

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 454**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06** (2006.01)

**C07K 1/20** (2006.01)

**C07K 1/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2011 PCT/EP2011/055800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO2011128368**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2011 E 11715213 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2558492**

54 Título: **Eliminación de agregados de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

**14.04.2010 EP 10003968**

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

**24.05.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HEPBILDIKLER, STEFAN;  
KUHNE, WOLFGANG;  
ROSENBERG, EVA y  
WINTER, GERHARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 613 454 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

Eliminación de agregados de inmunoglobulina

- 5 En el presente documento se indica un método para la separación de inmunoglobulina dimérica y oligomérica de inmunoglobulina monomérica mediante adsorción selectiva a vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado

Antecedentes de la invención

- 10 Las proteínas, y especialmente las inmunoglobulinas, juegan un papel importante en el catálogo médico actual. Los polipéptidos, para su uso en las aplicaciones farmacéuticas, se producen principalmente en células de mamífero, tales como en células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células HEK, células BHK, células PER.C6@ y similares.

- 15 Debido a sus propiedades químicas y físicas, tales como el peso molecular y la arquitectura de dominio, incluyendo modificaciones secundarias, el procesamiento aguas abajo de las inmunoglobulinas es muy complicado. Por ejemplo, no solo hay fármacos formulados sino también productos intermedios en soluciones concentradas de procesamiento aguas abajo (DSP, *downstream processing*) necesarios para conseguir volúmenes bajos para abaratar costes en cuanto a manipulación y almacenamiento en aplicaciones. El procesamiento aguas abajo de  
 20 inmunoglobulinas producidas biotecnológicamente en general comprende tres etapas de cromatografía: una primera etapa de cromatografía por afinidad utilizando, por ejemplo, proteína A, para eliminar moléculas que no son de inmunoglobulina, normalmente seguida de dos etapas de cromatografía de intercambio iónico, de las cuales la última etapa es una etapa denominada de pulido para eliminar ADN y contaminantes de HCP (proteínas de células  
 25 hospedadoras, del inglés *host cell protein*). La inmunoglobulina purificada se obtiene en una solución a baja concentración que, en la formulación farmacéutica, requiere una etapa de concentración antes de la formulación del anticuerpo. Debido a las condiciones no naturales necesarias durante el procesamiento aguas abajo, las inmunoglobulinas monoméricas normalmente tienden a formar dímeros, oligómeros y agregados de mayor orden. Estos agregados no poseen la actividad de unión antigénica esperada de la inmunoglobulina monomérica y tienen que eliminarse.

- 30 Ghose, S., *et al.* (Biotechnol. Bioeng. 87 (2004) 413-423) indicaron la purificación de proteínas preparativa en sílice no derivatizada. Reifsnnyder, D.H., *et al.* (J. Chrom. A 753 (1996) 73-80) indicaron la captura IGF-I de un caldo de fermentación en bruto y una elución específica utilizando una combinación de etanol y NaCl. Lifshits, M.R. y Williams, R.C.Jr (Biochem. 23 (1984) 2866-2875) indicaron una cromatografía de tamiz molecular en urea 8 M en vidrio de  
 35 tamaño de poro controlado para separar formas agregadas y monoméricas de una proteína de neurofilamentos de bovino. Ghose, S., *et al.* (Abstracts of Papers, 224th ACS National Meeting, Boston, MA, United States, 18-22 de agosto, 2002 (2002), BIOT-317 Publisher: American Chemical Society, Washington, D. C.) indicaron el uso de gel de sílice desnudo no derivatizado como una fase estacionaria preparativa para procesos de purificación de proteínas.

- 40 En el documento US 4.606.825 se indica un método de separación y recuperación de inmunoglobulina G utilizando vidrio de tamaño de poro controlado que lleva funciones de polietilenimina unidas de manera covalente, no reticuladas. En el documento US 2002/0010319 se indica un método para separar un monómero polipeptídico de una mezcla que comprende dímeros y/o multímeros utilizando una resina de cromatografía de intercambio iónico y una elución en gradiente. Mizutani, T. y Mizutani, A., J. Chrom. 168 (1979) 143-150 indican la comparación de  
 45 patrones de elución de proteínas cromatografiadas en vidrio de tamaño de poro controlado y carboximetilcelulosa. El orden de las proteínas eluidas del CPG (vidrio de tamaño de poro controlado, del inglés *controlled pore glass*) fue similar al de la carboximetilcelulosa, aunque se encontraron algunas diferencias. La adsorción de las proteínas en el CPG fue ligeramente más fuerte que en la carboximetilcelulosa y la separación de las proteínas en el CPG fue ligeramente mejor. El aislamiento y la purificación de la enzima mieloperoxidasa utilizando una cromatografía con  
 50 vidrio de tamaño de poro controlado carboximetilado se describe en el documento DE 39 07 162 A1.

Sumario de la invención

- 55 Se ha descubierto que las superficies de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado (uCPG, del inglés *underivatized controlled pore glass*) se unen selectivamente a inmunoglobulinas diméricas y oligoméricas, es decir, inmunoglobulinas de clase G (IgG), agregadas, presentes en una solución a un valor de pH de 5 a 7,5. Aplicando de 50 m<sup>2</sup> a 150 m<sup>2</sup> de superficie de uCPG por gramo de IgG total, hasta el 95 % de los agregados solubles se unen a las partículas (determinado por SE-HPLC). Simultáneamente, solo aproximadamente del 10 % al 20 % del monómero se adsorbe a la superficie. Esto puede realizarse añadiendo simplemente de manera gradual en lotes el  
 60 uCPG a la solución que comprende el monómero y agregados y después de eso eliminar por centrifugación o filtración el uCPG con los agregados unidos. La incubación de la proteína durante 6 días con uCPG no produjo la formación de agregados. Además no pudieron observarse cambios detectables en la estructura secundaria o terciaria de la proteína después de la incubación con uCPG.

- 65 Por tanto, un aspecto como el que se indica en el presente documento, es un método para obtener una inmunoglobulina en forma monomérica o en forma agregada, en la que el método comprende las siguientes etapas

- a) proporcionar una solución que comprenda la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada,
- b) incubar la solución con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4,5 a 5,5,
- c) recuperar la inmunoglobulina de la solución incubada y

5 obtener de este modo la inmunoglobulina en forma monomérica, o las siguientes etapas

- a) proporcionar una solución que comprenda la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada,
- b) incubar la solución con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4,5 a 5,5,
- c) eliminar de la solución el vidrio de tamaño de poro controlado,
- d) incubar el vidrio de tamaño de poro controlado eliminado, con una solución a un valor de pH de 2 a 3 o de 7 a 8 y después de esto obtener la inmunoglobulina en forma agregada.

Otro aspecto como se indica en el presente documento, es un método para producir una inmunoglobulina en forma monomérica que comprende

- a) proporcionar una célula eucariota que comprenda un ácido nucleico que codifique la inmunoglobulina,
- b) cultivar la célula para expresar la inmunoglobulina,
- c) recuperar la inmunoglobulina de las células o del medio del cultivo,
- d) incubar una solución que comprenda la inmunoglobulina recuperada, con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4,5 a 5,5, y
- e) recuperar la inmunoglobulina de la solución incubada y después de esto producir la inmunoglobulina.

En una realización el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado son perlas de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado. En una realización adicional se usa vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado con una superficie de 100 m<sup>2</sup> a 150 m<sup>2</sup> por gramo de polipéptido. En otra realización el valor del pH se ajusta con una solución tampón del valor del pH respectivo. En una realización adicional el método es un método en lotes. En otra realización la solución comprende una cantidad de polipéptido distinta y la solución se incuba con cantidad de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado distinta. En otra realización la solución es una solución tamponada. En una realización la recuperación es por centrifugación o filtración. En una realización adicional la incubación se realiza durante un 1 minuto a 6 horas.

En una realización todos los métodos pueden comprender, como última etapa, la etapa de

- purificar la inmunoglobulina mediante una o más etapas de separación cromatográfica.

En el presente documento se indica el uso de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado para la adsorción de inmunoglobulina de alto peso molecular de inmunoglobulina monomérica a un valor de pH de 4,5 a 5,5.

En el presente documento se indica un kit de partes que comprende

- a) perlas de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado,
- b) una solución tamponada de un valor de pH de 4 a 6,
- c) una solución tamponada de un valor de pH de 2 a 3,
- d) una solución tamponada de un valor de pH de 7 a 8.

#### Descripción detallada de la invención

Generalmente, para la separación de inmunoglobulina monomérica de inmunoglobulina agregada, así como de otros compuestos de peso molecular alto, se emplean normalmente métodos cromatográficos. Se ha descubierto ahora que el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado (uCPG) se une selectivamente a inmunoglobulinas diméricas y oligoméricas y a compuestos de peso molecular alto presentes en solución, por ejemplo, en comparación con Sefharose™ no derivatizada. La inmunoglobulina monomérica puede recuperarse, por ejemplo, del flujo que pasa a través de una columna de cromatografía que contenga uCPG como material de cromatografía o del sobrenadante de una incubación de una solución con uCPG. Este efecto es pronunciado a un valor de pH de aproximadamente 5,0 en soluciones tamponadas. Con una superficie de aproximadamente 50 m<sup>2</sup> a 150 m<sup>2</sup> de uCPG por g de inmunoglobulina, puede retirarse hasta un 95 % de la forma agregada con un rendimiento de 80 % a 90 % de inmunoglobulina monomérica.

La aplicación de uCPG puede utilizarse para retirar dímeros y oligómeros de volúmenes de principios farmacéuticos activos o de material formulado final, antes o incluso después de su conservación.

Un "polipéptido" es un polímero de restos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, producidos de manera natural o sintética. Los polipéptidos con menos de aproximadamente 20 restos de aminoácidos se denominan "péptidos". Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas o al menos una cadena polipeptídica de más de 100 restos de aminoácido. Un polipéptido también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los grupos carbohidrato y otros sustituyentes no

peptídicos pueden añadirse a un polipéptido por parte de la célula en la que se produce el polipéptido, y variarán con el tipo célula. En el presente documento los polipéptidos se definen en cuanto a sus estructuras de esqueleto de aminoácidos; sustituyentes, tales como los grupos de carbohidratos, no están generalmente especificados aunque sin embargo pueden estar presentes.

El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que comprende uno o más polipéptidos, sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante así como los genes de la región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en diversos formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub> así como en formato monocatenario (scFv, *single chain Fv*) o en diacuerpos.

La expresión "inmunoglobulina completa" significa una inmunoglobulina que comprende dos polipéptidos de cadena ligera de inmunoglobulina (cadenas ligeras) y dos polipéptidos de cadena pesada de inmunoglobulina (cadenas pesadas). Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina contiene un dominio variable (región variable, generalmente la parte amino terminal) que comprende regiones de unión que pueden interactuar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina comprende una región constante (generalmente la parte de carboxilo terminal). El dominio variable de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina a su vez comprende diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones marco conservadas (FR, del inglés *framework regions*) y tres regiones hipervariables (CDR).

La expresión "fragmento de inmunoglobulina" significa un polipéptido que comprende al menos un dominio seleccionado del dominio variable (V<sub>H</sub>), del dominio C<sub>H1</sub>, de la región bisagra, del dominio C<sub>H2</sub>, del dominio C<sub>H3</sub> o del dominio C<sub>H4</sub> de una cadena pesada, o del dominio variable (V<sub>L</sub>) o del dominio C<sub>L</sub> de una cadena ligera. También se incluyen derivados y sus variantes. Por ejemplo, puede haber un dominio variable, en el que uno o más aminoácidos o regiones de aminoácidos estén suprimidos

La expresión "conjugado de inmunoglobulina" significa un polipéptido que comprende al menos un dominio de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina conjugado mediante un enlace peptídico con un polipéptido adicional. El polipéptido adicional puede ser un péptido que no es de inmunoglobulina, tal como una hormona, o toxina o receptor de crecimiento, o un péptido antifusogénico, o un factor del complemento, o similar.

Para la purificación de inmunoglobulinas producidas de manera recombinante, puede emplearse una combinación de etapas de cromatografía en columna diferentes. Generalmente, después de una cromatografía de afinidad con proteína A se realizan una o dos etapas de separación adicionales. La etapa de purificación final es una etapa denominada "etapa de pulido" para la eliminación de impurezas traza y de contaminantes como inmunoglobulinas agregadas, HCP (proteínas de células hospedadoras, del inglés *host cell protein*) residuales, ADN (ácido nucleico de célula hospedadora), virus o endotoxinas. Para esta etapa de pulido puede utilizarse un material de intercambio aniónico en modo de flujo de paso.

Para la recuperación y purificación de proteínas, pueden utilizarse diferentes métodos, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas carboximetílicas), de intercambio aniónico (resinas aminoetílicas) y de intercambio iónico mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con betamercaptoetanol y otros ligandos de SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-sefariosa, resinas azaarenofílicas o con ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad con quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y métodos electroforéticos (como la electroforesis de gel, electroforesis capilar).

Las expresiones "inmunoglobulina en forma monomérica" e "inmunoglobulina monomérica", que pueden utilizarse indistintamente, se refieren a una molécula de inmunoglobulina que no está asociada con la segunda molécula de inmunoglobulina, es decir, que no está unida de manera covalente ni de manera no covalente con otra molécula de inmunoglobulina. Las expresiones "inmunoglobulina en forma agregada" e "inmunoglobulina agregada", que pueden utilizarse indistintamente, e "inmunoglobulina dimérica" e "inmunoglobulina multimérica" se refieren a una molécula de inmunoglobulina que está asociada, de manera covalente o no covalente, con al menos una molécula de inmunoglobulina adicional, y que se eluye en un solo pico de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño. La expresión "en forma monomérica" como se usa en esta solicitud no significa necesariamente que el 100 % de una molécula de inmunoglobulina está presente en forma monomérica. Esto significa que una inmunoglobulina está esencialmente en forma monomérica, es decir, al menos un 90 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica, en una realización al menos un 95 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica, en otra realización al menos un 98 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica, en una realización adicional al menos un 99 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica y en una realización final más de un 99 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica, determinado como área de pico de un cromatograma de exclusión por tamaño. La expresión "en forma monomérica y en forma agregada" significa una mezcla de moléculas de inmunoglobulina no asociadas con otras moléculas de inmunoglobulina y de moléculas de inmunoglobulina asociadas con otras moléculas de inmunoglobulina. En esta mezcla ni la forma monomérica ni la forma agregada están exclusivamente presentes. La expresión "forma de peso molecular alto (HMW, del inglés *high molecular*

*weight*)", significa inmunoglobulina polimérica, es decir, agregada, por lo cual dicho agregado es aún soluble en una solución acuosa tamponada.

5 El término "100 %", como se usa en esta solicitud, significa que la cantidad de componentes distintos de un componente especificado, está por debajo del límite de detección del método analítico al que se hace referencia en las condiciones especificadas.

10 Los términos "90 %", "95 %", "98 %", "99 %" como se usan en esta solicitud significan valores no exactos aunque valores dentro de la precisión del método analítico al que se hace referencia en las condiciones especificadas.

Un material cromatográfico comprende un material núcleo y grupos funcionales cromatográficos relacionados con este. El material núcleo puede ser un material inorgánico, tal como sílice, zeolita, hidroxiapatita, o vidrio, o un material orgánico, tal como celulosa, o agarosa o un material polimérico sintético, tal como poli(metacrilato).

15 Las soluciones empleadas en el método descrito en el presente documento son, en una realización, soluciones tamponadas. La expresión "solución tamponada" significa una solución en la que los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o alcalinas están equilibrados mediante la sustancia tampón disuelta. Puede utilizarse cualquier sustancia tampón que tenga dichas propiedades. Generalmente, se utilizan sustancias tampón farmacéuticamente aceptables. En una realización, la solución tamponada se selecciona de una solución  
20 tamponada con fosfato que consiste en ácido fosfórico y/o sus sales, o una solución tamponada con acetato que consiste en ácido acético y/o sus sales, o una solución tamponada con citrato que consiste en ácido cítrico y/o sus sales, o una solución tamponada con morfina, o una solución tamponada con ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico, o una solución tamponada con histidina, o una solución tamponada con glicina o una solución tamponada con tris (hidroximetil) aminometano (TRIS). En otra realización la solución tamponada se selecciona de una selección  
25 tamponada con fosfato, o una solución tamponada con acetato o una solución tamponada con citrato, o una solución tamponada con histidina. Opcionalmente la solución tamponada puede comprender una sal adicional, tal como, por ejemplo, cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, citrato de sodio o citrato de potasio.

30 Los materiales núcleo, cromatográficos, no derivatizados, especialmente vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado, pueden utilizarse para adsorber selectivamente polipéptidos, especialmente inmunoglobulinas en forma agregada, es decir, moléculas de inmunoglobulina dimérica y oligomérica.

35 Generalmente, las perlas de CPG tiene un diámetro de partícula medio de aproximadamente 125  $\mu\text{m}$ . Se determinó que el área de superficie específica de las perlas de CPG que se utilizan en el presente documento era de 36  $\text{m}^2/\text{g}$ .

40 En la figura 1A se muestran las propiedades de adsorción del vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado, de la agarosa reticulada (Sephacrose™) y del poli(metacrilato). Puede observarse que, por un lado, los polipéptidos pueden unirse a vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado y por el otro lado que puede observarse una fuerte dependencia del pH de la capacidad de unión. Como puede observarse en la figura 1B el medio ProSep vA ultra muestra la mayor adsorción de la IgG a un pH de 7,5. El ProSep vA ultra es un material de CPG funcionalizado en el que un ligando de afinidad con la proteína A esta acoplado a la superficie de vidrio. A un pH de 5,0, se observó que la adsorción de la IgG con el CPG era mayor que con el gel de proteína A funcionalizado.

45 Después de la incubación de la IgG con el uCPG a diferentes valores de pH de 3,0, 5,0 y 7,5, el sobrenadante se analizó por SE-HPLC. Se observó que, después de la incubación con perlas de CPG no derivatizadas a un pH de 5,0 y 7,5, la solución estaba casi completamente limpia de agregados solubles (Figura 2).

50 La Figura 6 muestra la cantidad de IgG adsorbida al uCPG después de 12 horas de incubación a un valor de pH de 5,0 frente a la concentración de proteína en el sobrenadante. La saturación puede alcanzarse a concentraciones de proteína relativamente bajas y la adsorción máxima puede alcanzarse a 2,0 mg de IgG por metro cuadrado de CPG. La desorción cuantitativa puede efectuarse cuando el CPG cargado con proteína se incubaba en una solución tamponada a un valor de pH de 3,0. La adsorción de la proteína a superficies de silicio es, en general, descrita como reversible en condiciones definidas. Pueden utilizarse disolventes químicos rigurosos, tales como cloroformo, metanol o 2-propanol (véase, por ejemplo, Manning, J.N., *et al.*, Journal of Cromatografía B 487 (1989) 41-50; Stankovic, C.J., *et al.*, Anal. Biochem. 184 (1990) 100-103). Por otra parte pueden utilizarse sales caotrópicas (véase, por ejemplo, Mecs, I., *et al.*, Arch. Virol. 81 (1984) 303-311) además de un cambio del valor del pH (véase, por ejemplo, Edy, V.G., *et al.*, J. Gen. Virol. 33 (1976) 517-521).

60 La adsorción máxima puede observarse a un pH de 5,0 (Figura 7). Puede observarse una disminución de la adsorción de IgG cuando el valor del pH se eleva por encima del punto isoeléctrico (PI) de la IgG (por ejemplo, se determinó que el PI era de 8,0, utilizando mediciones del potencial zeta para la IgG mostrada en la Figura 8). El potencial zeta de la IgG puede determinarse dependiendo de una titulación del valor del pH.

La carga de superficie del CPG de tamaño nano, depende también del valor del pH. El PI del PCG puede determinarse que es de aproximadamente 4. A un valor de pH por encima de 4 la carga de superficie del CPG cambia de positiva a negativa.

5 Por ejemplo, una solución que contenía 6,8 % de compuestos de peso molecular alto, HMW, se incubó con diferentes áreas de superficie uCPG de 0,1 m<sup>2</sup> a 10 m<sup>2</sup> a un valor de pH de aproximadamente 5. El porcentaje residual de los HMW (compuestos de peso molecular alto) en solución se determinó en el sobrenadante utilizando SE-HPLC. En la figura 4 se muestra la cantidad en porcentaje de monómeros y de compuestos de HMW, adsorbida al área de superficie de CPG por gramo de proteína, que estaba inicialmente presente antes de la incubación.  
10 Cuando se emplea una superficie de CPG de 50 m<sup>2</sup> por gramo de IgG, puede adsorberse el 63 % de los compuestos de HMW inicialmente presentes en la solución. El nueve por ciento del monómero inicialmente presente en la solución se unió a las partículas. Aplicando aproximadamente una superficie de 140 m<sup>2</sup> de CPG por gramo de proteína, casi un 95 % de los compuestos de HMW pueden unirse, mientras que solo se adsorbe un 22 % del monómero. A una superficie de aproximadamente 250 m<sup>2</sup> de superficie de CPG por gramo de proteína, casi el 100 % de los compuestos de HMW pueden adsorberse sobre la superficie de CPG (véase la Figura 5). Entre 50 m<sup>2</sup> y 150 m<sup>2</sup> de superficie de CPG por gramo de proteína, los oligómeros pueden eliminarse casi por completo. El área de superficie de CPG presente durante la incubación no tiene ningún efecto sobre la cantidad de los LMW (compuestos de peso molecular bajo) que permanece en solución.

20 Por tanto, pueden adsorberse agregados solubles de inmunoglobulinas a CPG no derivatizado. El área de superficie de CPG disponible por gramo de proteína puede utilizarse para controlar la cantidad de especies agregadas y monoméricas que permanecen en solución después de la incubación. Un área de superficie entre 100 m<sup>2</sup> a 150 m<sup>2</sup> por gramo de proteína puede utilizarse para eliminar del 60 % al 95 % de agregados solubles de una solución de IgG a un valor de pH de aproximadamente 5, permaneciendo simultáneamente del 80 % al 90 % de IgG monomérica en solución.  
25

La conformación de la proteína se investigó antes, durante y después de la adsorción a la superficie. No pudo observarse pérdida de proteína debido a la formación de agregados insolubles durante un periodo de incubación de seis días. El nivel de compuestos de HMW determinado por SE-HPLC disminuyó con el aumento del área de superficie de CPG. Después de una incubación de un día, si la incubación se prolonga durante cinco días, no puede detectarse disminución adicional en el nivel de agregados solubles. No puede determinarse ningún aumento de los compuestos de HMW en el sobrenadante. En una realización el tiempo de incubación es de 1 minuto a 24 horas. En una realización adicional el tiempo de incubación es de 1 minuto a 6 horas.  
30

35 La exposición de IgG a uCPG no produjo alteraciones conformacionales de la estructura secundaria, determinada con FT-IR (espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier).

En el presente documento se indica un método para obtener un polipéptido que comprende la etapa de

40 - incubar el polipéptido con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4 a 6.

En una realización, el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado se usa a un valor de pH de 4,5 a 5,5.

En otra realización, el uCPG se usa a un valor de pH de aproximadamente 5. En otra realización la incubación es en una solución tamponada.  
45

El término "aproximadamente" significa que el siguiente valor no es un valor exacto sino que es el punto central de un intervalo que en una realización es +/- 10 % del valor, o en otra realización es +/- 5 % del valor o en una realización adicional es +/- 2 % del valor, o en una realización es +/- 1 % del valor. Si el valor es un valor relativo dado en porcentajes, el término "aproximadamente" también indica que siguiente valor no es un valor exacto sino que es el punto central de un intervalo que en una realización es +/- 10 % del valor, o en otra realización es +/- 5 % del valor, o en una realización adicional es +/- 2 % del valor, o en una realización es +/- 1 % del valor, por lo cual el límite superior del intervalo no puede superar un valor de 100 %.  
50

En una realización, el método para obtener una inmunoglobulina en forma monomérica comprende las siguientes etapas  
55

a) incubar una solución que comprenda la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada, con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4,5 a 5,5, mediante lo cual la incubación se realiza aplicando la solución a una columna de cromatografía que comprende el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado,  
60

b) recuperar el flujo de paso y obtener de este modo la inmunoglobulina en forma monomérica del sobrenadante de la etapa a).

En otra realización el método para obtener una inmunoglobulina en forma agregada comprende las siguientes etapas  
65

a) incubar una solución que comprenda la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4,5 a 5,5, mediante lo cual la incubación se realiza aplicando la solución a una columna de cromatografía que comprende el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado,

5 b) recuperar el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado incubado;

c) recuperar la inmunoglobulina en forma agregada del vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado, incubando con una solución con un valor de pH que difiera en al menos dos unidades de pH del valor de pH de la solución de la etapa a).

10 La recuperación de compuestos del alto peso molecular es, en ambas realizaciones, aplicando una solución con un valor de pH que difiera en al menos dos unidades de pH del valor de pH de la solución de incubación para el vidrio de tamaño de poro controlado. En una realización el primer método es un método en lotes.

En una realización el método comprende las siguientes etapas

- 15
- purificar una solución que comprenda la inmunoglobulina con una cromatografía de afinidad con proteína A,
  - opcionalmente, purificar la inmunoglobulina con una cromatografía de intercambio iónico,
  - incubar la inmunoglobulina obtenida que comprende la solución con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4 a 6,
- 20
- recuperar el sobrenadante de la etapa anterior, y de este modo, obtener la inmunoglobulina en forma monomérica.

Otro aspecto que se indica en el presente documento es un método para producir una inmunoglobulina en forma monomérica que comprende

- 25
- a) cultivar una célula que comprenda un ácido nucleico que codifique la inmunoglobulina,
  - b) recuperar la inmunoglobulina de la célula o del medio de cultivo,
  - c) incubar la inmunoglobulina con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4,5 a 5,5,
- 30
- d) recuperar del sobrenadante la etapa c) y de este modo producir la inmunoglobulina en forma monomérica.

En una realización, la incubación con el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado es durante 1 min. a 120 min.

35 En la Figura 3 se muestra la acumulación de compuestos de peso molecular alto (HMW) en vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado dependiendo del valor del pH y del compuesto tampón. Puede observarse que, a un valor de pH de aproximadamente 5, el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado adsorbe compuestos de peso molecular alto de una solución de inmunoglobulina con independencia de la sustancia tampón. En una realización la sustancia tampón se selecciona de ácido acético o una sal del mismo, tal como acetato de sodio o de potasio y ácido cítrico o una sal del mismo, tal como citrato de sodio o de potasio.

40

En la figura 4 la adsorción de compuestos de peso molecular alto (HMW) en vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado se compara con la adsorción de inmunoglobulina monomérica. Puede observarse que la cantidad adsorbida de compuestos de HMW muestra una dependencia exponencial sobre el área de la superficie del vidrio de tamaño de poro controlado por masa de polipéptido aplicado. La cantidad absorbida de inmunoglobulina monomérica muestra una dependencia lineal sobre la superficie del vidrio de tamaño de poro controlado por masa de polipéptido aplicado.

45

En la Figura 5 se muestra una cromatografía de exclusión por tamaño de soluciones tratadas de modo diferente. Puede observarse que, por ejemplo, el uso de una superficie de CPG de 140 m<sup>2</sup> por gramo de polipéptido produce una reducción de compuestos de peso molecular alto.

50

En la Figura 6 se muestra la cobertura de la superficie del vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado. Puede observarse que la cobertura de la superficie alcanza 2 mg/m<sup>2</sup> de superficie de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado. La adsorción es reversible cambiando el valor del pH. En una realización los compuestos de peso molecular alto adsorbidos se recuperan del vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado cambiando el valor del pH de un pH 5 a un valor que difiere en al menos dos unidades de pH, en una realización a pH 3,0 o a pH 7,0. Mediante espectroscopía UV, o IR, de 2<sup>a</sup> derivada puede observarse que la adsorción no afecta a la estructura secundaria o terciaria.

55

60

Debido a la adsorción selectiva de los compuestos de peso molecular alto de las preparaciones de inmunoglobulina, el uso de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado puede ser adecuado para la purificación de principios farmacéuticos activos al final del procesamiento aguas abajo para eliminar la inmunoglobulina restante en forma agregada. El valor de pH operativo de 5 a 6 corresponde al valor de pH de los principios farmacéuticos activos a granel. Con el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado es posible eliminar formas de inmunoglobulina oligoméricas e incluso diméricas que, de otro modo, es difícil efectuar a fases tardías en el procesamiento aguas

65

abajo. Adicionalmente puede realizarse una manipulación en modo lote incubando simplemente perlas de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado con la solución de proteína a granel y eliminando agregados con la eliminación del GPG, por ejemplo, por centrifugación o filtración.

- 5 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

- 10 Figura 1 A: Comparación de las propiedades de adsorción del vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado (a), agarosa reticulada (Sephacrose) (b) y poli (metacrilato) (c) a valores de pH de 3,0, 5,0 y 7,2. B: Adsorción de IgG a matrices de CPG a pH 3, pH 5, pH 7,5. El porcentaje de proteína adsorbida por metro cuadrado de superficie de perla se refiere a la masa de proteína inicialmente presente antes de la incubación; adsorción a pH 3,0 (gris claro), a pH 5,0 (gris oscuro) y a pH 7,5 (negro); los resultados se presentan como valores medios de tres mediciones  $\pm$  DT.
- 15 Figura 2 HMWs residuales por metro cuadrado de superficie de CPG; el porcentaje de HMWs determinado con SE-HPLC en el sobrenadante se refiere a la cantidad de HMWs inicialmente presente antes de la incubación con la superficie; antes de la incubación (gris claro), incubación sin superficie cromatográfica (gris oscuro) e incubado con superficie cromatográfica (negro); los resultados se presentan como valores medios de tres mediciones  $\pm$  DT.
- 20 Figura 3 Comparación de la acumulación específica de compuestos de peso molecular alto (HMW) en vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado dependiendo del valor de pH y del compuesto tampón.
- Figura 4 Adsorción de monómero de IgG (blanco) y de HMWs (negro) en CPG; 20 mg de IgG que contenían HMWs al 6,8% estaban inicialmente presentes antes de la incubación con 0,1-10 m<sup>2</sup> de CPG; los datos experimentales se presentan como valores medios de tres mediciones  $\pm$  DT.
- 25 Figura 5 Cromatogramas de SE de las soluciones de IgG después de incubación con hasta 350 m<sup>2</sup> de área de superficie de CPG por gramo de proteína; 20 mg de IgG que contenían HMWs al 6,8% estaban inicialmente presentes antes de la incubación con CPG (perfil negro); se indica una disminución de la señal UV con un aumento de la superficie de CPG cambiando el color de negro a gris claro.
- 30 Figura 6 Isoterma de adsorción y desorción de IgG en partículas de CPG; se realizaron estudios de adsorción (rombos negros) a pH 5,0, de desorción (rombos blancos) a pH 3,0; los resultados se presentan como valores medios de tres mediciones  $\pm$  DT.
- Figura 7 Adsorción de IgG en partículas de CPG a diferentes valores de pH; se realizaron experimentos en el régimen de saturación a una concentración de proteína soluble de 2 mg/ml o mayor; los resultados se presentan como valores medios de tres mediciones  $\pm$  DT.
- 35 Figura 8 Curvas de titulación de potencial zeta de la IgG (negro) y de las partículas de CPG de tamaño nano (gris); los datos experimentales se presentan como valores medios de tres mediciones  $\pm$  DT.

Ejemplo 1

40 Materiales y métodos

Anticuerpo

45 Para los experimentos se tomó un volumen completamente purificado de un anticuerpo humano quimérico Fc (IgG1)/Fab de rata en tampón de histidina pH 6,0 (IgGA). Las alícuotas se dializaron en tampón acetato 100 mM pH 3,0, tampón acetato 100 mM pH 5,0 y tampón tris(hidroximetil)-aminometano 200 mM pH 7,5. Después de eso las soluciones se filtraron utilizando un filtro Steridex-GV de 0,22  $\mu$ m (Millipore, Billerica, USA).

50 CPG

Se utilizaron perlas de vidrio de tamaño de poro controlado (CPG 700) de Millipore (Billerica, USA).

Productos químicos

55 Los productos químicos y reactivos restantes que se utilizaron eran, como mínimo, de calidad analítica. El ácido acético se adquirió en Fluka (Steinheim, Alemania), el ácido cítrico, el ácido clorhídrico, el hidróxido de sodio y el cloruro de sodio se adquirieron en Merck KG (Darmstadt, Alemania), el tris(hidroximetil)-aminometano se adquirió en Angus (Ibbenbueren, Alemania). Se usó L-histidina de Ajinomoa (Raleigh, USA).

60 Adsorción a superficies

La adsorción del anticuerpo monoclonal (mAb, del inglés *monoclonal antibody*) a la superficie de CPG se investigó a diferentes pH incubando una superficie definida con una masa de proteína definida. Por tanto, la suspensión de perlas se suspendió y se mezcló con agua purificada (Milli-Q, Millipore, Billerica, USA). Las perlas se recogieron por filtración al vacío (discos de filtro de celulosa de 0,22  $\mu$ m, Sartorius, Goettingen, Alemania) y después de esto se



lavarón con agua purificada (Milli-Q, Millipore, Billerica, USA). Posteriormente, las perlas se secaron a 40 °C y se pesó una masa definida que representaba una superficie definida, determinada por adsorción de gases (BET). Después de esto, las perlas se mezclaron con la solución de proteína a un pH definido y se incubaron sin espacio de cabeza en el mezclador rotatorio RM5 (Froebel, Lindau, Alemania) a 35 rpm durante 12 horas a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron después durante 10 min. A 10.000 x g para separar las perlas de la solución de proteína. La determinación de la concentración proteica y el análisis SE-HPLC se realizaron con el sobrenadante de las muestras centrifugadas. Se prepararon muestras por triplicado y los resultados se presentan como valores medios  $\pm$  DT.

Se determinaron las isothermas de adsorción del mAb en diferentes superficies de perlas preparando muestras que contenían una superficie de perla de 5 m<sup>2</sup> y diversas concentraciones de mAb entre 0,2 mg/ml y 6,0 mg/ml. Las muestras se incubaron durante 12 horas como se describe anteriormente y se centrifugaron durante 10 min a 10.000 x g para separar las perlas de la solución proteica y para determinar la concentración de proteínas en el sobrenadante. La cantidad de proteína adsorbida se determinó restando la cantidad de la proteína determinada en el sobrenadante de la cantidad de proteína inicialmente presente antes de la incubación. Se prepararon muestras por triplicado y los resultados se presentan como valores medios  $\pm$  DT.

Para observar la adsorción preferencial de los HMWs en las superficies de CPG, se incubó la IgG en tampón acetato 100 mM pH 5 que contenía HMWs al 6,8 % con una superficie de CPG de 0,1-10 m<sup>2</sup>. Las muestras se incubaron durante 12 horas como se describe anteriormente y se centrifugaron durante 10 min a 10.000 x g para separar las perlas de la solución proteica y para determinar la concentración de proteínas en el sobrenadante. Además, el sobrenadante se analizó por SE-HPLC. La cantidad adsorbida de HMWs y de monómero respectivamente se determinó restando la cantidad de HMWs determinada en el sobrenadante de la cantidad de HMWs inicialmente presente antes de la incubación. Se prepararon muestras por triplicado y los resultados se presentan como valores medios  $\pm$  DT.

#### Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó utilizando la absorbancia fotométrica a 280 nm y 320 nm después de restar el control de tampón (espectrofotómetro UV-Vis Evolution 500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). La absorbancia a 320 nm se restó de la absorbancia a 280 nm y este valor de absorbancia se usó para calcular el contenido de proteína de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

#### SE-HPLC

Se realizaron experimentos de cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño (SE-HPLC, siglas del inglés *Size Exclusion High Pressure Liquid Chromatography*) con una columna TSK 3000 SWXL (Tosoh Bioseparation, Stuttgart, Alemania) en un sistema Summit HPLC (Dionex, Idwin, Alemania). Los picos de elución se monitorizaron a 280 nm mediante el detector de matriz de diodos de UV, UVD170U de Dionex (Idstein, Alemania). Se realizó una cromatografía isocrática a temperatura ambiente utilizando un tampón acuoso compuesto de fosfato de potasio 200 mM y de cloruro de potasio 250 mM a pH 7,0 y a un caudal de 0,5 ml/min. Cada muestra contenía mAb 100  $\mu$ g cargado por inyección. Los cromatogramas se integraron manualmente utilizando el programa informático Chromleon (Dionex, Idstein, Alemania). El porcentaje de especies de peso molecular más alto (HMWs), incluyendo dímeros y oligómeros solubles más grandes, se determinó como área relativa (mAU\*min) referido al área total incluyendo el pico de monómero y el pico de especies de peso molecular más bajo (LMWs).

#### Espectroscopia FT-IR (espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier)

Se registraron espectros FT-IR con el Tensor 27 (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania) aplicando la celda de reflectancia total atenuada (ATR, *attenuated total reflection*) MIRacle con un cristal de germanio para investigar la estructura secundaria de la proteína sobre la superficie de la perla. Se incubaron perlas de CPG a temperatura ambiente durante 12 horas con una solución de IgG de 6 mg/ml en tampón acetato a pH 5,0. Las soluciones mostraron un nivel de HMWs de 1,5 % determinado por SE-HPLC antes de la incubación. La incubación se realizó en modo de saturación. Después de la incubación, las perlas se lavaron con tampón. Se utilizaron celdas de transmisión AquaSpec para investigar la estructura secundaria de la proteína después de la desorción de las perlas utilizando un tampón tris 200 mM pH 9,0. Para cada espectro que se registró de 850 a 4000 cm<sup>-1</sup> se recogió un interferograma de barrido 120 a un modo de adquisición a doble cara con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. El espectro del tampón de referencia y de las perlas hidratadas respectivamente se restó para obtener el espectro de proteína. Los espectros se editaron con un vector de normalización seguido de la generación del segundo derivado y suavizando utilizando una función de suavizado de 13 puntos de Savitsky-Golay aplicando el programa informático OPUS 6.0 (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania). Adicionalmente, los espectros de adsorción registrados en modo ATR se corrigieron con respecto a la intensidad de banda y a la posición de banda para permitir la comparación con espectros recogidos en el modo de transmisión. Después de esto, se utilizó la corrección ATR ampliada del programa informático OPUS 6.0 (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania) de acuerdo con Fringeli (Fringeli, U. P., *Chimia* 46 (1992) 200-214) para superar la dispersión anómala dependiente del número de ondas (Goldberg, M. E., y Chaffotte, A. F., *Protein Sci.* 14 (2005) 2781-2792; Grdadolnik, J., *Int. J. Vib. Spec.* 6, ed. 2 (2002).

Mediciones del potencial zeta

5 Para determinar la carga de la proteína y del CPG 700 de tamaño nano sometido a ultrasonido a diferentes valores de pH, se determinó la movilidad electroforética de la proteína y de las perlas de CPG 700 realizando Velocimetría por Laser Doppler utilizando el Malvern Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). El potencial zeta  $\zeta$  se calculó a partir de la ecuación de Henry suponiendo una distribución de carga uniforme utilizando el programa informático Malvern DTS (Versión 5.0, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Para la preparación de las muestras una solución de mAb de 5 mg/ml se dializó en tampón acetato 50 mM pH 5,0 y después se tituló a un pH de 2,0 utilizando ácido clorhídrico 0,2 M. Las perlas de CPG 700 se suspendieron en el mismo sistema de tampón y el pH se ajustó a 2,0. Las muestras se titularon con una solución de hidróxido de sodio 0,2 M de pH 2 a pH 12 aplicando el titulador MPT2 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). El potencial zeta se determinó en 15 etapas entre un pH de 2 y un pH de 12 en una celda capilar plegada a temperatura controlada (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) a 25 °C. Cada medición se repitió tres veces y se indicaron los valores medios  $\pm$  DT (desviación típica).

10

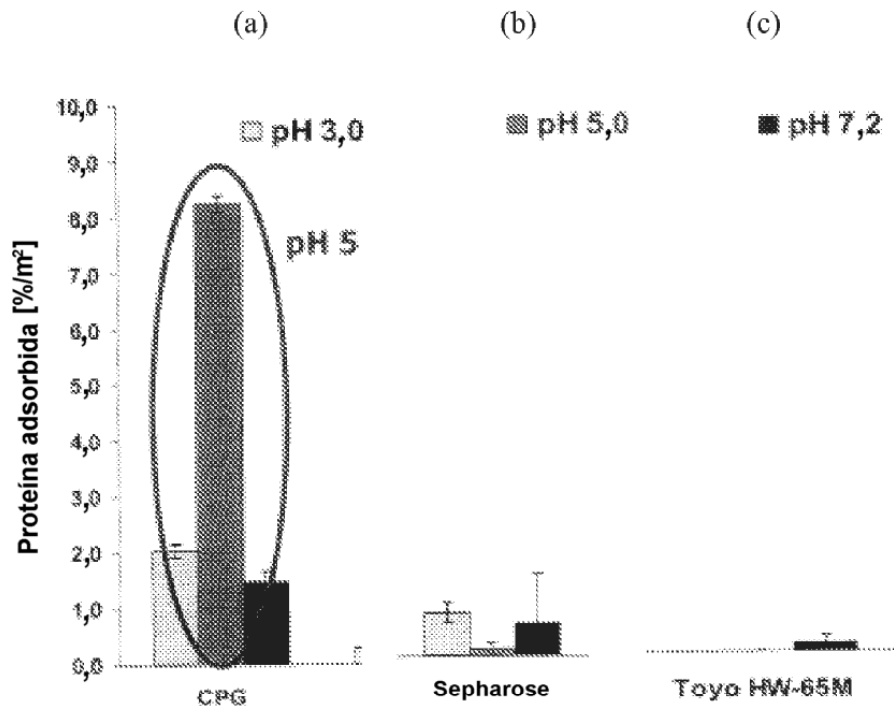
15

**REIVINDICACIONES**

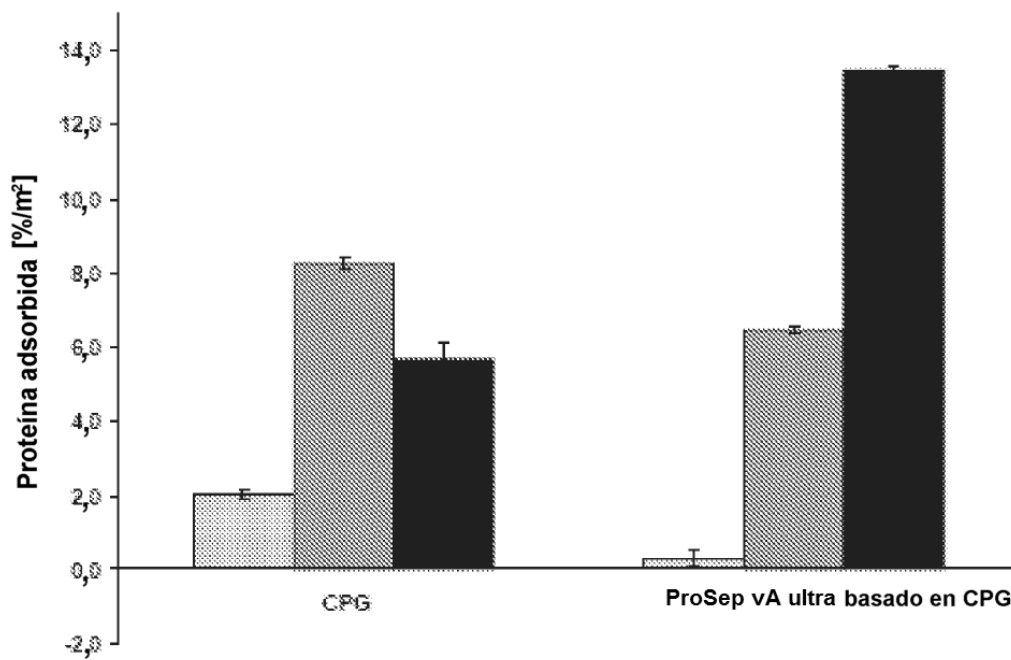
1. Un método para obtener una inmunoglobulina en forma monomérica, caracterizado por que el método comprende las siguientes etapas
- 5 a) incubar una solución que comprenda la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4,5 a 5,5, en el que la incubación se realiza aplicando la solución a una columna de cromatografía que comprende el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado, y
- 10 b) recuperar el flujo de paso y de este modo obtener la inmunoglobulina en forma monomérica.
2. Un método para producir una inmunoglobulina en forma monomérica que comprende
- 15 a) cultivar una célula eucariota que comprenda un ácido nucleico que codifique la inmunoglobulina,  
b) recuperar la inmunoglobulina de la célula o del medio de cultivo,  
c) incubar una solución que comprenda la inmunoglobulina recuperada con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4,5 a 5,5, y  
d) recuperar el sobrenadante y de este modo producir la inmunoglobulina,
- 20 en el que la incubación se realiza aplicando la solución a una columna de cromatografía que comprende el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado, y en el que la recuperación es del flujo de paso de la columna.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado son perlas de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado.
- 25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se utiliza vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado con una superficie de 100 m<sup>2</sup> a 150 m<sup>2</sup> por gramo de polipéptido.
- 30 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la solución es una solución tamponada del valor de pH respectivo.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que, como última etapa, comprende la etapa de
- 35 - purificar la inmunoglobulina mediante una o más etapas de separación cromatográfica.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la incubación se realiza durante 1 minuto a 6 horas.
- 40 8. Un método para obtener una inmunoglobulina en forma agregada, caracterizado por que el método comprende las siguientes etapas
- 45 a) incubar una solución que comprenda la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada con vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado a un valor de pH de 4,5 a 5,5, en el que la incubación se realiza aplicando la solución a una columna de cromatografía que comprende el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado,  
b) incubar el vidrio de tamaño de poro controlado recuperado con una segunda solución de un valor de pH de 2 a 3 o de 7 a 8 y de este modo obtener la inmunoglobulina en forma agregada.
- 50 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado son perlas de vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, caracterizado por que se utiliza vidrio de tamaño de poro controlado no derivatizado con una superficie de 100 m<sup>2</sup> a 150 m<sup>2</sup> por gramo de polipéptido.
- 55 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado por que la solución es una solución tamponada del valor de pH respectivo.
- 60 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado por que, como última etapa, comprende la etapa de
- purificar la inmunoglobulina mediante una o más etapas de separación cromatográfica.
- 65 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, caracterizado por que la incubación se realiza durante 1 minuto a 6 horas.

**Fig. 1**

A:



B:



**Fig. 2**

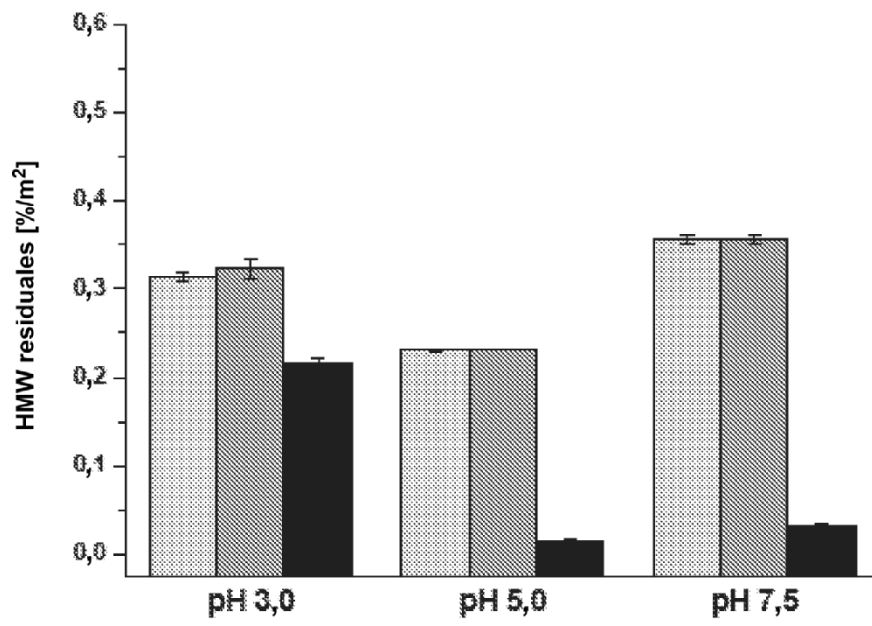
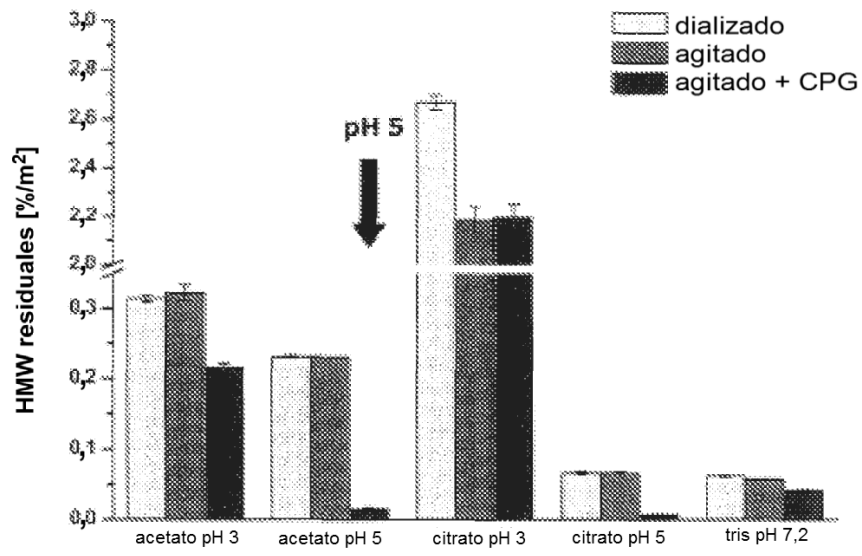


Fig. 3



**Fig. 4**

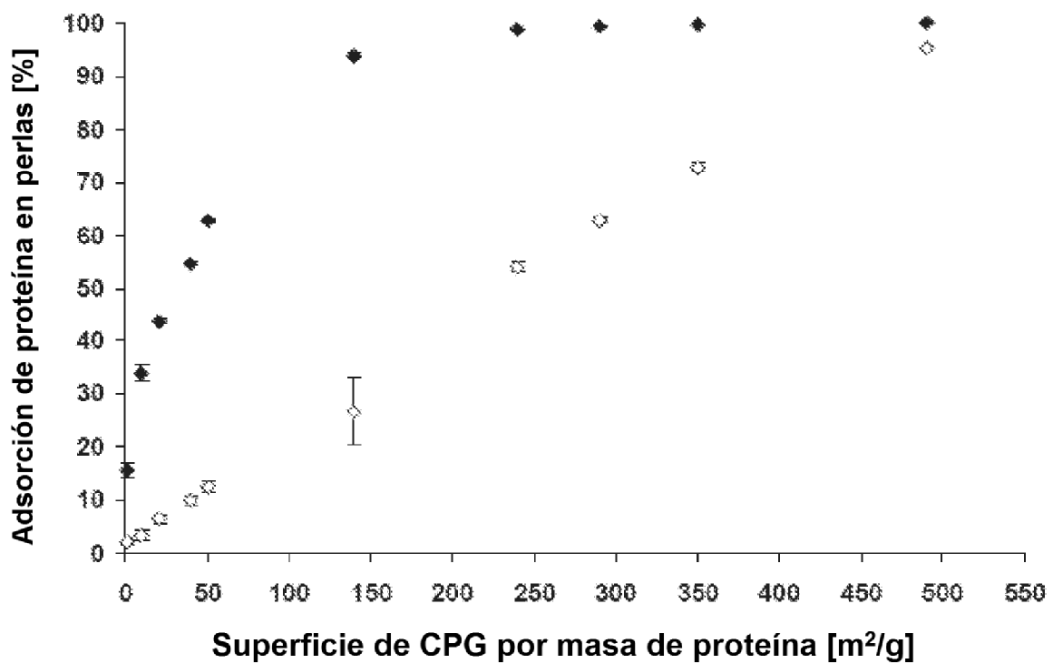
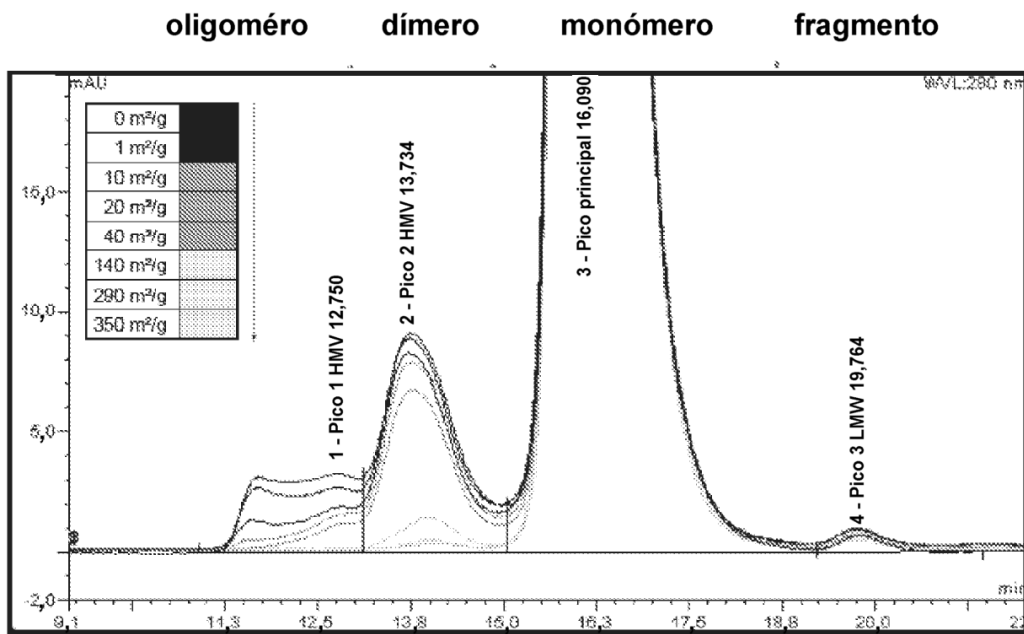


Fig. 5





**Fig. 6**

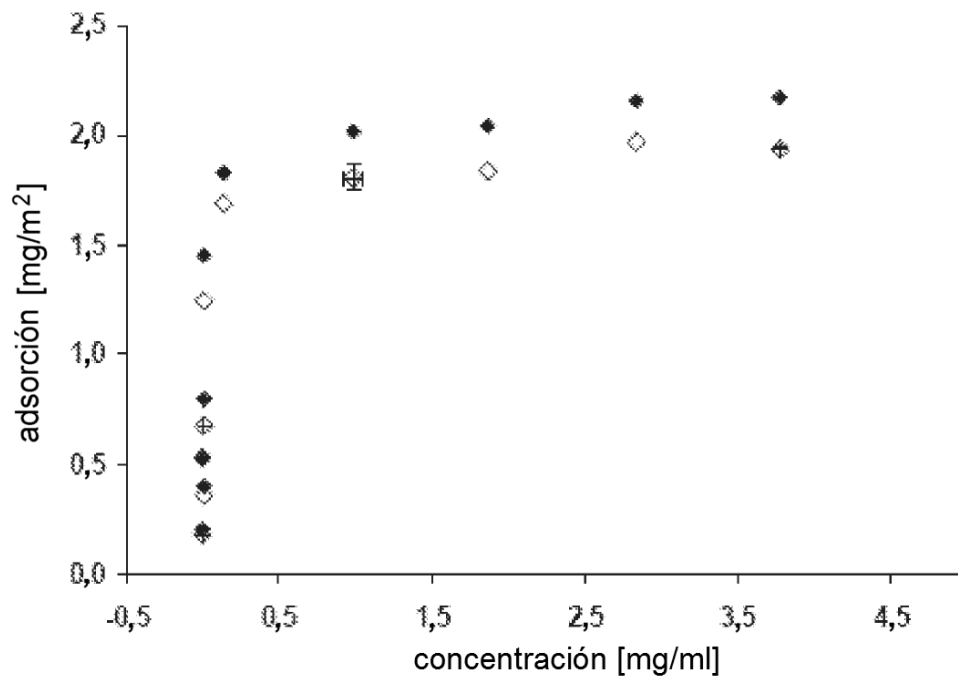


Fig. 7

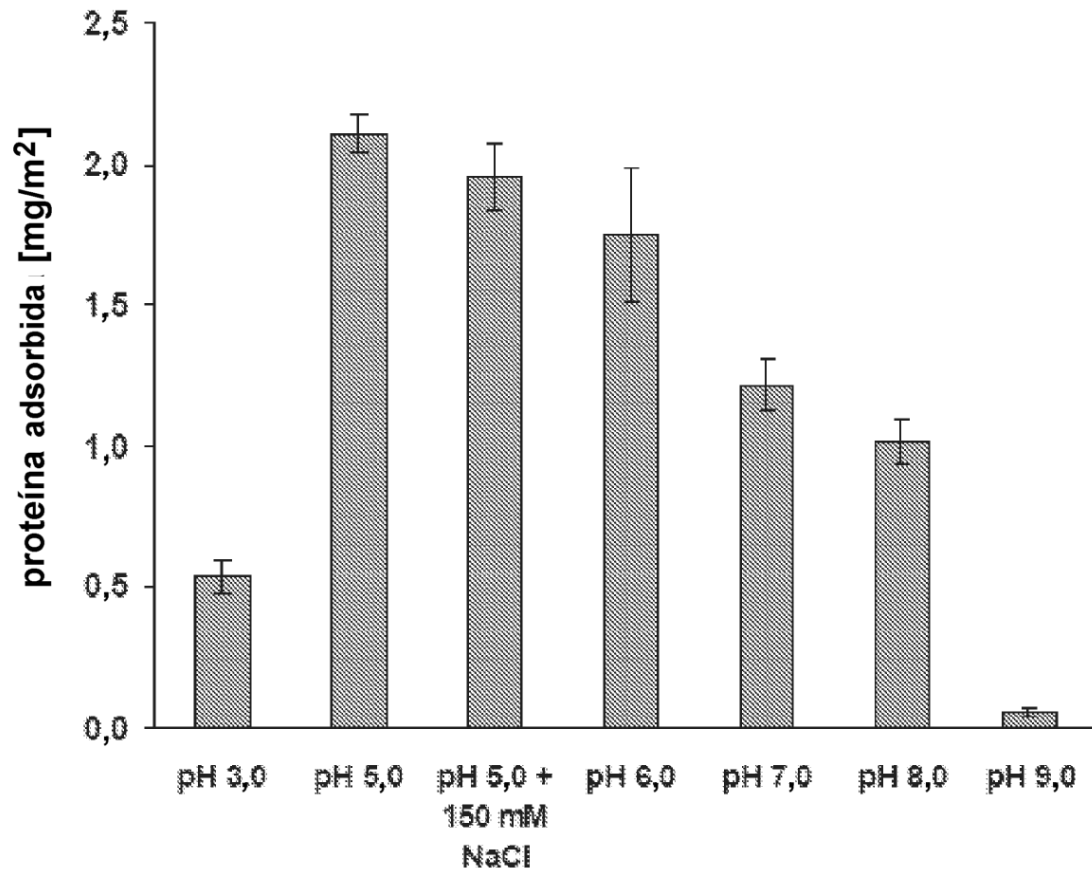


Fig. 8

