

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 897**

51 Int. Cl.:

G01N 30/86 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2011 E 11801732 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2656063**

54 Título: **Caracterización de equipos de cromatografía**

30 Prioridad:

21.12.2010 EP 10196288

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

15.12.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BELOUSOV, ANTON;
DAMS, THOMAS y
GERWAT, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 524 897 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

Caracterización de equipos de cromatografía

5 El método informado en la presente memoria se encuentra comprendido en el campo de la cromatografía, especialmente en el campo de la cromatografía de columna preparativa. En la presente memoria se informa de un método para la determinación directa de la calidad del relleno de una columna de cromatografía basada en datos de proceso. Con este método puede conseguirse un ahorro de tiempo y recursos de proceso ya que puede eliminarse una adquisición de datos adicional para la determinación de la integridad de la columna.

10

Antecedentes de la invención

15 Actualmente la práctica totalidad de los polipéptidos utilizados en los medicamentos se preparan recombinantemente. Debido a las estrictas directrices y requisitos normativos, deben eliminarse al máximo los productos secundarios de la preparación de polipéptidos terapéuticos. Por lo tanto, se utiliza por lo menos una etapa de cromatografía en el procesamiento posterior del polipéptido en bruto tras la producción recombinante. Debido a que las dimensiones de los equipos cromatográficos con respecto al rendimiento del procedimiento de fermentación, especialmente la capacidad de separación de las columnas cromatográficas, son limitadas, debe procesarse una multitud de lotes para poder obtener la cantidad necesaria de polipéptido terapéutico purificado.

20

25 Para garantizar que cada lote del polipéptido terapéutico purificado presenta el mismo efecto farmacéutico, para cada lote debe cumplirse una lista de parámetros analíticos. Lo anterior solo puede conseguirse en el caso de que las etapas del procedimiento de purificación operen de manera consistente y eficiente. Sin embargo, en el caso de que una etapa del procedimiento de purificación no funcione correctamente, el producto obtenido con toda probabilidad no pasará las pruebas analíticas y, en el peor de los casos, no podrá utilizarse el lote. Por lo tanto, resulta necesario proporcionar métodos para determinar el rendimiento y la eficacia de las etapas de purificación.

25

30 Teeters M.A. y Quinones-Garcia I. (J. Chrom. A 1069:53-64, 2005) informan de la evaluación y el seguimiento del comportamiento de empaquetamiento de columnas cromatográficas a escala de proceso mediante la utilización de las respuestas a entradas de pulso y paso basadas en la conductividad, derivadas de experimentos con trazadores y transiciones dentro del procedimiento, especialmente a partir de distribuciones de tiempos de residencia medidos. Norling *et al.* (Norling, L., *et al.*, J. Chrom. A 1069:79-89, 2005) informan del impacto de la reutilización múltiple de medios de cromatografía de intercambio aniónico sobre la eliminación de virus. La utilización de datos del procedimiento para evaluar el rendimiento cromatográfico en las columnas de purificación de proteínas de escala productiva se informa en Larson *et al.* (Larson, T.M., *et al.*, Biotechnol. Prog. 19:485-492, 2003). Moscariello J. *et al.*, J. Chrom. A 908:131-141, 2001, informan de la caracterización del rendimiento de columnas de escala industrial mediante la utilización de un modelo Gaussiano de tiempo modificado. Se informa de la resolución y eficiencia de la columna en cromatografía en Vink H., J. Chrom. 69:237-242, 1972. Sarker M. y Guiochon G., J. Chrom. A 702:27-44, 1995, informan de un estudio del comportamiento de empaquetamiento de columnas de compresión axial para cromatografía preparativa.

30

35

40

45 La utilización de una forma integrada de la función de distribución gaussiana permite la descripción de las características del lecho empaquetado, mientras que omite los efectos externos al lecho empaquetado mismo, que influyen potencialmente sobre la evaluación (ver, por ejemplo, el documento nº PCT/EP2010/003813). La implementación de las características de los equipos en la evaluación de las distribuciones no gaussianas observadas durante la evaluación de los lechos cromatográficos empaquetados ha sido descrita por Guiochon G. *et al.* (Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography, Guiochon G. *et al.* (editores), Elsevier Inc., San Diego (USA), 2a edición, 2006).

45

50 En el documento nº WO 98/46623, se informa de la purificación de péptidos y oligonucleótidos mediante un procedimiento y aparato de cromatografía por desplazamiento de las muestras. Los métodos de optimización de la separación cromatográfica de los polipéptidos se informan en el documento nº WO 2008/028974. En el documento nº WO 2010/019814 se informa de métodos para evaluar el rendimiento de la columna cromatográfica.

50

55 Descripción resumida de la invención

60 Con el método informado en la presente memoria puede realizarse una determinación de la reducción de la eficacia de separación y/o de la calidad del relleno reutilizable de una columna cromatográfica sin necesidad de utilizar e inyectar un compuesto trazador adicional antes de la separación de la solución de polipéptido en bruto, con el fin de determinar la integridad del material cromatográfico o la necesidad de datos históricos de esta etapa de purificación.

60

El método informado en la presente memoria permite determinar separadamente parámetros de la matriz de relleno de manera independiente de las contribuciones y efectos de los equipos implicados. Lo anterior permite discriminar

y/o asignar efectos físicos separados y una caracterización completa de los equipos cromatográficos utilizados con independencia de la escala, tal como a escala analítica y a escala industrial. El primer aspecto informado en la presente memoria es un método para determinar si un relleno reutilizable de columna cromatográfica que se utiliza por lo menos una segunda vez en una etapa de purificación de un procedimiento de purificación multietapa de un polipéptido, presenta una eficacia de separación reducida, por ejemplo en comparación con la eficacia de separación en el caso de que se utilice por primera vez en la misma etapa de purificación del mismo procedimiento de purificación multietapa del mismo polipéptido, comprendiendo las etapas siguientes:

- 5 a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica, b) determinar los parámetros de una función de fórmula I mediante el ajuste de los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso determinado en la etapa a),
- 10 c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso determinado en la etapa a) y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b), d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia, e) determinar la eficacia de separación reducida de dicho relleno reutilizable de columna reutilizable al calcular que el valor absoluto de la diferencia en la etapa d) es superior a 0,1,

en el que la función de fórmula I es:

fórmula I

$$yI = -\frac{1}{2} A \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_0}\right) \left(\exp\left(\frac{2x_c t_0 + w^2}{2t_0^2}\right) \left(\operatorname{erf}\left(\frac{\left(\frac{x-x_c}{w} - \frac{w}{t_0}\right)}{\sqrt{2}}\right) + 1 \right) - \exp\left(\frac{x}{t_0}\right) \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x-x_c}{\sqrt{2} \cdot w}\right) \right) + y_0$$

20 en la que los parámetros A e y_0 describen los cambios de señal respectivos, x_c es el valor medio y w es la desviación estándar de la función de distribución gaussiana subyacente, respectivamente, y el parámetro t_0 , que describe la constante de tiempo de la función de caída exponencial subyacente, y en la que la función *erf* utilizada se define como:

25

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!} .$$

Otro aspecto informado en la presente memoria es un método para la purificación cromatográfica de un polipéptido, en la que se encuentra comprendida por lo menos una etapa cromatográfica con un relleno reutilizable de columna cromatográfica, que comprende las etapas siguientes:

- 30 a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica, b) determinar los parámetros de una función de fórmula I mediante el ajuste de los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso,
- 35 c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b), d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia, en la que la función de fórmula I es:

fórmula I

$$yI = -\frac{1}{2} A \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_0}\right) \left(\exp\left(\frac{2x_c t_0 + w^2}{2t_0^2}\right) \left(\operatorname{erf}\left(\frac{\left(\frac{x-x_c}{w} - \frac{w}{t_0}\right)}{\sqrt{2}}\right) + 1 \right) - \exp\left(\frac{x}{t_0}\right) \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x-x_c}{\sqrt{2} \cdot w}\right) \right) + y_0$$

en la que los parámetros A e y_0 describen los cambios de señal respectivos, x_c es el valor medio y w es la desviación estándar de la función de distribución gaussiana subyacente, respectivamente, y el parámetro t_0 , que describe la constante de tiempo de la función de caída exponencial subyacente, y en la que la función *erf* utilizada se define como:

$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!} .$$

- 5 y
- además la utilización del relleno reutilizable de columna cromatográfica en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea de 0,06 ó inferior, o
 - llevar a cabo una caracterización adicional del polipéptido purificado en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea superior a 0,06 aunque inferior a 0,2, o
 - modificar el relleno reutilizable de columna cromatográfica en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea de 0,2 ó superior.

15 En una realización, dicho cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico de dicha fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica es un cambio de señal significado producido por el cambio de la concentración de una sustancia que no interactúa con el relleno reutilizable de columna contenido en dicha fase móvil. En otra realización, dicha determinación de los datos experimentales es la determinación durante el tiempo de los datos experimentales de un parámetro físicoquímico de cambio inercial. En una realización adicional, dicho cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica es un cambio de fase móvil de 100% de una solución que contiene un agente desnaturizante a 100% de una solución que no contiene dicho agente desnaturizante o de 100% de una solución que no contiene dicho agente desnaturizante a 100% de una solución que contiene un agente desnaturizante. En otra realización, el agente desnaturizante se selecciona de entre hidróxido sódico, cloruro de guanidinio, urea o solvente orgánico. En una realización, dicha etapa c) consiste en determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b) para cada punto de datos experimentales. En una realización, dicho cambio de señal es un cambio de conductividad o de absorción a 280 nm. En una realización adicional, dicho cambio inercial es un cambio sigmoidal. En todavía otra realización, dicho parámetro o parámetros físicoquímicos se determinan en la etapa de acondicionado o de regeneración.

30 Descripción detallada de la invención

35 El método informado en la presente memoria es un método para la determinación separada de parámetros de la matriz de relleno cromatográfico de manera independiente de las contribuciones y efectos de los equipos implicados. Se ha encontrado que lo anterior permite discriminar y/o asignar efectos físicos separados que influyen sobre la separación cromatográfica, además de una caracterización completa de los equipos cromatográficos utilizados con independencia de la escala, tal como a escala analítica y a escala industrial.

40 El primer aspecto informado en la presente memoria es un método para determinar si un relleno reutilizable de columna cromatográfica que se utiliza por lo menos una segunda vez en una etapa de purificación de un procedimiento de purificación multietapa de un polipéptido, presenta una eficacia de separación reducida, por ejemplo en comparación con la eficacia de separación en el caso de que se utilice por primera vez en la misma etapa de purificación del mismo procedimiento de purificación multietapa del mismo polipéptido, que comprende las etapas siguientes:

- 45 a) identificar un cambio inercial y determinar durante el tiempo los datos experimentales de un parámetro físicoquímico de un cambio inercial de 100% de una solución que contiene un agente desnaturizante a 100% de una solución que no contiene dicho agente desnaturizante, o viceversa, de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica tras el por lo menos primer uso del relleno de columna cromatográfica,
- 50 b) determinar los parámetros de una función de fórmula I mediante el ajuste de los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso obtenido en a),
- c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b),
- 55 d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia,
- e) determinar una eficacia de separación reducida de dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea superior a 0,06, en el que la función de fórmula I con los parámetros A e y_0 describe los cambios de señal respectivos, x_c es el valor medio y w es la desviación estándar de la función de distribución gaussiana subyacente, respectivamente, y el parámetro t_0

describe la constante de tiempo de la función de caída exponencial subyacente. Además, la función *erf* utilizada se define como:

fórmula I

$$yI = -\frac{1}{2} A \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_0}\right) \left[\exp\left(\frac{2x_c t_0 + w^2}{2t_0^2}\right) \operatorname{erf}\left(\frac{\left(\frac{x-x_c-w}{w}\right)}{\sqrt{2}}\right) + 1 \right] - \exp\left(\frac{x}{t_0}\right) \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x-x_c}{\sqrt{2} \cdot w}\right) + y_0$$

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!}.$$

- 5 Se ha encontrado que con el método informado en la presente memoria las contribuciones del material de matriz cromatográfico y también los equipos circundantes a la matriz de relleno pueden utilizarse para evaluar la calidad del relleno de columna cromatográfico, así como para una separación cromatográfica de columna.

10 La expresión "relleno reutilizable de columna cromatográfica" se refiere a un material cromatográfico que se empaqueta en una columna cromatográfica, en el que el material cromatográfico se obtiene tras una purificación en una forma no modificada, es decir, con las mismas características que antes de la purificación. Una etapa de purificación se refiere en general a un ciclo que comprende el acondicionamiento del relleno de la columna cromatográfica, la aplicación de la solución de polipéptidos en bruto, opcionalmente el lavado del material cromatográfico, la recuperación del polipéptido purificado del relleno de la columna cromatográfica y la regeneración del relleno de la columna cromatográfica. En una realización de los aspectos informados en la presente memoria, el cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica es un cambio de un parámetro físicoquímico durante el tiempo y/o en el acondicionamiento del relleno de la columna cromatográfica y/o en la regeneración del relleno de la columna cromatográfica.

20 La definición de un relleno reutilizable de columna cromatográfica tal como se ha descrito de manera general anteriormente requiere que todas las etapas individuales de la purificación sean perfectamente reversibles. Sin embargo, éste no es el caso. Durante la etapa de purificación, por ejemplo, la naturaleza completamente homogénea del material empaquetado de cromatografía puede resultar alterado y comprometerse el flujo de la matriz de separación. En un punto del tiempo la eficacia de separación y/o la recuperación y/o la calidad del relleno del material reutilizable de cromatografía todavía resultan suficientes para permitir la purificación del polipéptido a partir de los productos secundarios pero no con una pureza que satisfaga los requisitos de la especificación de dicho polipéptido. Como resultado, este lote del polipéptido no puede ser utilizado como terapéutico y debe tratarse adicionalmente o descartarse.

30 Con el método informado en la presente memoria resulta posible realizar una determinación de la reducción de la eficacia de separación y/o de la calidad del relleno reutilizable de columna cromatográfica sin i) necesidad de utilizar e inyectar un compuesto trazador adicional antes de la separación de la solución de polipéptidos en bruto, con el fin de determinar la integridad del material cromatográfico o ii) la necesidad de datos históricos de esta etapa de purificación. De esta manera, el método según la presente invención permite determinar la calidad del relleno reutilizable de columna cromatográfica basándose en datos que pueden obtenerse generalmente durante la etapa cromatográfica de purificación de los polipéptidos haciendo necesarios las etapas adicionales, tales como la inyección de sustancia trazadora.

40 El método informado en la presente memoria se basa en el resultado de que un cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico de una fase móvil que pasa por un relleno reutilizable de columna cromatográfica durante la purificación de un polipéptido puede utilizarse para determinar la eficacia de separación del material cromatográfico y/o la calidad del relleno. Dicho "cambio inercial" es el cambio de por lo menos un, preferentemente un, parámetro físicoquímico durante el tiempo, tal como la concentración de una sustancia contenida en la fase móvil, o de la fase móvil misma, durante la etapa de purificación. La sustancia no interactúa con la funcionalidad del material cromatográfico que realiza la purificación del polipéptido. Son cambios inerciales ejemplares de por lo menos un parámetro físicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica: i) un cambio de condiciones desnaturalizantes a condiciones a condiciones no desnaturalizantes, o ii) un cambio de condiciones fuertemente alcalinas a condiciones tamponadas, o iii) un cambio de solvente orgánico a agua. En una realización, el cambio es de 100% de una solución de hidróxido sódico 0,5 a 1 M o de una solución de cloruro de guanidinio 5 M o de una solución de urea 8 M o de un solvente orgánico, a 100% de tampón ó 100% de agua, que

comprende opcionalmente un agente ionizante, tal como ácido trifluoroacético hasta al 1% (v/v). O viceversa, los cambios son i) de condiciones no desnaturizantes a condiciones desnaturizantes, o ii) de condiciones tamponadas a condiciones fuertemente alcalinas, o iii) de agua a solvente orgánico. En otra realización, el cambio es de 100% de tampón ó 100% de agua, que comprende opcionalmente un agente ionizante, tal como ácido trifluoroacético hasta al 1% (v/v), a 100% de una solución de hidróxido sódico 0,5 a 1 M, o a 100% de solución de cloruro de guanidinio 5 M, o a 100% de solución de urea 8 M o solvente orgánico. En la figura 1 se muestra un cromatograma de cambio inercial que no muestra reducción de la eficacia de separación/calidad del relleno y en la figura 4 se muestra un cromatograma de un cambio inercial que muestra una reducción de la eficacia de separación/calidad del relleno.

En una realización, el cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico durante el tiempo se determina con los datos experimentales registrados durante la purificación, tales como la absorción a 280 nm, o la conductividad de la fase móvil que sale de la columna cromatográfica, o de la concentración del solvente orgánico que sale de la columna cromatográfica.

La expresión "fase móvil" se refiere a un líquido que se utiliza en cromatografía de columna y que circunda el material cromatográfico del relleno de columna cromatográfica, que a su vez es la fase estacionaria.

Se ha encontrado que, a partir de una comparación entre los datos experimentales registrados durante el cambio inercial de por lo menos el segundo uso de dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica y los datos registrados durante el cambio inercial de por lo menos el segundo uso de dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica ajustado a la función de fórmula la, puede conseguirse la determinación de la eficacia de separación/calidad del relleno reutilizable de columna cromatográfica. En una realización, se registran los datos experimentales durante la por lo menos segunda purificación de dicho polipéptido con un relleno de columna constituido por material cromatográfico que ha sido utilizado una o más veces en las mismas etapas de purificación de la misma purificación del mismo polipéptido antes de dicho uso. La función de fórmula I es la siguiente:

fórmula I

$$yI = -\frac{1}{2} A \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_0}\right) \left[\exp\left(\frac{2x_c t_0 + w^2}{2t_0^2}\right) \left(\operatorname{erf}\left(\frac{\frac{x-x_c-w}{w}}{\frac{t_0}{\sqrt{2}}}\right) + 1 \right) - \exp\left(\frac{x}{t_0}\right) \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x-x_c}{\sqrt{2} \cdot w}\right) \right] + y_0$$

con valores absolutos de la señal determinados por el solvente utilizado (A e y_0), el valor medio y la desviación estándar de la función de distribución gaussiana subyacente (x_c , w) y la constante de tiempo de la función de caída exponencial subyacente (t_0).

Además, la función *erf* utilizada se define como:

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!} .$$

Los métodos informados en la presente memoria utilizan la forma integrada de la distribución gaussiana modificada exponencialmente, que rinde atributos de calidad para el relleno de la columna, es decir, valores de x_c y w correspondientes al tiempo de retención y ensanchamiento de pico de la matriz empaquetada. Además de los parámetros determinados por la matriz empaquetada, las características del equipo están determinadas por la constante de tiempo exponencial t_0 . Con la función de fórmula I, puede determinarse la desviación respecto a un mecanismo de distribución controlada puramente difusivo de uno o más compuestos contenidos en un pulso aproximadamente rectangular del compuesto o compuestos en la salida de la columna. Debido al hecho de que, por ejemplo, mediante la utilización de equipos a escala industrial, la contribución del equipo, por medio de tiempos de mezcla más prolongados, puede resultar en desviaciones significativas respecto a la forma rectangular del pulso, ello debe tomarse en consideración mediante la utilización de la fórmula modificada exponencialmente indicada anteriormente.

La determinación de los efectos separados, es decir, la calidad de la matriz empaquetada y las características del equipo se consigue comparando la función de fórmula I ajustada a los datos experimentales registrados durante el cambio inercial identificado en la purificación del polipéptido con los datos experimentales registrados mismos, en donde la diferencia durante el cambio inercial de la función ajustada y los datos experimentales no ajustados no

debería exceder un umbral predeterminada con el fin de proporcionar un polipéptido purificado de las características deseadas.

5 La comparación se lleva a cabo mediante el cálculo de la diferencia entre los datos experimentales a los que se ha ajustado la función de fórmula I y la función ajustada de fórmula I. Con el fin de que los resultados de las purificaciones individuales sean comparables entre sí, se normalizan los resultados o la diferencia, por ejemplo dividiendo el valor por el valor máximo de los datos experimentales de dicho parámetro físicoquímico durante dicho cambio inercial. En una realización, se utiliza una función de diferencia normalizada, tal como se muestra en la fórmula II, a continuación:

fórmula II

$$yII = y - \left[\frac{1}{2} A \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_0}\right) \left(\exp\left(\frac{2x_c t_0 + w^2}{2t_0^2}\right) \operatorname{erf}\left(\frac{\left(\frac{x-x_c-w}{w}{t_0}\right)}{\sqrt{2}}\right) + 1 \right) - \exp\left(\frac{x}{t_0}\right) \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x-x_c}{\sqrt{2} \cdot w}\right) \right] + y_0$$

10 De esta manera, en una realización, la etapa b) consiste en: determinar los parámetros de una función de fórmula I mediante el ajuste de los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímica del por lo menos segundo uso y determinar además en el mismo los parámetros de una función de diferencia normalizada de fórmula II, y la etapa c) consiste en: determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso y la función de fórmula II con los parámetros determinados en la etapa b). En otra realización, dicha normalización se lleva a cabo en la etapa de cálculo de la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada entre los datos experimentales y la función de fórmula I ajustada a dichos datos experimentales mediante la normalización de dicha diferencia mediante la división de dicha diferencia por el valor máximo de los datos experimentales de dicho parámetro físicoquímico durante dicho cambio inercial.

15 En la figura 3 se muestra una función de diferencia ejemplar para un cromatograma para un cambio inercial sin reducción de la eficacia de separación y/o la calidad del relleno y en la figura 6 se muestra un cromatograma para un cambio inercial con una reducción de la eficacia de separación y/o la calidad del relleno.

20 Para el cálculo del valor de diferencia absoluto, se determinan el máximo global y el mínimo global de la diferencia entre los datos experimentales y los datos experimentales ajustados para cada punto de dato experimental. Se calcula la diferencia entre dicho valor máximo y dicho valor mínimo, proporcionando un parámetro con el que puede determinarse la calidad del relleno reutilizable de columna cromatográfica. En una realización, dicha diferencia se normaliza dividiendo los valores de diferencia calculada por el valor máximo de los datos experimentales utilizado para el cálculo.

25 Según el polipéptido que debe purificarse y las características del mismo que deben conseguirse, puede proporcionarse valores umbrales de la diferencia absoluta entre el valor máximo y el valor mínimo de la función de diferencia, de manera que el individuo que exceda cada uno de los valores umbral resultará en una acción que debe llevarse a cabo. En una realización, dicha diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la función de diferencia normalizada puede aceptarse y utilizarse adicionalmente el relleno en el caso de que el valor absoluto calculado para la diferencia sea inferior a 0,2 ó a 0,1 ó a 0,06. En una realización, dicha diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia normalizada puede aceptarse, aunque deben llevarse a cabo análisis y/o evaluaciones adicionales con el fin de garantizar que la conformidad de la especificación del polipéptido purificado en el caso de que el valor absoluto sea 0,06 ó superior aunque inferior a 0,2, o sea 0,1 ó superior aunque inferior a 0,2, o sea 0,1 ó superior aunque inferior a 0,15. En una realización, dicha diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia normalizada no puede aceptarse y el relleno debe cambiarse/renovarse en el caso de que el valor absoluto sea de 0,2 ó superior, o de 0,15 ó superior.

30 Por lo tanto, otro aspecto informado en la presente memoria es un método para la purificación cromatográfica de un polipéptido, en la que se encuentra comprendida por lo menos una etapa cromatográfica que utiliza un relleno reutilizable de columna cromatográfica, caracterizado porque dicho método comprende las etapas siguientes:

- a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica, b) determinar los parámetros de una función de fórmula I mediante el ajuste de los datos experimentales del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso, c) determinar la diferencia entre los datos experimentales

del cambio inercial del parámetro físicoquímico del por lo menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b), d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia, en el que la función de fórmula I es:

fórmula I

$$yI = -\frac{1}{2} A \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_0}\right) \left[\exp\left(\frac{2x_c t_0 + w^2}{2t_0^2}\right) \left(\operatorname{erf}\left(\frac{\frac{x-x_c}{w} - \frac{w}{t_0}}{\sqrt{2}}\right) + 1 \right) - \exp\left(\frac{x}{t_0}\right) \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x-x_c}{\sqrt{2} \cdot w}\right) \right] + y_0$$

5 con valores absolutos de la señal determinados por el solvente utilizado (A e y_0), el valor medio y la desviación estándar de la función de distribución gaussiana subyacente (x_c , w) y la constante de tiempo de la función de caída exponencial subyacente (t_0), y en la que la función *erf* utilizada se define como:

$$10 \operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!} .$$

y

- además la utilización del relleno reutilizable de columna cromatográfica en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea de 0,06 ó inferior, o
- llevar a cabo una evaluación y/o caracterización adicional del polipéptido purificado en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea superior a 0,06 aunque inferior a 0,2, o
- modificar el relleno reutilizable de columna cromatográfica en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea de 0,2 ó superior.

20 Un "polipéptido" es un polímero que consiste de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos pueden denominarse "péptidos", mientras que las moléculas que consisten de dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos amoniacidos pueden denominarse "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos pueden ser añadidos por la célula, en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar según el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en la presente memoria en términos de la estructura del esqueleto de aminoácidos o el ácido nucleico codificante del mismo. Las adiciones, tales como grupos carbohidrato, generalmente no se especifican, aunque, sin embargo, pueden encontrarse presentes.

30 En una realización, dicho polipéptido se produce recombinantemente. En otra realización, dicho polipéptido es una inmunoglobulina o un conjugado de inmunoglobulinas. El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Entre los genes de inmunoglobulina reconocidos se incluyen los diferentes genes de región constante, así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como cadenas sencillas (scFv) o diacuerpos (por ejemplo Huston J.S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; Bird R.E. *et al.*, Science 242:423-426, 1988; en general Hood L.E. *et al.*, Immunology, Benjamin N.Y., 2a edición, 1984; y Hunkapiller T. y Hood L.E, Nature 323:15-16, 1986). La expresión "conjugado de inmunoglobulinas" se refiere a un polipéptido que comprende por lo menos un dominio de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina conjugado mediante un enlace peptídico con un polipéptido adicional. El polipéptido adicional es un péptido no inmunoglobulina, tal como una hormona o un receptor de crecimiento, o péptido antifusogénico, o un factor del complemento, o similar, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como Fv, Fab y F(ab)₂, así como un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) o diacuerpo.

45 Los métodos para purificar polipéptidos e inmunoglobulinas se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados, y se utilizan solos o en combinación. Dichos métodos son, por ejemplo y en determinadas realizaciones, la cromatografía de afinidad con proteínas de origen microbiano (por ejemplo la cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y con otros ligandos de SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefarsa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la

5 cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos preparativos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75:93-102, 1998). En una realización, dicho relleno de columna cromatográfica es un material cromatográfico seleccionado de entre un material de cromatografía de afinidad, o un material de cromatografía de intercambio iónico, o un material de cromatografía de adsorción tiofílica, o un material de cromatografía de interacción hidrofóbica, o un material de cromatografía de adsorción aromática, o un material de cromatografía de afinidad de quelato metálico o un material de cromatografía de exclusión por tamaño.

10 En otra realización, el método informado en la presente memoria se utiliza para la determinación en el caso de que los equipos del procedimiento, a excepción del material cromatográfico, presenten una eficacia de separación reducida.

15 Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debido a que los polipéptidos eritropoyetina y un anticuerpo anti-HER2 se encontraban disponibles en cantidades suficientes en el laboratorio de los presentes inventores durante el periodo de tiempo en que se llevó a cabo la invención, ésta se ejemplifica con dichos polipéptidos. Lo anterior no debe entenderse como limitativo, sino sólo como ejemplos de la invención. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

20 Descripción de las figuras

25 Las figuras 1 a 6 se generaron utilizando datos de una etapa cromatográfica utilizada para la purificación de la eritropoyetina.

Las figuras 7 a 9 se generaron utilizando datos de una etapa cromatográfica utilizada para la purificación de un anticuerpo anti-HER2.

30 **Figura 1** Datos experimentales de un cambio inercial ejemplar de conductividad de un relleno reutilizable de columna cromatográfica sin eficacia de separación/calidad de relleno reducida (círculos blancos); eje X: tiempo [min.]; eje Y: conductividad [mS/cm].

35 **Figura 2** Datos experimentales de un cambio inercial ejemplar de conductividad de un relleno reutilizable de columna cromatográfica sin eficacia de separación/calidad de relleno reducida (círculos blancos) y función ajustada según una función de fórmula I; eje X: tiempo [min.]; eje Y: conductividad [mS/cm].

Figura 3 Diferencia absoluta entre los datos experimentales de un cambio inercial ejemplar de conductividad de un relleno reutilizable de columna cromatográfica sin eficacia de separación/calidad de relleno reducida y función ajustada según la fórmula II; eje X: tiempo; eje Y: diferencia.

40 **Figura 4** Datos experimentales de un cambio inercial ejemplar de conductividad de un relleno reutilizable de columna cromatográfica sin eficacia de separación/calidad de relleno reducida (círculos blancos); eje X: tiempo [min.]; eje Y: conductividad [mS/cm].

45 **Figura 5** Datos experimentales de un cambio inercial ejemplar de conductividad de un relleno reutilizable de columna cromatográfica sin eficacia de separación/calidad de relleno reducida (círculos blancos) y función ajustada según una función de fórmula I; eje X: tiempo [min.]; eje Y: conductividad [mS/cm].

Figura 6 Diferencia absoluta entre los datos experimentales de un cambio inercial ejemplar de conductividad de un relleno reutilizable de columna cromatográfica sin eficacia de separación/calidad de relleno reducida y función ajustada según la fórmula II; eje X: tiempo [min.]; eje Y: diferencia [mS/cm].

50 **Figura 7** Ajuste de los datos de conductividad utilizados en la figura 1 a la fórmula III utilizando la distribución gaussiana sin contribución de las características de los equipos:

fórmula III

$$y_{III} = \frac{1}{2} P1 \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - x_c}{w \cdot \sqrt{2}} \right) \right) + A0$$

55 **Figura 8** Parte superior: datos y curva ajustada, parte inferior: curva de la diferencia de los datos respecto a la curva ajustada. Eje X: tiempo [min.]; eje Y: conductividad [mS/cm].

Seguimiento de la integridad de la columna utilizando un método informado en la presente memoria en 250 ciclos cromatográficos utilizando la fórmula I (ilustrada como EMG) y la fórmula II (ilustrada como Gauss). Los parámetros de integridad mostrados son x_c (tiempo de retención), w

(ensanchamiento de picos) y t_0 (características de los equipos). En la figura se indican mediante columnas verticales en gris pálido los reempaquetamientos de columna que resultaron necesarios debido a la calidad reducida del relleno.

Figura 9

Seguimiento de la integridad de la columna utilizando un método informado en la presente memoria en 250 ciclos cromatográficos utilizando la fórmula I (ilustrada como EMG) y la fórmula II (ilustrada como Gauss). Los parámetros de calidad de ajuste son X^2 (chi cuadrado), R^2 (factor R) y diferencia de residuales normalizados respecto a la conductividad máxima tal como se indica en la fórmula II.

Ejemplo 1

Fermentación y purificación de la eritropoyetina

La eritropoyetina puede producirse y purificarse según, por ejemplo, el documento n° WO 01/87329.

La purificación comprende algunas etapas de cromatografía. Una de ellas es una cromatografía de sefarosa azul. La sefarosa azul consiste de perlas de sefarosa a la superficie de las cuales se encuentra unido covalentemente pigmento azul Cibracron. Debido a que la eritropoyetina se une más fuertemente a la sefarosa azul que la mayoría de contaminantes no proteicos, algunas impurezas proteicas y PVA, en esta etapa puede enriquecerse en eritropoyetina. La elución de la columna de sefarosa azul se lleva a cabo incrementando la concentración salina, así como el pH. La columna se rellena con sefarosa azul, se regeneró con NaOH y se equilibró con tampón de equilibrado (cloruro de sodio/calcio y acetato sódico). Se cargó el sobrenadante de fermentador acidificado y filtrado. Tras completar la carga, la columna se lavó en primer lugar con un tampón similar al tampón de equilibrado que contiene una concentración de cloruro sódico más elevada y seguidamente con un tampón de base TRIS. El producto se eluyó con un tampón de base TRIS y se recogió en una única fracción de acuerdo con el perfil de elución maestro.

Durante las etapas de equilibrado, separación y regeneración del ciclo cromatográfico, se determinó la conductividad de la fase móvil en la salida de la columna y se registró con un dispositivo estándar de medición de la conductividad.

Fermentación y purificación de un anticuerpo anti-HER2

Puede producirse y purificarse un anticuerpo anti-HER2 según, por ejemplo, las patentes US n° 5.821.337 ó n° 5.677.171.

Puede capturarse anticuerpo en muestras líquidas de cultivo celular recolectadas, y purificarse utilizando una resina de cromatografía de afinidad específica. Se seleccionó la resina de proteína A (Millipore, Prosep-vA High Capacity) como la resina de afinidad para la purificación de anticuerpo. Se empaquetó la resina en una columna.

La resina se expuso a tampones y líquido de cultivo celular recolectado (LCCR) a un caudal lineal de entre 260 y 560 cm/h. La resina se equilibró con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1.

Para cada purificación, la resina se cargó con 5 a 15 mg de anticuerpo por cada ml de resina. Tras la carga, la resina se lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, TMAC 0,5 M, pH 5, y después el anticuerpo se eluyó utilizando ácido cítrico 0,1 M, pH 2,8. El agrupado de elución se basó en la absorbancia de UV a 280 nm medida en línea después de la columna. Se ajustó el pH de los agrupados de elución purificados utilizando tampón TRIS 1 M a pH 5 a 6. Tras la regeneración de la resina con hidrocloreuro de guanidinio 0,1 M, se utilizaron resinas empaquetadas iguales o similares para la posterior purificación de otras soluciones LCCR.

Se midió la concentración de anticuerpo en el agrupado de proteína A purificado utilizando espectrometría de UV a 280 nm. Se analizaron los agrupados de elución de proteína A purificados mediante cromatografía de exclusión por tamaño con el fin de cuantificar el porcentaje de anticuerpo intacto a un peso molecular de 150 kDa.

Ejemplo 2

Cambio de las propiedades de la columna

Puede realizarse un seguimiento de la columna durante el procedimiento en continuo utilizando el método informado en la presente memoria. Algunos cambios sutiles resultan detectables con independencia de cambios en otros parámetros del procedimiento. En las figuras 8 y 9 se muestran cambios en el relleno de la columna durante la vida útil completa de las columnas Prosep A utilizadas para la purificación de un anticuerpo anti-HER2. En dichos casos, en donde resultó necesario el re-empaquetamiento, se observó una clara indicación de cambios en los parámetros derivados de la calidad del lecho empaquetado (ver la figura 8).

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar si un relleno reutilizable de columna cromatográfica, que se utiliza una por lo menos segunda vez en una etapa de purificación de una purificación de un polipéptido, presenta una eficacia de separación reducida en dicha etapa de purificación de dicha purificación de dicho polipéptido, caracterizado por que dicho método comprende las etapas siguientes:

- a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inercial de por lo menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica del por lo menos segundo uso,
- b) determinar los parámetros de una función de fórmula I mediante el ajuste de los datos experimentales del cambio inercial del parámetro fisicoquímico del por lo menos segundo uso,
- c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inercial del parámetro fisicoquímico del por lo menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b),
- d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia, e) determinar la eficacia de separación reducida de dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea superior a 0,1, en el que la función de fórmula I es:

fórmula I

$$yI = -\frac{1}{2} A \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_0}\right) \left[\exp\left(\frac{2x_c t_0 + w^2}{2t_0^2}\right) \left[\operatorname{erf}\left(\frac{\left(\frac{x-x_c-w}{w}{t_0}\right)}{\sqrt{2}}\right) + 1 \right] - \exp\left(\frac{x}{t_0}\right) \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x-x_c}{\sqrt{2} \cdot w}\right) \right] + y_0$$

con valores absolutos de la señal determinados por el solvente utilizado (A e y_0), el valor medio y la desviación estándar de la función de distribución gaussiana subyacente (x_c , w) y la constante de tiempo de la función de caída exponencial subyacente (t_0), y en el que la función *erf* utilizada se define como:

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!}$$

2. Método para la purificación cromatográfica de un polipéptido, en el que se encuentra contenido por lo menos una etapa cromatográfica utilizando un relleno reutilizable de columna cromatográfica, caracterizado por que dicho método comprende las etapas siguientes:

- a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inercial de por lo menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica del por lo menos segundo uso,
- b) determinar los parámetros de una función de fórmula I mediante el ajuste de los datos experimentales del cambio inercial del parámetro fisicoquímico del por lo menos segundo uso,
- c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inercial del parámetro fisicoquímico del por lo menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b),
- d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia, en el que la función de fórmula I es:

fórmula I

$$yI = -\frac{1}{2} A \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_0}\right) \left[\exp\left(\frac{2x_c t_0 + w^2}{2t_0^2}\right) \left[\operatorname{erf}\left(\frac{\left(\frac{x-x_c-w}{w}{t_0}\right)}{\sqrt{2}}\right) + 1 \right] - \exp\left(\frac{x}{t_0}\right) \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x-x_c}{\sqrt{2} \cdot w}\right) \right] + y_0$$

con valores absolutos de la señal determinados por el solvente utilizado (A e y_0), el valor medio y la desviación estándar de la función de distribución gaussiana subyacente (x_c , w) y la constante de tiempo de la función de caída exponencial subyacente (t_0), y en el que la función *erf* utilizada se define como:

$$erf(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!},$$

- 5 y
- además la utilización del relleno reutilizable de columna cromatográfica en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea de 0,06 ó inferior, o
 - llevar a cabo una caracterización y/o evaluación adicional del polipéptido purificado en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea superior a 0,06 aunque inferior a 0,2, o
 - modificar el relleno reutilizable de columna cromatográfica en el caso de que el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) sea de 0,2 ó superior.
- 10
- 15 3.Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que dicho cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica es un cambio producido por el cambio de la concentración de una sustancia en la fase móvil que no interactúa con el relleno reutilizable de la columna.
- 20 4.Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho cambio inercial es un cambio de conductividad o de adsorción a 280 nm.
- 25 5.Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho cambio inercial de por lo menos un parámetro físicoquímico de una fase móvil que pasa por dicho relleno reutilizable de columna cromatográfica es un cambio de 100% de una solución que contiene un agente desnaturalizante a 100% de una solución que no contiene dicho agente desnaturalizante, o viceversa.
- 30 6.Método según la reivindicación 5, caracterizado por que dicho agente desnaturalizante se selecciona de entre hidróxido sódico, cloruro de guanidinio, urea o solvente orgánico.
- 35 7.Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho cambio inercial es un cambio sigmoideal.
- 8.Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho cambio inercial es un cambio durante el tiempo.

Fig. 1

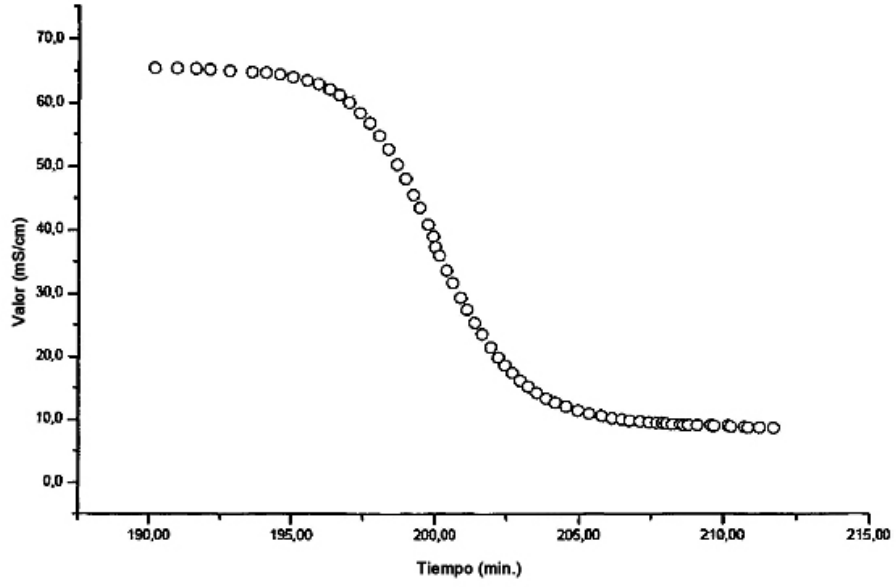


Fig. 2

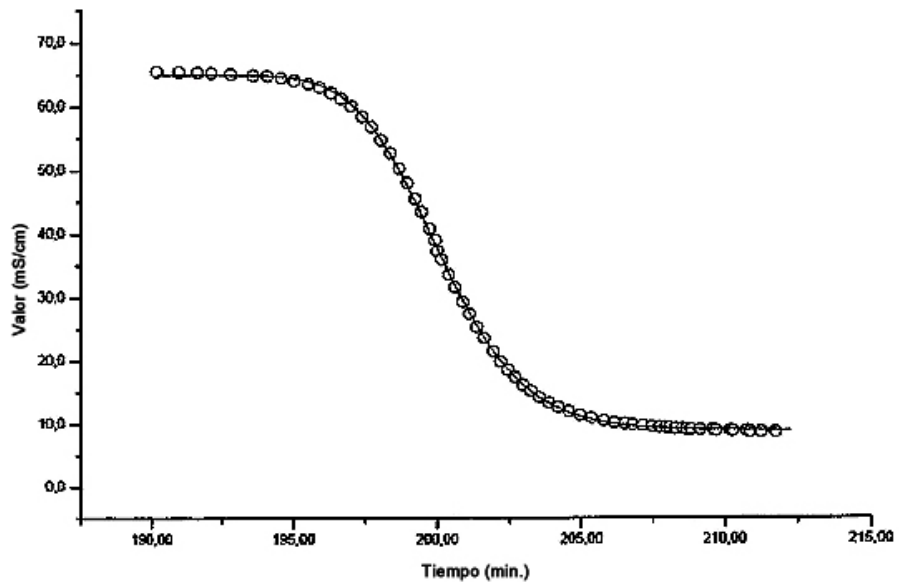


Fig. 3

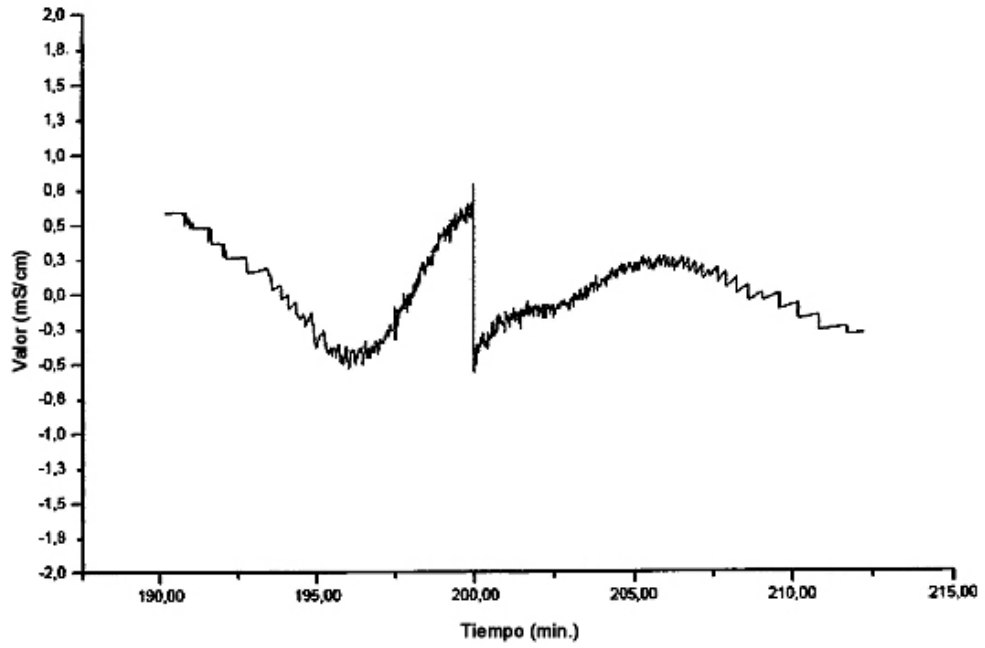


Fig. 4

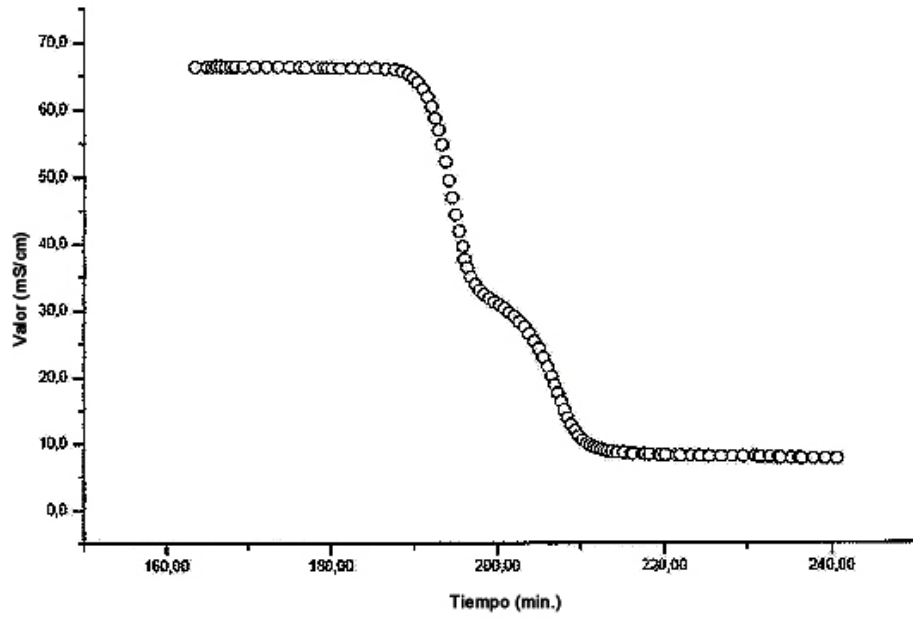


Fig. 5

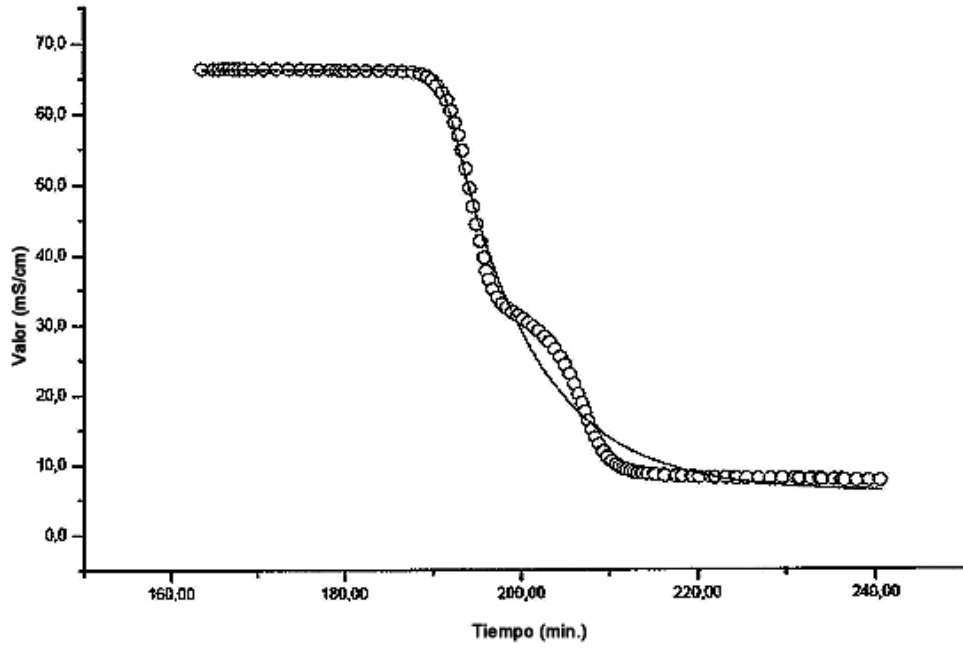


Fig. 6

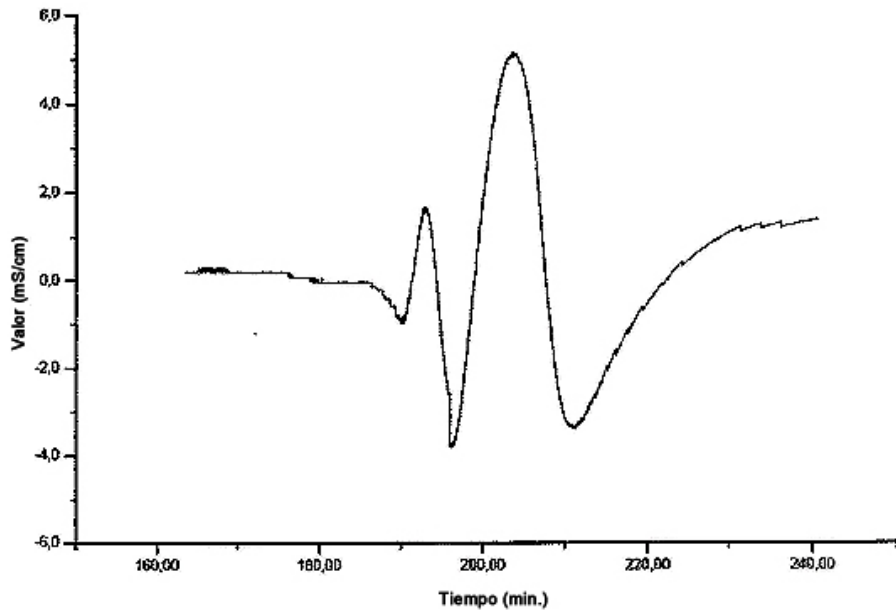


Fig. 7

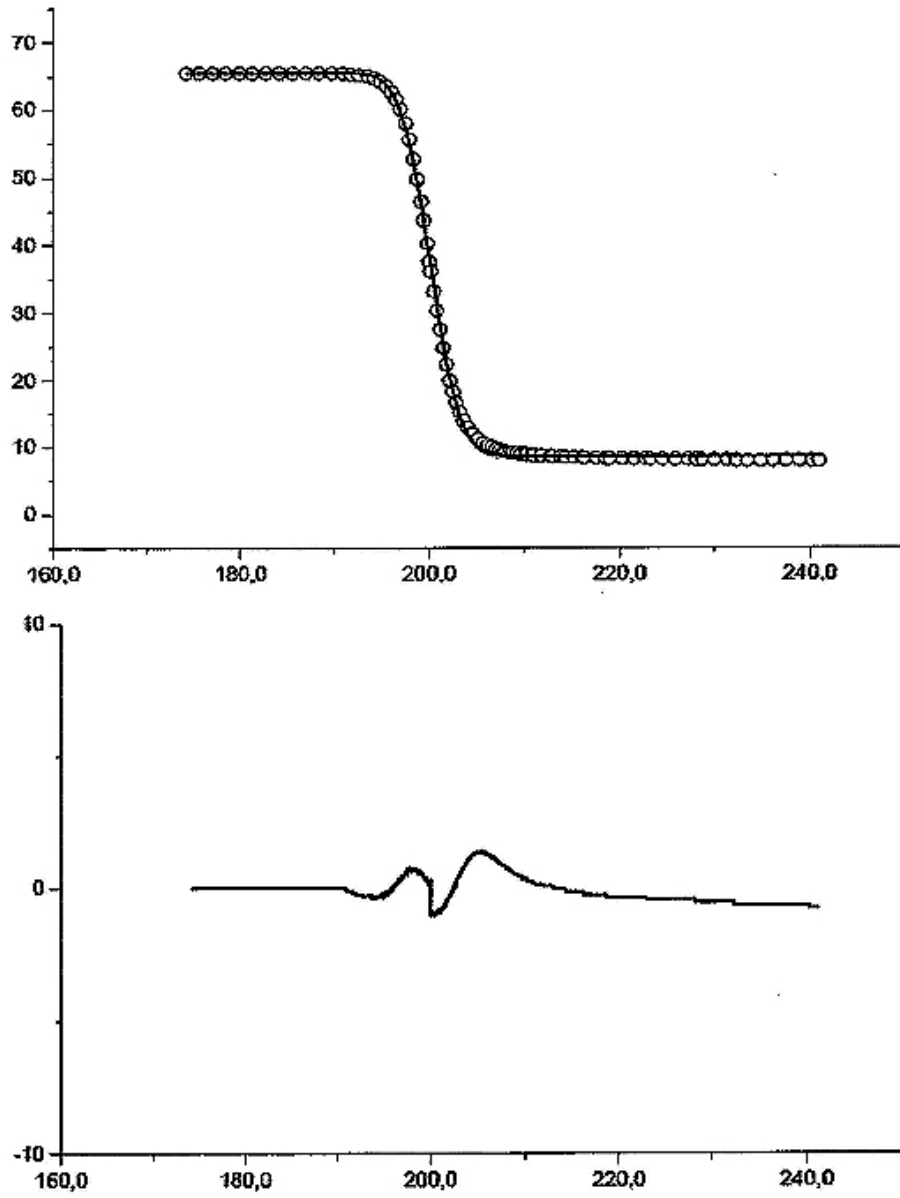


Fig. 8

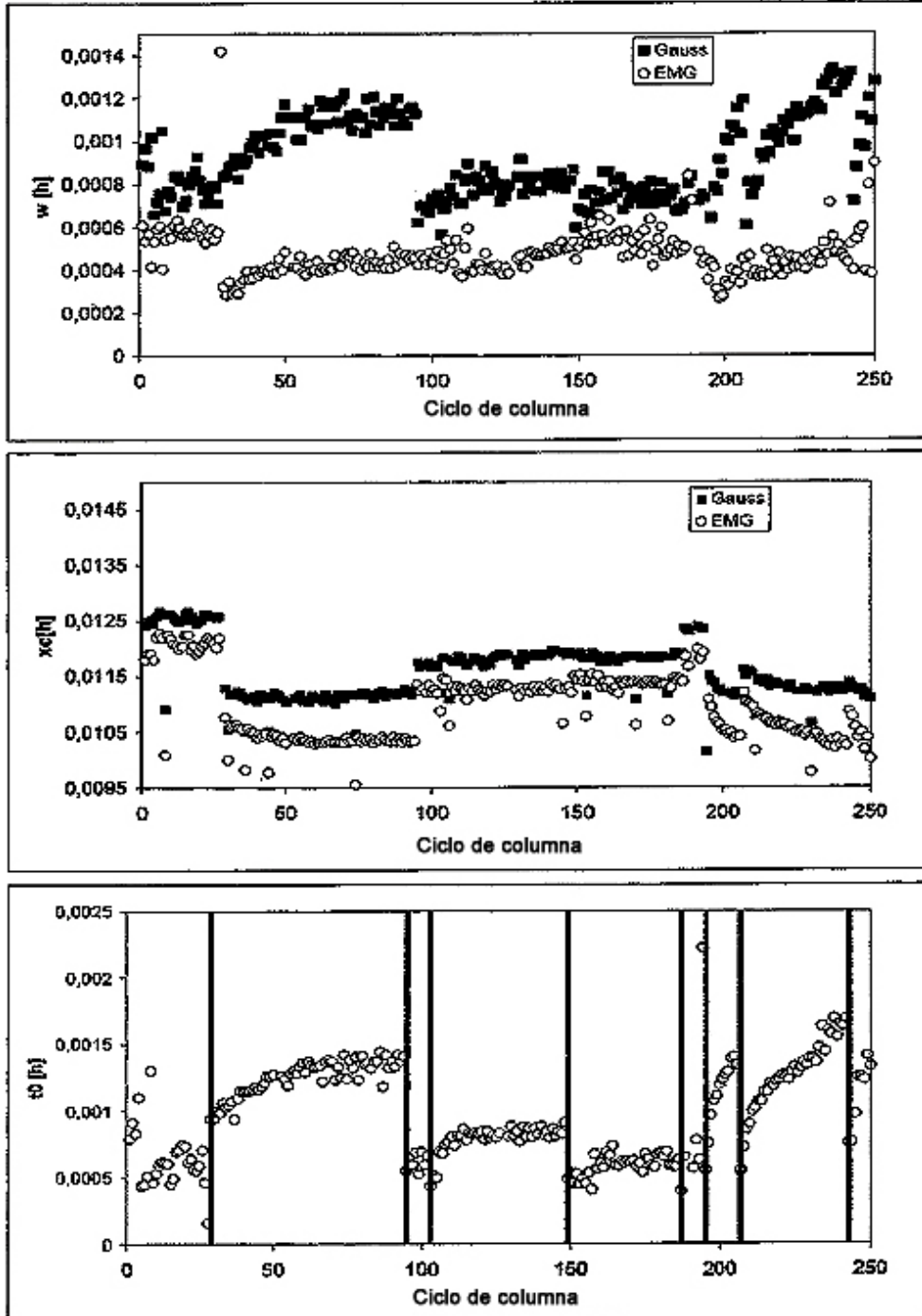


Fig. 9

