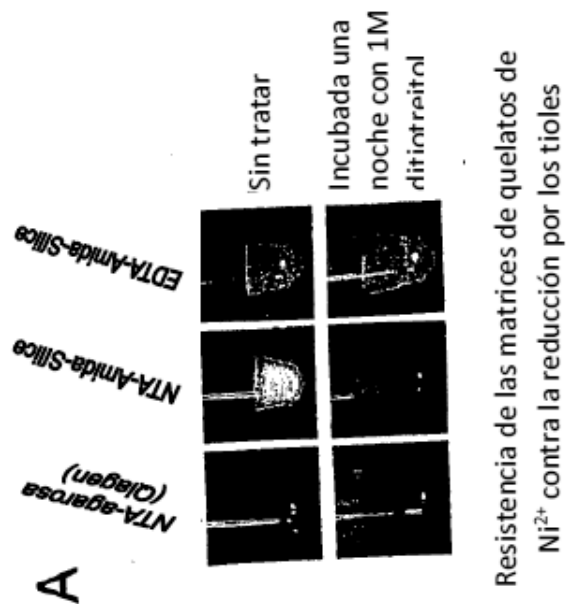
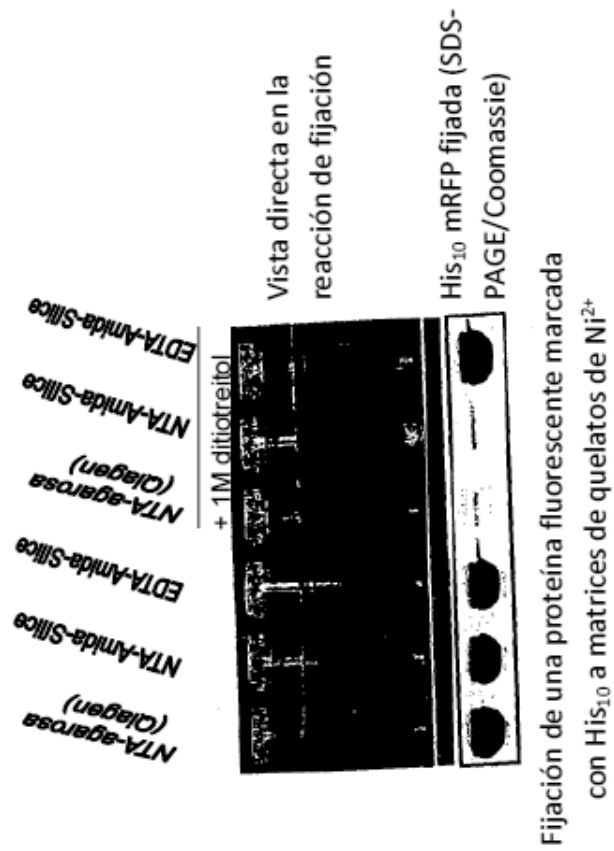


Figura 6

