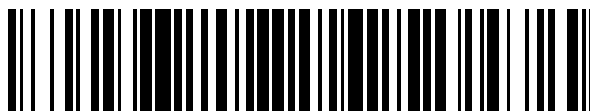


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 264**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2011 PCT/EP2011/053547**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11110598**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2011 E 11707416 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2545066**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de soluciones de inmunoglobulinas**

30 Prioridad:

**10.03.2010 EP 10156103**

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

**29.12.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BINDER, VINZENZ;  
HAKEMEYER, CHRISTIAN y  
SCHWARZ, FELIZITAS**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 648 264 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

Procedimiento para la purificación de soluciones de inmunoglobulinas

- 5 En el presente documento se informa de un procedimiento para eliminar el ADN de la célula huésped y la proteína de la célula huésped de soluciones, tales como sobrenadantes de cultivo celular o eluatos de cromatografía de proteína A, sin impartir contenido de polipéptido. Esto se consigue disminuyendo el valor de pH de la solución hasta un valor inferior a pH 6 e incubando la solución a este valor de pH.

10 **Antecedentes de la invención**

Las macromoléculas biológicas tales como anticuerpos monoclonales recombinantes y otras proteínas se usan en una amplia variedad de áreas diagnósticas y terapéuticas. En especial, los anticuerpos monoclonales se utilizan ampliamente en la actualidad en diversas enfermedades graves, como el cáncer o la artritis reumatoide. Comúnmente, estas moléculas biológicas complejas se producen mediante procesos de fermentación con bacterias, levaduras o células de mamíferos. Tradicionalmente, las células microbianas o de mamífero se eliminan del caldo de fermentación por centrifugación o filtración y, después, el sobrenadante libre de células se purifica adicionalmente para eliminar las impurezas relacionadas con la fermentación mediante diversos procedimientos tales como filtración, precipitación y cromatografía.

20 Las impurezas principales de los procesos de fermentación, junto a los componentes de los medios, son las cantidades residuales de ácidos nucleicos (ADN de la célula huésped (ADNCH) y ARN) y proteínas de la célula huésped (HCP) de las células que producen la macromolécula biológica. Para fines terapéuticos, las concentraciones aceptables de ADN de la célula huésped (ADNCH) o proteína de la célula huésped en la sustancia farmacológica final son muy bajas con el fin de reducir los efectos adversos y garantizar la seguridad del paciente. Las mejoras recientes en la tecnología de fermentación han conducido a mayores densidades de células en los biorreactores de producción, lo que incrementa los niveles de HCP y ADNCH en el sobrenadante libre de células, imponiendo mayores exigencias sobre el procedimiento de purificación.

30 Por lo tanto, son altamente deseables procedimientos eficaces y económicos para eliminar grandes cantidades de ADNCH y HCP de los sobrenadantes de cultivo celular.

O'Brien, W.D., *et al.* (J. Acoust. Soc. Am. 52 (1972) 1251-1255) informan de la investigación ultrasónica de soluciones acuosas de ácido desoxirribonucleico. Vorlickova, M., *et al.* (Nucl. Acids Res. 27(1999) 581-586) informan de la dimerización de las cadenas de ADN repetidas de guanina-adenina. La precipitación ácida de caldo de fermentación de células de mamífero se informa en Lydersen *et al.* (Lydersen, B.K., *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 745 (1994) 222-231). En el documento WO 2008/127305 se informa de un procedimiento para aislar biomacromoléculas usando bajo pH y cationes divalentes. En los documentos EP 1 561 756 y EP 1 380 589 se informa de procedimientos para purificar proteínas.

40 **Resumen de la invención**

En el presente documento se informa de un procedimiento para purificar un polipéptido en sobrenadantes de cultivo celular. Se ha encontrado que, mediante el ajuste del valor de pH en el intervalo ácido y la subsiguiente incubación de la solución acidificada durante un tiempo especificado, el ácido nucleico de la célula huésped y la proteína de la célula huésped precipitan, mientras que el polipéptido diana permanece en solución. A continuación, el precipitado y, con ello, los componentes de la célula huésped contaminantes se pueden eliminar mediante una simple etapa de separación física. Durante el tratamiento de la solución, el polipéptido de interés permanece en solución, mientras que los contaminantes de la célula huésped precipitan.

50 Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para producir u obtener una inmunoglobulina de la subclase IgG1 o IgG4 que comprende las siguientes etapas:

- i) añadir una solución que consiste en un ácido y agua a un sobrenadante de cultivo de células de mamífero del que se han eliminado las células de mamífero y los restos de células de mamífero para ajustar el valor de pH a un valor de pH 5, de manera que no se añaden cationes divalentes a la solución,
  - 55 ii) incubar el sobrenadante de cultivo de células de mamífero de pH ajustado, y
  - iii) eliminar el precipitado del sobrenadante de cultivo de células de mamífero incubado y, de este modo, producir u obtener la inmunoglobulina,
- en el que el sobrenadante de cultivo de células de mamífero comprende la inmunoglobulina a una concentración de no más de 10 mg/ml,
- 60 en el que la concentración del ácido añadido es 5,5 mol/l o inferior, y
- en el que la incubación es de 2 horas a 48 horas a un valor de pH de 5 a una temperatura de 4 °C.

65 En un modo de realización, al menos un 90 % de la inmunoglobulina permanece en solución durante la etapa de incubación. En un modo de realización adicional, al menos un 95 % de la inmunoglobulina permanece en solución durante la etapa de incubación. También en un modo de realización, más de un 98 % de la inmunoglobulina

permanece en solución durante la etapa de incubación.

En un modo de realización, el procedimiento para producir una inmunoglobulina de la subclase IgG1 o IgG4 comprende las siguientes etapas:

- 5 a) cultivar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido,
- b) eliminar las células de mamífero y restos de células de mamífero del sobrenadante de cultivo celular,
- c) ajustar el valor de pH del sobrenadante de cultivo de células de mamífero a un valor de pH 5,
- d) incubar el sobrenadante de cultivo de células de mamífero de pH ajustado, y
- 10 e) eliminar el precipitado del sobrenadante de cultivo de células de mamífero incubado y, de este modo, producir el polipéptido.

En el presente documento también se informa de un procedimiento para purificar un sobrenadante de cultivo celular que comprende las siguientes etapas:

- 15 a) ajustar el valor de pH del sobrenadante de cultivo celular a un valor inferior a pH 5,5,
- b) incubar el sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado, y
- c) eliminar el precipitado del sobrenadante de cultivo celular incubado y, de este modo, purificar el sobrenadante de cultivo celular.

Otro procedimiento del que se informa en el presente documento es la producción de un polipéptido que comprende las siguientes etapas:

- 20 i) proporcionar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido,
- ii) cultivar la célula en condiciones libres de suero,
- iii) recuperar el sobrenadante de cultivo celular, eliminando opcionalmente las células y restos celulares del sobrenadante de cultivo celular, y
- 25 iv) purificar el sobrenadante de cultivo celular mediante las siguientes etapas y, de este modo, producir un polipéptido:
  - a) añadir una disolución que consiste en un ácido y agua al sobrenadante de cultivo celular, solución que está esencialmente exenta de cationes divalentes, para ajustar el valor del pH a un valor inferior a 5,5,
  - 30 b) incubar el sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado, y
  - c) eliminar el precipitado del sobrenadante de cultivo celular incubado,
 en el que el sobrenadante de cultivo celular comprende el polipéptido a una concentración de no más de 10 mg/ml, en el que la concentración del ácido añadido es 5,5 mol/l o inferior.

35 La incubación del sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado se realiza a una temperatura de 4 °C.

La incubación del sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado se realiza durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 48 horas. En otro modo de realización, la incubación del sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado se realiza durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 32 horas. También en otro modo de realización, la incubación del sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado se realiza durante aproximadamente 40 24 horas.

En un modo de realización, la eliminación de células y restos celulares y/o la eliminación del precipitado se realizan por filtración, deposición o centrifugación.

45 El polipéptido es una inmunoglobulina. La inmunoglobulina es de la clase G subclase IgG1 o subclase IgG4 o variantes de las mismas.

### Descripción detallada de la invención

50 En el presente documento también se informa de un procedimiento para purificar un polipéptido que comprende las siguientes etapas:

- a) ajustar el valor de pH de un sobrenadante de cultivo celular que comprende el polipéptido a un valor de pH de entre pH 3,5 y 5,5,
- b) incubar el sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado, y
- 55 c) eliminar el precipitado del sobrenadante de cultivo celular incubado y, de este modo, purificar el polipéptido.

El procedimiento como se informa en el presente documento se puede llevar a cabo directamente con el sobrenadante de fermentación celular bruto del que se han eliminado las células y restos celulares, pero también después de una o más etapas preliminares de purificación, tales como cromatografía de afinidad con proteína A.

60 El término "sobrenadante de cultivo celular" denota una solución que se obtiene mediante el cultivo de una célula que secreta un polipéptido de interés. El sobrenadante comprende, además del polipéptido secretado, componentes del medio de cultivo celular empleado y componentes metabólicos junto con el polipéptido de interés secretado por las células durante el cultivo, así como también otros componentes liberados de las células cultivadas procedentes de células muertas durante el cultivo o procedentes de células desintegradas durante la recuperación del polipéptido de las células. El sobrenadante de cultivo celular está libre de restos celulares y/o células intactas. El término 65

también incluye un sobrenadante de cultivo celular que ha sido procesado mediante una sola etapa de purificación cromatográfica, tal como cromatografía de afinidad con proteína A.

El término «polipéptido» denota un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sean producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos se pueden denominar «péptidos», mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos de aminoácidos se pueden denominar «proteínas». Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos de carbohidratos, 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 con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de la estructura de su esqueleto de aminoácidos o del ácido nucleico que codifica los mismos. En general, las adiciones tales como grupos de carbohidratos no se especifican; no obstante, pueden estar presentes. En un modo de realización del procedimiento como se informa en el presente documento es el polipéptido seleccionado entre inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulina y conjugados de inmunoglobulina.

El término «inmunoglobulina» denota una proteína que consiste en dos o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante así como la miríada de genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Una inmunoglobulina, en general, comprende dos denominados polipéptidos de cadena ligera (cadena ligera) y dos denominados polipéptidos de cadena pesada (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera contiene un dominio variable (región variable) (en general, la porción aminoterminal de la cadena polipeptídica) que comprende regiones de unión que son capaces de interactuar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera también comprende una región constante (en general, la porción carboxiterminal). El dominio variable de la cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina comprende segmentos diferentes, es decir, cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (CDR). La región constante de una inmunoglobulina no está implicada directamente en la unión al antígeno de la inmunoglobulina, pero exhibe diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Algunas de estas clases se dividen adicionalmente en subclases (isotipos), es decir, IgG en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o IgA en IgA1 e IgA2. Según la clase a la que pertenece una inmunoglobulina, las regiones constantes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE),  $\gamma$  (IgG) y  $\mu$  (IgM), respectivamente.

El término «conjugado de inmunoglobulina» designa un polipéptido que comprende al menos un dominio de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina conjugada a través de un enlace peptídico a otro polipéptido. El polipéptido adicional es un péptido no inmunoglobulínico, tal como una hormona o un receptor de crecimiento o un péptido tóxico para células o un factor del complemento o similar.

La inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina de la clase G. En el presente documento, la inmunoglobulina es de la clase G subclase IgG1 o subclase IgG4 o una variante de la misma. El término «variante» designa un polipéptido que difiere en la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido parental en virtud de la adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos del polipéptido parental. En un modo de realización, una variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos parentales, en otro modo de realización al menos un 95 % y en un modo de realización adicional al menos un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos.

El término «ajustar el valor de pH», tal como se utiliza en el presente documento, designa la adición de un ácido a una solución, especialmente a un sobrenadante de cultivo celular, con el fin de reducir el valor de pH de la solución hasta un valor de pH por debajo de pH 7,0. El ajuste se puede conseguir mediante la adición de una solución ácida, es decir, de un ácido. En un modo de realización, el ajuste se realiza mediante la adición de una solución ácida seleccionada entre ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético y ácido cítrico.

El término «incubación», tal como se utiliza en el presente documento, indica que la solución respectiva se mantiene a un valor de pH establecido. La incubación se puede realizar por un tiempo específico. La incubación se puede realizar durante aproximadamente 0,5 horas o más. La incubación se puede realizar durante aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 72 horas. En el presente documento, la incubación se realiza durante 2 horas a 48 horas. En otro modo de realización, la incubación se realiza durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 32 horas. En otro modo de realización adicional, la incubación se realiza durante aproximadamente 24 horas. La incubación se realiza durante un tiempo específico como se define en los modos de realización antes enumerados a un valor de pH de pH 3,5 a pH 5,5, especialmente a un valor de pH desde pH 4,5 a pH 5,5.

El término «aproximadamente», tal como se utiliza en el presente documento, indica que el valor directamente sucesivo no es un valor exacto, sino que designa un intervalo. Este intervalo es en un modo de realización más o menos un 20 % del valor, en otro modo de realización más o menos un 10 % del valor y en un modo de realización adicional más o menos un 5 % del valor. Por ejemplo, el término «aproximadamente 24 horas» designa el intervalo

de 19,2 horas a 28,8 horas.

El término «esencialmente exenta» indica que a una solución no se añade dicho compuesto. No obstante, el compuesto específico puede estar presente en cantidades menores debido a su presencia en otros compuestos comprendidos en la solución. En general, una solución está esencialmente exenta de un compuesto cuando dicho compuesto está presente en la solución a una concentración de 1 mM o menos, especialmente a una concentración de 1  $\mu$ M o menos.

Los procedimientos para la producción de polipéptidos son conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el subsiguiente aislamiento del polipéptido y, normalmente, la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, para la expresión de una inmunoglobulina en una célula, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas respectivas se insertan en vectores de expresión por procedimientos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucarióticas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6(R), levaduras o células de *E. coli* y la inmunoglobulina se recupera de las células (sobrenadante o células después de la lisis).

El término «célula», tal como se utiliza en la presente solicitud, designa cualquier tipo de sistema celular que pueda ser modificado genéticamente para producir un polipéptido. En un modo de realización, la célula es una célula de mamífero. En otro modo de realización, la célula se selecciona entre células HEK y células CHO.

Se ha encontrado que el ácido nucleico y la proteína celular de una célula cultivada precipitan, mientras que el polipéptido secretado permanece en solución si el valor de pH del sobrenadante de cultivo celular se ajusta a un valor inferior a pH 5,5 y posteriormente la solución se incuba a ese valor de pH durante un tiempo especificado. A continuación, el precipitado y, con ello, los componentes de la célula huésped contaminantes se pueden eliminar mediante una simple etapa de separación física.

El procedimiento, tal como se informa en el presente documento, se puede usar para cualquier tipo de sobrenadante de cultivo celular, es decir, para sobrenadantes de cultivo de células eucarióticas y sobrenadantes de cultivo de células procarióticas. En el presente documento, el sobrenadante es un sobrenadante de cultivo de células de mamífero. En un modo de realización, el sobrenadante es un sobrenadante de cultivo de células CHO, HEK o Sp2/0.

Hoy en día casi todos los procedimientos de cultivo celular se realizan en ausencia de suero animal añadido. De este modo, en un modo de realización el sobrenadante de cultivo celular se obtiene a partir de un cultivo de la célula bajo condiciones exentas de suero. Adicionalmente, la ausencia de suero animal añadido excluye la interferencia potencial de compuestos no conocidos que están presentes en el suero animal y también reduce la concentración de polipéptidos en el sobrenadante de cultivo celular. Esto es ventajoso ya que, en general, en procedimientos que explotan la precipitación con fines de purificación, se puede producir la coprecipitación del polipéptido de interés y, con ello, una reducción en el rendimiento del procedimiento de purificación. El mismo efecto se puede observar en presencia de la célula cultivada o de restos celulares de la misma. Por lo tanto, las células y los restos celulares se eliminan del sobrenadante de cultivo celular antes del ajuste del valor del pH.

La concentración del polipéptido que se va a purificar en el procedimiento tal como se describe en el presente documento no es superior a 10 mg/ml. En un modo de realización, la concentración del polipéptido en el sobrenadante de cultivo celular es de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. En otro modo de realización, la concentración del polipéptido en el sobrenadante de cultivo celular es de 1 mg/ml a 8 mg/ml. En un modo de realización adicional, la concentración del polipéptido en el sobrenadante de cultivo celular es de 1 mg/ml a 5 mg/ml.

Con el fin de ajustar el valor de pH del sobrenadante de cultivo celular, se ha de añadir un ácido al sobrenadante de cultivo celular. Este ácido puede ser cualquier ácido, siempre que dicho ácido no interactúe irreversiblemente con el polipéptido. En un modo de realización, el ácido se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido malónico, ácido succínico, ácido adípico, ácido láctico y ácido cítrico. Se debe señalar que, cuando el ácido se añade al sobrenadante de cultivo celular, es una solución acuosa. La solución consiste en el ácido respectivo como ácido libre y agua y está esencialmente exenta de otras sustancias, especialmente cationes divalentes. El término «ácido libre» indica que el ácido está presente en una forma en la que están presentes los átomos de hidrógeno ácidos y no, por ejemplo, intercambiados por un catión diferente. Esto incluye que la forma del ácido usado para preparar la solución es también el ácido libre; de igual forma, se excluye que el ácido se utilice en forma de una sal. En un modo de realización, el ácido se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético y ácido cítrico. La concentración del ácido en la solución respectiva es de 5,5 mol/l o menos. En otro modo de realización, la concentración del ácido es de 1 mol/l a 5,5 mol/l. En un modo de realización adicional, la concentración del ácido es de 1,5 mol/l a 4 mol/l. De forma alternativa, la concentración del ácido en la solución respectiva puede ser de un 30 % en peso o menos. En un modo de realización, la concentración del ácido es de un 1 % en peso a un 30 % en peso. En otro modo de realización, la concentración es de un 5 % en peso a un 25 % en peso. En un modo de realización adicional, la concentración del ácido es de un 10 % en peso a un 20 % en peso.

En general, si en el presente documento se dan intervalos de valores, el intervalo incluye expresamente los puntos límite enumerados.

5 Después del ajuste del valor de pH, el sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado se incuba durante un tiempo especificado. Este tiempo específico puede ser de al menos aproximadamente 0,5 horas o más. El tiempo específico es de 2 horas a 48 horas. En un modo de realización, el tiempo específico es de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 32 horas. En otro modo de realización adicional, el tiempo específico es de aproximadamente 24 horas. La incubación del sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado se puede realizar a una temperatura de 1 °C a 30 °. La incubación del sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado se puede realizar a una temperatura de 2 °C a 10 °C. En el presente documento, la incubación del sobrenadante de cultivo celular de pH ajustado se realiza a una temperatura de aproximadamente 4 °C.

15 Con un procedimiento como se informa en el presente documento, el ácido nucleico de la célula huésped y la proteína de la célula huésped pueden precipitar, es decir, eliminarse, de un sobrenadante de cultivo celular sin reducir la concentración del polipéptido producido. Un tiempo de incubación de aproximadamente dos horas puede ser suficiente para eliminar una gran cantidad de ácido nucleico de la célula huésped. Así, en un modo de realización la incubación es de dos horas. Para la precipitación de la proteína de la célula huésped, puede ser suficiente un tiempo de incubación de aproximadamente dos horas a aproximadamente 48 horas dependiendo del valor de pH ajustado y del polipéptido. Por lo tanto, en un modo de realización, la incubación se realiza durante 20 2 horas a un valor de pH de pH 5 a una temperatura de 4 °C.

El polipéptido es una inmunoglobulina.

25 En un modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG1. La incubación puede ser de 2 horas a 48 horas a un pH de pH 4,5 a pH 3,5 y la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG1. En un modo de realización específico, la incubación se realiza durante 2 horas a 30 horas.

30 En un modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG4. La incubación puede ser de 2 horas a 48 horas a un pH de pH 5,5 a pH 4,5 y la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG4. La incubación se realiza a un valor de pH de pH 5.

35 Después de la incubación, se debe eliminar el precipitado. Para la eliminación se puede usar cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica. Los procedimientos ejemplares son filtración, sedimentación y decantación, centrifugación y deposición. En un modo de realización, la eliminación del precipitado se realiza mediante un procedimiento seleccionado entre sedimentación, filtración, deposición y centrifugación.

40 Después de la separación del precipitado, se puede realizar una purificación adicional del polipéptido, por ejemplo, con procedimientos cromatográficos conocidos por un experto en la técnica. Por lo tanto, en un modo de realización, el procedimiento como se informa en el presente documento comprende la etapa de purificar el polipéptido con una o más etapas cromatográficas.

45 Para la purificación de inmunoglobulinas se puede emplear una combinación de diferentes etapas de cromatografía en columna. En un modo de realización, una cromatografía de afinidad de la proteína A es seguida por una o dos etapas adicionales de separación cromatográfica, por ejemplo, etapas cromatográficas de intercambio iónico. Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la recuperación y purificación de proteínas, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando proteínas derivadas de microbios (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), interacción hidrófoba o cromatografía de adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), 50 cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar).

55 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

### Descripción de las figuras

60 **Figura 1** Contenido de ADN de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-EGFR obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

**Figura 2** Contenido de proteína de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-EGFR obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

65 **Figura 3** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-EGFR obtenido

con un procedimiento como se informa en el presente documento.

**Figura 4** Contenido de ADN de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

5 **Figura 5** Contenido de proteína de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

10 **Figura 6** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

**Figura 7** Contenido de ADN de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

15 **Figura 8** Contenido de proteína de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

**Figura 9** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

20 **Figura 10** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento dependiendo del valor de pH y del tiempo de incubación.

25 **Figura 11** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento dependiendo del valor de pH y del tiempo de incubación.

30 **Figura 12** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-HER3 obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento dependiendo del valor de pH y del tiempo de incubación.

### Ejemplo 1

#### 35 **Materiales y procedimientos**

##### **Anticuerpo**

40 El procedimiento del que se informa en el presente documento se ejemplifica con un anticuerpo anti-EGFR como se informa en el documento WO 2008/017963.

Otra inmunoglobulina ejemplar es un anticuerpo anti-PLGF como se informa en el documento WO 2006/099698.

45 Otra inmunoglobulina ejemplar es un anticuerpo anti-P-selectina como se informa en el documento WO 2005/100402.

Otra inmunoglobulina ejemplar es un anticuerpo anti-HER3 como se informa en PCT/EP2010/070062.

##### **ADN**

50 La concentración de ADN residual se midió mediante Q-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa). Por lo tanto, las muestras se incubaron a altas temperaturas para desnaturalizar el ADN en la muestra. El ADN se capturó de la solución mediante una matriz de sílice y se eluyó a partir de ella con tampón de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la extracción se utilizó un robot QIAcube incluyendo el kit QIAamp Viral RNA (ambos de Qiagen, Hilden, Alemania). Por lo tanto, la muestra, el tampón de lisis y el ARN portador se combinaron y se incubaron durante 10 minutos. Se añadió etanol a cada tubo y la columna del kit QIAamp Viral RNA se cargó con la solución de muestra-etanol y se centrifugó. Después se aplicó una solución de lavado a las columnas y de nuevo se centrifugó la columna. A continuación, se aplicó una solución de lavado diferente a la columna y la columna se centrifugó de nuevo. Después de aplicar el tampón de elución, la columna se centrifuga dos veces.

60 Para la cuantificación del ADN se utiliza un LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). En la Tabla 1 se describen los parámetros de la PCR.

**Tabla 1:** Parámetros de PCR

Ciclos	Etapas	Modo de análisis	Temperatura	Tiempo de mantenimiento
1	preincubación	ninguno	40 °C 95 °C	10 min 10 min
45	amplificación	cuantificación	95 °C 60 °C 69 °C	10 min 30 s 1 s
1	enfriamiento	ninguno	27 °C	30 s

- 5 Durante el procedimiento, las hebras de ADN marcadas con tinte se unen a las hebras simples de ADN. Durante la amplificación, la fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de ADN.

### HCP

- 10 Las paredes de los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con una mezcla de albúmina de suero y estreptavidina. Un anticuerpo policlonal derivado de cabra contra HCP se une a las paredes de los pocillos de la placa de microtitulación. Después de una etapa de lavado, los diferentes pocillos de la placa de microtitulación se incuban con una secuencia de calibración de HCP de diferentes concentraciones y solución de muestra. Después de la incubación, el material de muestra no unido se elimina lavando con solución tampón. Para la detección, los pocillos se incuban con un conjugado de anticuerpo peroxidasa para detectar la proteína de la célula huésped unida. La actividad de peroxidasa fijada se detecta por incubación con ABTS y detección a 405 nm.

### SEC

- 20 La cromatografía se llevó a cabo con una columna Tosoh Haas TSK 3000 SWXL en un sistema de HPLC ASI-100 (Dionex, Idstein, Alemania). Los picos de elución se monitorizaron a 280 nm mediante un detector de red de diodos UV (Dionex). Después de la disolución de las muestras concentradas a 1 mg/ml, la columna se lavó con un tampón constituido por dihidrogenofosfato de potasio 200 mM y cloruro de potasio 250 mM a pH 7,0 hasta que se alcanzó una línea de base estable. Los análisis se realizaron en condiciones isocráticas usando un caudal de 0,5 ml/min. 25 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cromatogramas se integraron manualmente con Chromeleon (Dionex, Idstein, Alemania).

### IEC

- 30 La cromatografía de intercambio iónico se utilizó para analizar la heterogeneidad de carga de la proteína. Se usó una columna de cromatografía Dionex ProPac de intercambio catiónico en un sistema de HPLC de Dionex Chromeleon.

### Determinación de proteínas

- 35 Se utilizó un procedimiento cromatográfico para cuantificar la cantidad de anticuerpo presente en una muestra. Se usó una columna Poros A que se une a la región Fc del anticuerpo. El anticuerpo se une a la columna y se eluye posteriormente en condiciones de pH bajo. La concentración de proteína se determinó determinando la densidad óptica (OD) a 280 nm, con una longitud de onda de referencia de 320 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos. 40

### Ejemplo 2

#### Procedimiento

- 45 Las muestras se obtuvieron directamente del medio de cultivo de las respectivas líneas celulares de secreción de anticuerpos. Después de eliminar las células y los restos celulares, el sobrenadante de cultivo se dividió en varias alícuotas de 200 ml cada una y se ajustó a un valor de pH de 4,0, 5,0 y 6,0, respectivamente, añadiendo ácido acético al 10 % o 20 % (v/v). En la alícuota de referencia, el valor de pH se ajustó, si se necesitaba, a 50 aproximadamente pH 7. Las alícuotas se almacenaron a 4 °C y se tomaron muestras de cada alícuota después de 2, 24 y 48 horas.

- 55 Durante el almacenamiento se observaron diferentes niveles de formación de precipitados a los diferentes valores de pH. El precipitado se eliminó por sedimentación. De forma alternativa, el precipitado se puede separar por filtración o centrifugación.



Después de la eliminación del precipitado, la fase líquida transparente se analizó para determinar el contenido de ADN de la célula huésped, el contenido de proteína de la célula huésped (HCP) y la cantidad de proteína.

5 **Tabla 2:** Contenido de ADN de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-EGFR obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

ADN de célula huésped [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	7,36	7,02	3,19	8,30
24	7,63	6,59	2,30	8,88
48	7,71	6,95	7,31	6,74

10 **Tabla 3:** Contenido de proteína de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-EGFR obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

Proteína de célula huésped [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	528	432	343	457
24	477	471	318	334
48	489	467	426	343

**Tabla 4:** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-EGFR obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

Proteína [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	2268	2307	2207	1530
24	2332	2305	2205	1521
48	2321	2316	2231	1572

15 **Tabla 5:** Contenido de ADN de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (1<sup>er</sup> conjunto de datos).

ADN de célula huésped [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	9,45	7,81	3,11	7,81
24	9,61	8,16	2,30	8,26
48	9,93	8,07	0,84	7,44

20 **Tabla 5a:** Contenido de ADN de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2<sup>o</sup> conjunto de datos).

ADN de célula huésped [µg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	5543	3007	286	846
24	2750	1828	65	58
48	3484	1504	103	49

25 **Tabla 5b:** Contenido de ADN de la célula huésped en el sedimento de un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2<sup>o</sup> conjunto de

datos).

ADN de célula huésped [µg/g]		
Tiempo (h)	pH 5,0	pH 4,0
2	85395	223104
24	183908	242948
48	145992	229317

5 **Tabla 6:** Contenido de proteína de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (1<sup>er</sup> conjunto de datos).

Proteína de célula huésped [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	1258	1176	276	390
24	1197	1151	205	363
48	1297	1069	178	357

10 **Tabla 6a:** Contenido de proteína de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2<sup>o</sup> conjunto de datos).

Proteína de célula huésped [mg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	983	1051	787	292
24	784	869	501	209
48	671	874	503	210

15 **Tabla 6b:** Contenido de proteína de la célula huésped en el sedimento de un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2<sup>o</sup> conjunto de datos).

Proteína de célula huésped [mg/g]		
Tiempo (h)	pH 5,0	pH 4,0
2	1693	1299
24	2236	1667
48	2024	1021

**Tabla 7:** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (1<sup>er</sup> conjunto de datos).

Proteína [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	1410	1393	1360	644
24	1410	1395	1358	603
48	1410	1394	1356	567

20

**Tabla 7a:** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-PLGF obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2º conjunto de datos).

Proteína [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	1003	1051	1012	1023
24	1022	1045	1023	1067
48	1016	1044	1045	1045

5 **Tabla 8:** Contenido de ADN de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (1º conjunto de datos).

ADN de célula huésped [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	11,38	5,85	2,55	13,35
24	11,52	5,94	1,31	6,85
48	11,22	5,69	1,66	87,40

10 **Tabla 8a:** Contenido de ADN de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2º conjunto de datos).

ADN de célula huésped [µg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	22068	10228	1	404
24	18250	7953	74	93
48	19305	6280	46	275

15 **Tabla 8b:** Contenido de ADN de la célula huésped en el sedimento de un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2º conjunto de datos).

ADN de célula huésped [µg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	-	-	65945	79413
24	-	-	90656	41701
48	393649	139806	10176	159770

20 **Tabla 9:** Contenido de proteína de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (1º conjunto de datos).

Proteína de célula huésped [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	218	209	212	281
24	244	384	208	215
48	714	254	144	1877

**Tabla 9a:** Contenido de proteína de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2º conjunto de datos).

Proteína de célula huésped [mg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	181	192	120	46
24	212	199	103	77
48	202	207	73	77

5 **Tabla 9b:** Contenido de proteína de la célula huésped en el sedimento de un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2º conjunto de datos).

Proteína de célula huésped [mg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	-	-	290	367
24	-	-	693	129
48	110	108	279	365

10 **Tabla 10:** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (1º conjunto de datos).

Proteína [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	1880	1880	1859	1094
24	1884	1885	1867	1399
48	1890	1881	1865	127

15 **Tabla 10a:** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-P-selectina obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento (2º conjunto de datos).

Proteína [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	2950	2933	2929	2231
24	2948	2867	2900	2157
48	3051	2981	2978	2077

20 **Tabla 11:** Contenido de ADN de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-HER3 obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

ADN de célula huésped [µg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	12333	15716	745	65
24	8053	19124	201	14
48	7703	15473	52	13

**Tabla 11a:** Contenido de ADN de la célula huésped en el sedimento de un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-HER3 obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

ADN de célula huésped [µg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	-	-	61749	57288
24	-	-	67944	48404
48	304107	186101	71909	25617

5 **Tabla 12:** Contenido de proteína de la célula huésped en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-HER3 obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

Proteína de célula huésped [mg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	522	432	186	40
24	488	384	141	31
48	476	346	115	87

10 **Tabla 12a:** Contenido de proteína de la célula huésped en el sedimento de un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-HER3 obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

Proteína de célula huésped [mg/g]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	-	-	770	465
24	-	-	612	424
48	1167	986	726	275

15 **Tabla 13:** Contenido de anticuerpo en un sobrenadante de cultivo de fermentación de anticuerpo anti-HER3 obtenido con un procedimiento como se informa en el presente documento.

Proteína [µg/ml]				
Tiempo (h)	Referencia	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
2	2992	3035	3047	2928
24	3005	3038	2997	2989

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para producir una inmunoglobulina de la subclase IgG1 o IgG4 comprende las siguientes etapas:
- i) añadir una solución que consiste en un ácido y agua a un sobrenadante de cultivo de células de mamífero del que se han eliminado las células de mamífero y los restos de células de mamífero para ajustar el valor de pH a un valor de pH 5, de manera que no se añaden cationes divalentes a la solución,
- 10 ii) incubar el sobrenadante de cultivo de células de mamífero de pH ajustado, y
- iii) eliminar el precipitado del sobrenadante de cultivo de células de mamífero incubado y, de este modo, producir la inmunoglobulina,
- 15 en el que el sobrenadante de cultivo de células de mamífero comprende la inmunoglobulina a una concentración de no más de 10 mg/ml,
- en el que la concentración del ácido añadido es 5,5 mol/l o inferior, y
- en el que la incubación es de 2 horas a 48 horas a un valor de pH de 5 a una temperatura de 4 °C.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque al menos un 90 % de la inmunoglobulina permanece en solución durante la etapa de incubación.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque al menos un 95 % de la inmunoglobulina permanece en solución durante la etapa de incubación.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 25 a) cultivar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina,
- b) eliminar las células de mamífero y restos de células de mamífero del sobrenadante de cultivo celular,
- c) ajustar el valor de pH del sobrenadante de cultivo de células de mamífero a un valor de pH 5,
- 30 d) incubar el sobrenadante de cultivo de células de mamífero de pH ajustado, y
- e) eliminar el precipitado del sobrenadante de cultivo de células de mamífero incubado y, de este modo, producir la inmunoglobulina.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la incubación se realiza durante aproximadamente 24 horas.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la eliminación se efectúa mediante un procedimiento seleccionado entre sedimentación, decantación, filtración, deposición y centrifugación.
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el ácido se selecciona entre ácido acético, ácido cítrico, ácido clorhídrico y ácido fosfórico.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la concentración del ácido es de 1,5 mol/l a 5,5 mol/l.
- 45 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, caracterizado porque el ácido es ácido acético con una concentración de 1,5 mol/l a 4 mol/l.
- 50 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la concentración del ácido es de un 10 % en peso a un 20 % en peso.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la concentración de la inmunoglobulina es de 1 mg/ml a 5 mg/ml.
- 55 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sobrenadante es un sobrenadante de cultivo de células CHO, HEK o Sp2/0.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula se selecciona entre células HEK y células CHO.
- 60 14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la célula es una célula CHO.
- 65 15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la incubación se realiza durante 2 horas a un valor de pH de pH 5 a una temperatura de 4 °C.

**Fig. 1**

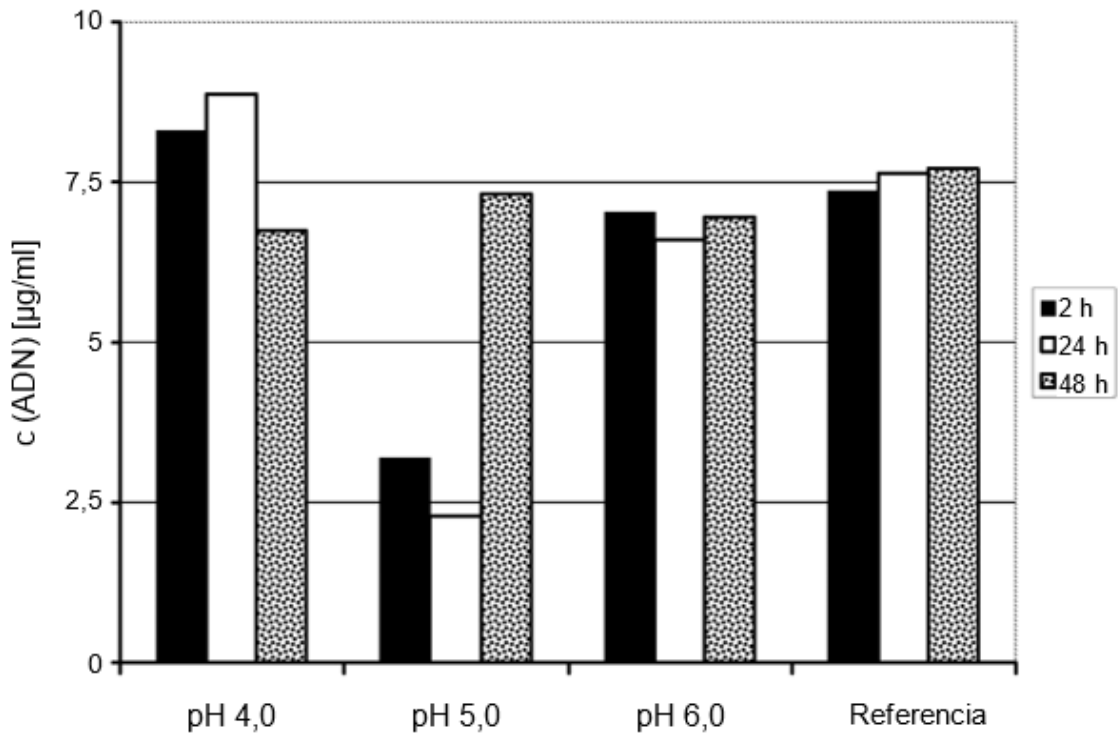
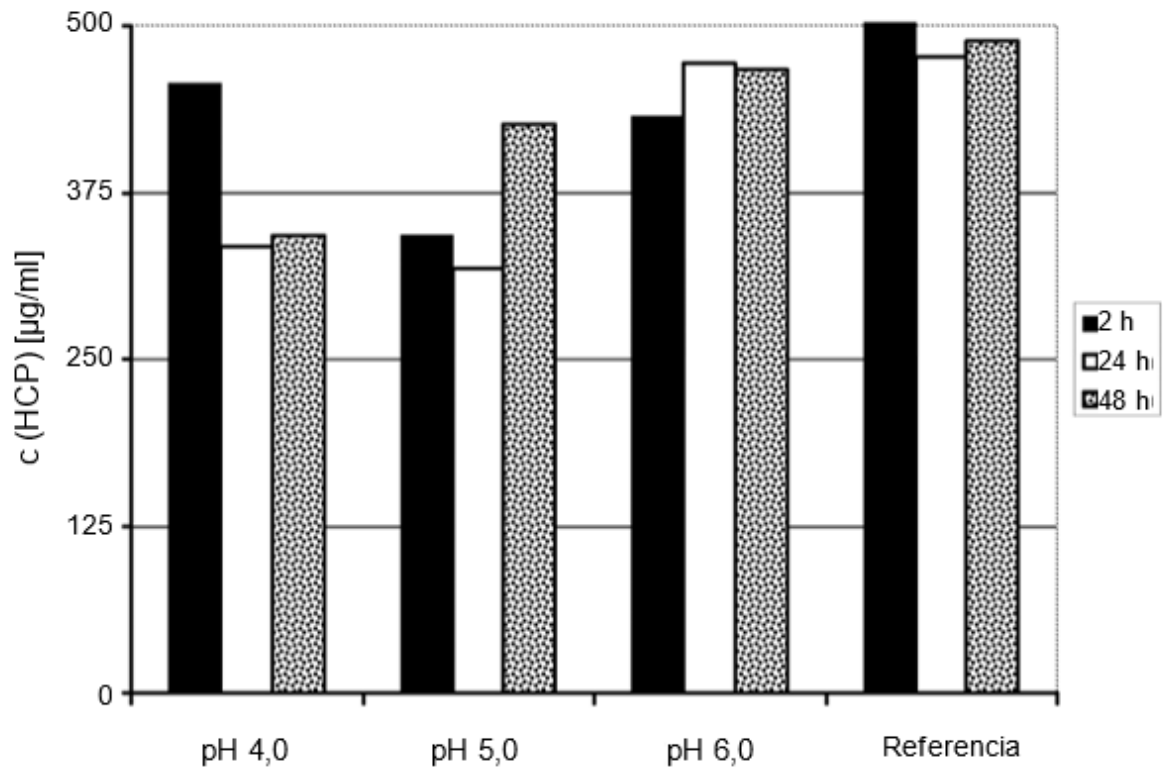
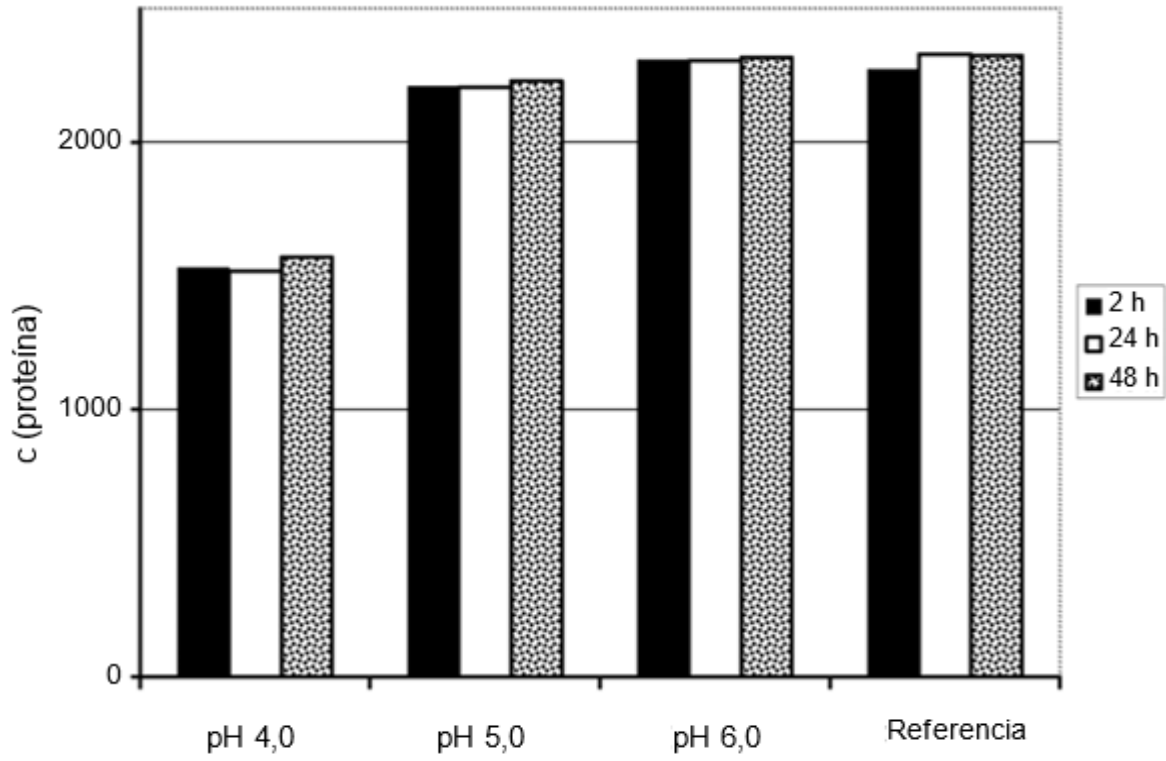


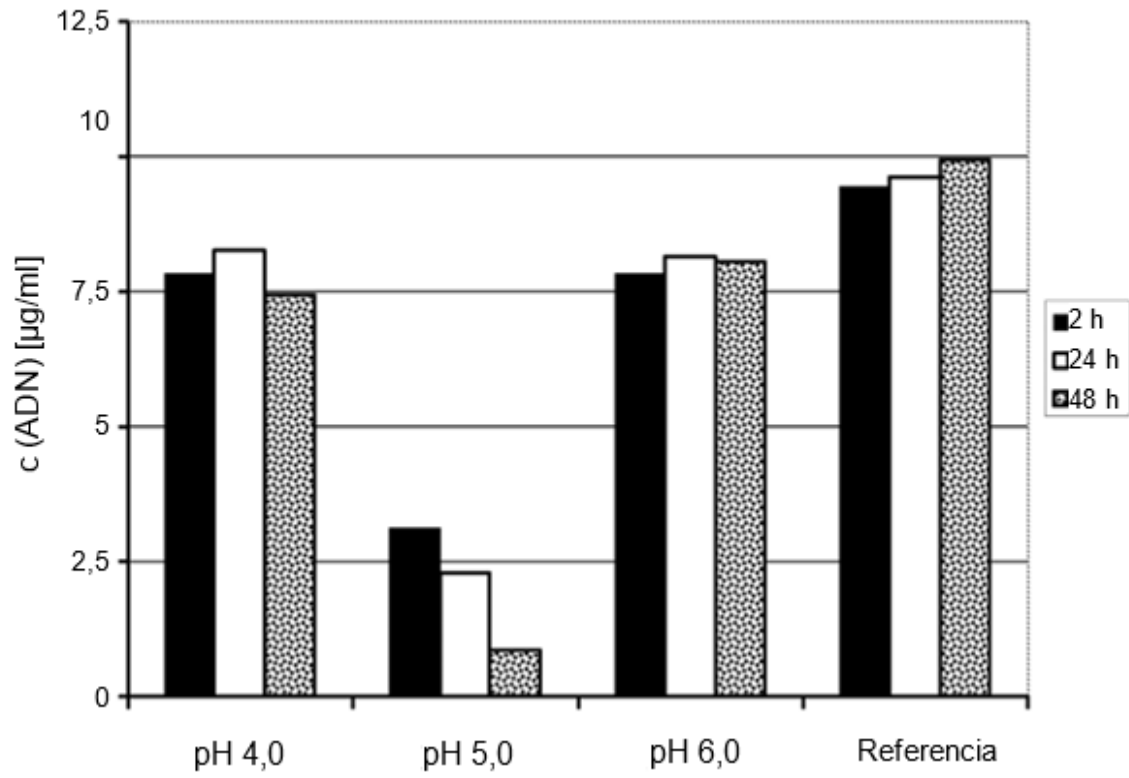
Fig. 2





**Fig. 3**



**Fig. 4**

**Fig. 5**

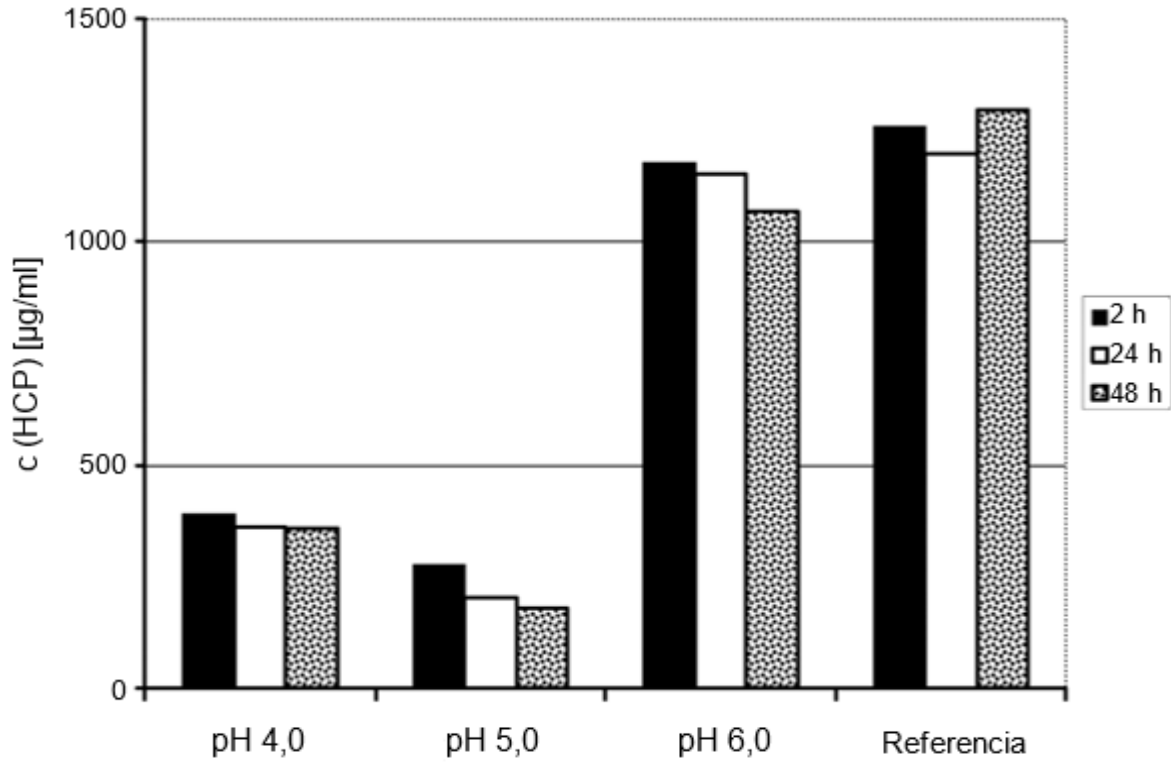


Fig. 6

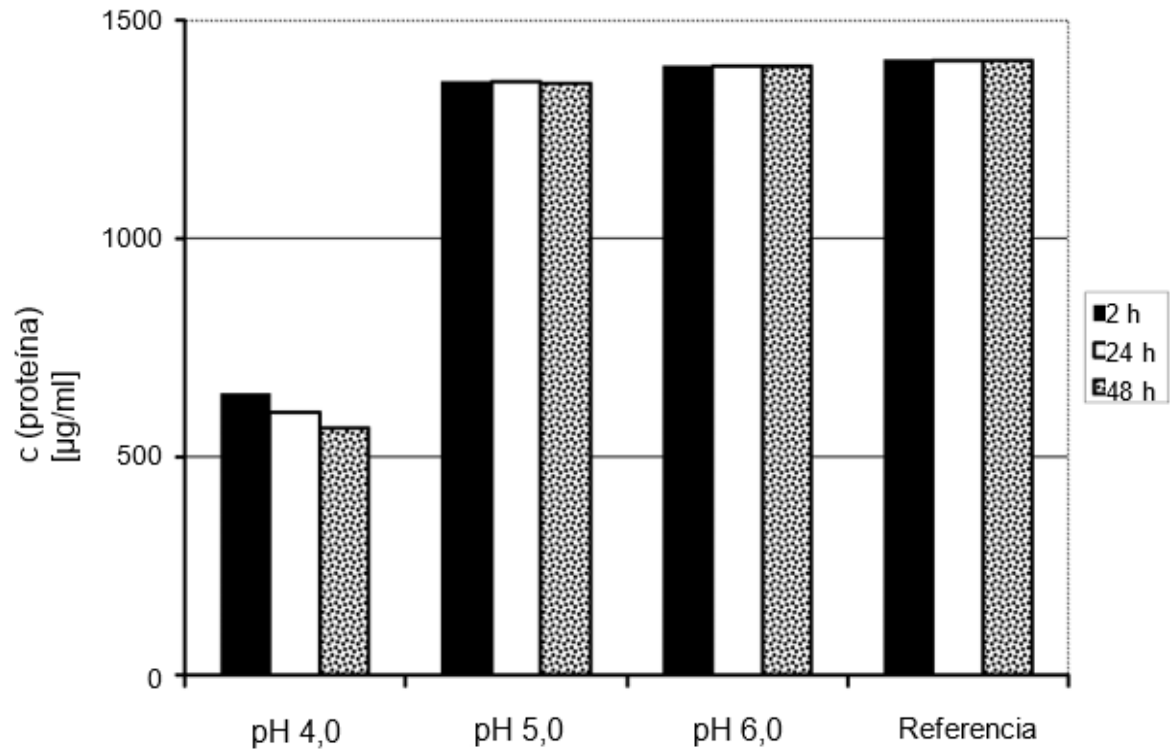


Fig. 7

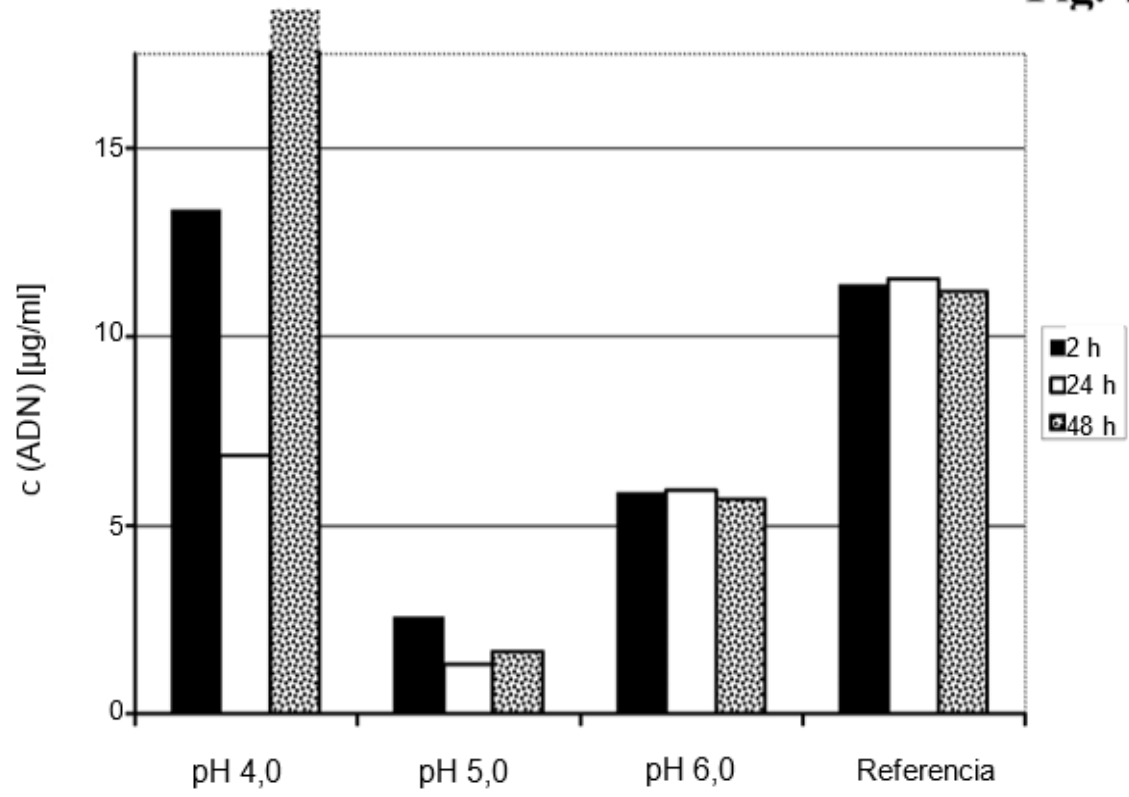
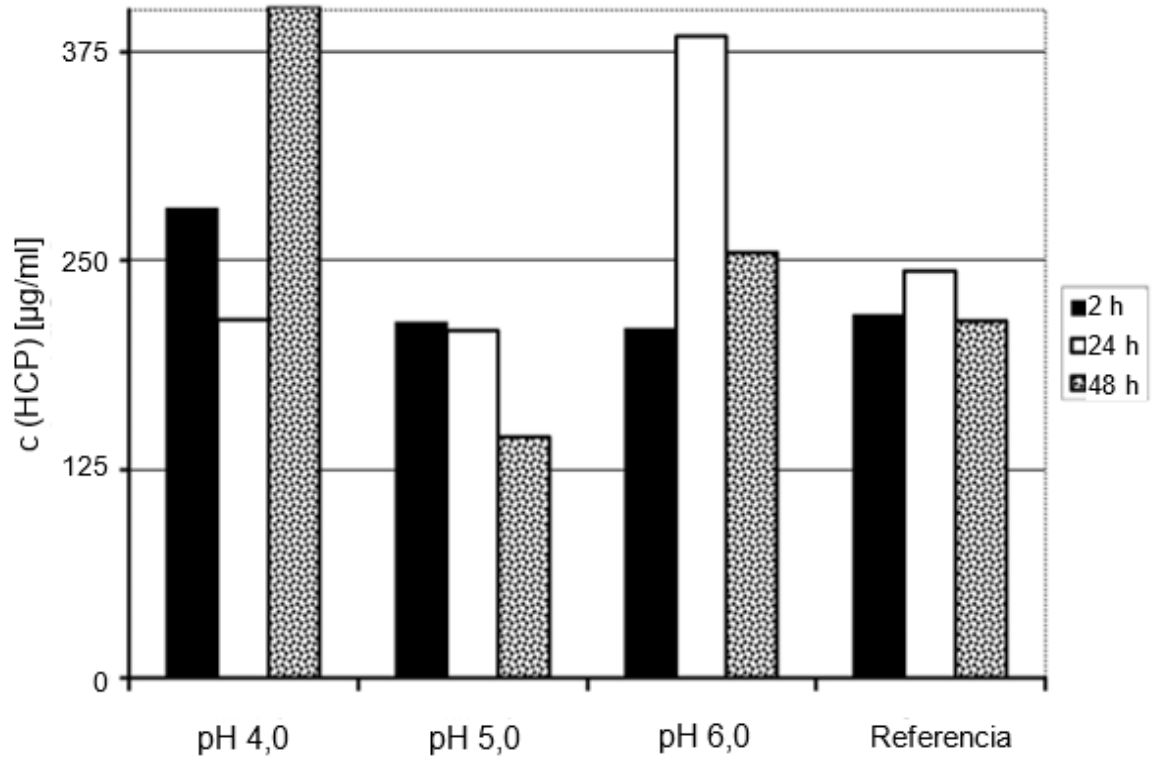
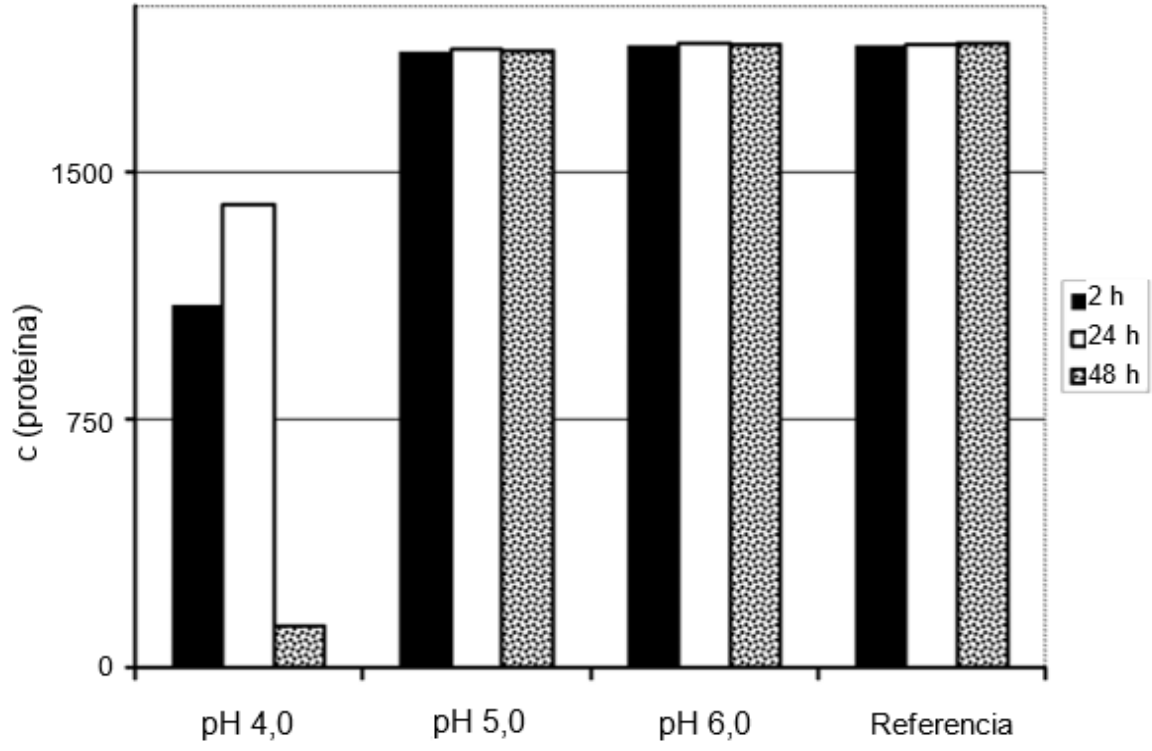


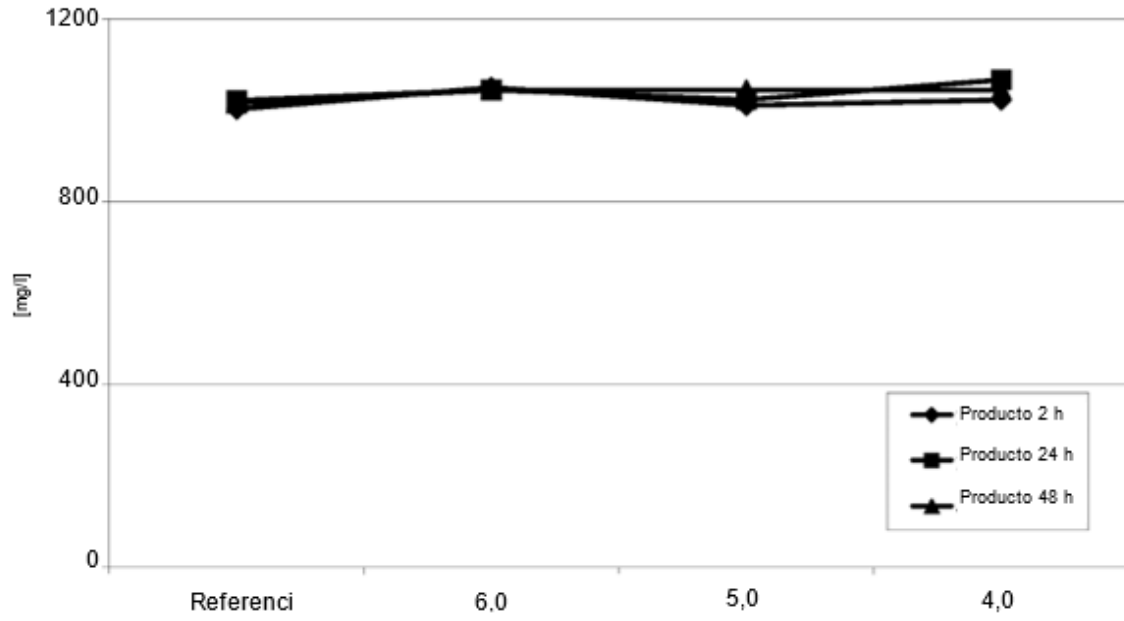
Fig. 8



**Fig. 9**

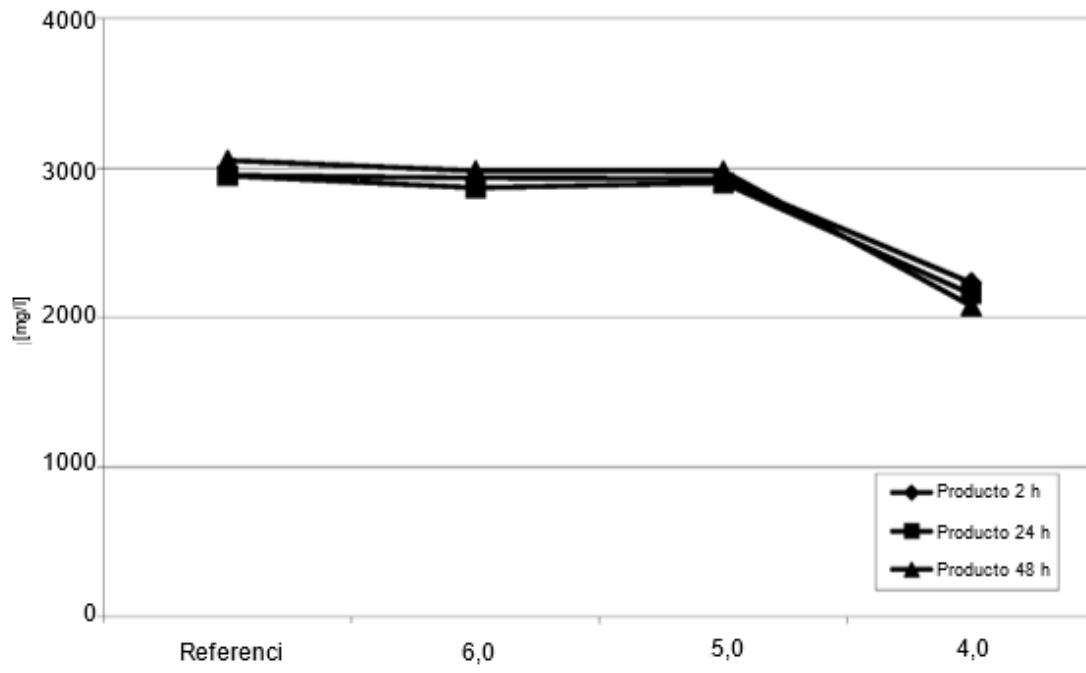


**Fig. 10**





**Fig. 11**



**Fig. 12**

