

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 922 132**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)
A61K 47/64 (2007.01)
C12P 19/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2008 E 18177128 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 3406635**

(54) Título: **Procedimiento abreviado de purificación para la producción de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae***

(30) Prioridad:

23.03.2007 US 89661607 P

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

08.09.2022

(73) Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

(72) Inventor/es:

**YUAN, YONGHUI;
RUPPEN, MARK;
SUN, WEI-QIANG;
CHU, LING;
SIMPSON, JOHN;
PATCH, JAMES;
FINK CHARBONNEAU, PAMELA y
MORAN, JUSTIN K.**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 922 132 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 abreviado de purificación para la producción de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos para retirar el exceso de proteína soluble y otras impurezas de lisados celulares de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) usados en la producción de polisacáridos purificados de neumococos.

Antecedentes de la invención

10 *Streptococcus pneumoniae* son cocos gram-positivos con forma de lanceta que se observan habitualmente en parejas (diplococos), pero también en cadenas cortas o como células individuales. Crecen fácilmente en placas de agar con sangre con colonias brillantes y presentan alfa hemólisis salvo que crezcan de forma anaeróbica donde muestran beta hemólisis. Son sensibles a las sales biliares que pueden descomponer la pared celular con la presencia de la propia enzima de las células, autolisina. El organismo es un anaerobio aerotolerante y es exigente porque tiene necesidades nutritivas complejas.

15 Las células de la mayoría de los serotipos de neumococos tienen una cápsula que es un polisacárido de recubrimiento que rodea cada célula. Esta cápsula es un determinante de virulencia en seres humanos porque impide la fagocitosis evitando que los anticuerpos ataquen a las células bacterianas. Actualmente existen 90 serotipos capsulares identificados, con 23 serotipos responsables de aproximadamente el 90 % de enfermedades invasivas. Como vacuna, el polisacárido puede conferir un grado razonable de inmunidad contra *S. pneumoniae* en individuos con sistemas inmunitarios desarrollados o no alterados. Sin embargo, cuando el polisacárido se conjuga con una proteína de alto peso molecular tal como CRM₁₉₇ y se formula en una vacuna que contiene conjugados de múltiples serotipos, dichas vacunas de conjugado permiten una respuesta inmunitaria en lactantes y en ancianos que son los que están en mayor riesgo de infecciones por neumococos.

25 El polisacárido capsular para cada serotipo de *S. pneumoniae* utilizado para productos de vacuna se produce cultivando el organismo en medio líquido. La población del organismo a menudo se aumenta en escala desde un vial de siembra hasta frascos de siembra y se pasa a través de uno o más fermentadores de siembra de volumen creciente hasta que se alcanzan los volúmenes de fermentación a escala de producción. El final del ciclo de crecimiento puede determinarse por uno de varios medios, punto en el cual las células se lisan a través de la adición de un detergente u otro reactivo que ayude en la descomposición de la pared celular y libere autolisina que causa la lisis celular cuando las células alcanzan la fase estacionaria. El caldo después se recoge para procesamiento corriente abajo (purificación). Los contaminantes principales son proteínas celulares, ácidos nucleicos, polisacárido-C y componentes del medio.

30 Para la mayoría de los serotipos para la vacuna 7-valente de conjugado de neumococos (7vPnC) actualmente comercializada (Prevnar®), así como la vacuna 13-valente de conjugado de neumococos (13vPnC) recientemente desarrollada, el procedimiento actual de purificación requiere diecisésis etapas que incluyen muchas operaciones caras, muy laboriosas y exigen mucha tecnología, tal como cromatografía y múltiples separaciones en membrana. Los intentos previos de mejorar los procedimientos de purificación para polisacáridos de *S. pneumoniae* han incluido, por ejemplo, manipulación del pH durante la fermentación y la recuperación (véase la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Pub. Núm. 2006/0228381) y la precipitación con disolventes y detergentes.

35 40 Sin embargo, la retirada de impurezas en estos procedimientos aún se extiende sobre muchas etapas muy laboriosas y costosas. El nivel de proteínas es la especificación más problemática de cumplir debido a las propiedades físicas y químicas de las proteínas solubles. El documento US5623057 desvela un procedimiento de purificación del polisacárido neumocócico preparado por medio de la hidrolización parcial de una preparación cruda hasta un punto final predeterminado. El documento EP1762245 desvela la eliminación de polisacáridos no ligados de vacunas de polisacáridos-proteínas conjugadas mediante el uso del procedimiento de ultrafiltración en el que la solución de diafiltración contiene niveles saturantes de sulfato de amonio. El documento EP0002404 desvela un procedimiento de purificación de polisacáridos neumocócicos que comprende una precipitación de alcohol en dos etapas. El documento WO82/01995 desvela un procedimiento de purificación de polisacáridos neumocócicos que comprende el tratamiento con fenol. El documento US2006228381 desvela un procedimiento de purificación de polisacáridos neumocócicos que utiliza la reducción del pH tras la lisis celular.

45 Por tanto, existe una necesidad de un procedimiento de purificación simplificado para reducir los niveles de proteína soluble en lisados de *S. pneumoniae* y eliminar las ineficacias del actual procedimiento de purificación de producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados adecuados para su incorporación en vacunas de conjugado de neumococos.

50 Sumario de la divulgación

55 La presente divulgación se refiere a un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae*. Este procedimiento comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen un serotipo seleccionado de *Streptococcus pneumoniae*;
- (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- 5 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
- (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido;
- 10 (e) disminuir el pH del retenido de la etapa (d) hasta menos de 4,5 para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, para de este modo formar una solución acidificada de retenido;
- (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
- 15 (g) filtrar la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) a través de un filtro de carbono activado;
- (h) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (g), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
- (i) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (h) usando un filtro estéril;

mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados en forma de una solución. Los serotipos no limitantes ejemplares de *S. pneumoniae* seleccionados para esta realización de la invención son 1,4, 5, 20 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, y 23F. En una realización particular, el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH hasta aproximadamente 7,4. En otra realización más, la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido de la etapa (d). En otra realización, la etapa (g) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f). En otra realización, el filtro de carbono activado de la etapa (g) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera. En otra realización, la etapa (f) comprende mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas. En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es desoxicíclato sódico (DOC). En otra realización, el agente lítico de la etapa (b) es un agente lítico de origen no animal. En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es el agente lítico de origen no animal N-lauryl sarcosina sódica (NLS).

El polisacárido capsular sustancialmente purificado producido por un procedimiento de la invención a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* puede usarse en la fabricación de una vacuna de neumococos, preferentemente una vacuna de neumococos que contiene polisacárido conjugado con un vehículo proteico.

35 La presente divulgación también se refiere a un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* que comprende el serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F. Este procedimiento comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F;
- 40 (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
- 45 (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a temperatura ambiente a pH neutro en medio sin sal para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido sin sal;
- (e) disminuir el pH del retenido sin sal de la etapa (d) hasta menos de 4,5 para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, para de este modo formar una solución acidificada de retenido;
- 50 (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
- (g) filtrar la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) a través de un filtro de carbono activado;
- (h) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (g), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
- 55 (i) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (h) usando un filtro estéril;

mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados que comprenden el serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F en forma de una solución. En una realización particular, el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH hasta aproximadamente 7,4. En otra realización más, la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido sin sal de la etapa (d). En otra realización, la etapa (g) retira al menos el

90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f). En otra realización, el filtro de carbono activado de la etapa (g) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera. En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es desoxicolato sódico (DOC). En otra realización, el agente lítico de la etapa (b) es un agente lítico de origen no animal.

- 5 En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es el agente lítico de origen no animal N-lauril sarcosina sódica (NLS).

La presente invención también se refiere a un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* que comprende el serotipo 19A. Este procedimiento comprende las etapas de:

- 10 (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A;
 (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
 (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a aproximadamente 4 °C a un pH de aproximadamente 6 en tampón fosfato sódico para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido;
 (e) disminuir el pH del retenido de la etapa (d) hasta menos de 4,5 para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, para de este modo formar una solución acidificada de retenido;
 (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a aproximadamente 4 °C para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
 (g) ajustar el pH de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) hasta aproximadamente 6, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido de pH ajustado;
 (h) filtrar la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g) a través de un filtro de carbono activado;
 (i) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (h), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
 (j) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (i) usando un filtro estéril;

mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados que comprenden el serotipo 19A en forma de una solución. En una realización particular, el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH hasta aproximadamente 7,4. En otra realización más, la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido de la etapa (d). En otra realización, la etapa (h) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g). En otra realización, el filtro de carbono activado de la etapa (h) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera. En otra realización, el tampón fosfato sódico de la etapa (d) es fosfato sódico 25 mM. En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es desoxicolato sódico (DOC). En otra realización, el agente lítico de la etapa (b) es un agente lítico de origen no animal. En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es el agente lítico de origen no animal N-lauril sarcosina sódica (NLS).

Breve descripción de los dibujos

- 45 La Figura 1 muestra el rendimiento promedio de polisacárido en el procedimiento (PS), la relación proteína/PS y la relación ácido nucleico (NA)/PS para el serotipo 5 usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
 La Figura 2 muestra los espectros de NMR para PS de serotipo 4 del actual procedimiento de purificación (A) en comparación con el PS de serotipo 4 del procedimiento acortado de purificación (B). No se observaron diferencias significativas entre los dos espectros. El segundo pico de la derecha en ambos espectros era piruvato, y la altura del pico del grupo piruvato era comparable en ambos espectros.
 La Figura 3 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 4 usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
 La Figura 4 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 19A usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
 La Figura 5 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 7F usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
 La Figura 6 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación

de NA/PS para el serotipo 6B usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.

La Figura 7 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 6B mediante el uso del procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.

La Figura 8 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 1 usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.

La Figura 9 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 14 usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.

La Figura 10 muestra una comparación de los rendimientos de PS en el procedimiento para los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, y 19F purificados usando el procedimiento acortado de purificación de la invención.

La Figura 11 muestra una comparación de las relaciones de proteína/PS para los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, y 19F purificados usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se comparan para cada etapa de purificación.

La Figura 12 muestra una comparación de las relaciones de NA/PS para los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, y 19F purificados usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se comparan para cada etapa de purificación.

La Figura 13 muestra la eficacia de retirada de proteínas que se puede atribuir a la etapa de acidificación del procedimiento acortado de purificación de la invención. La diferencia en la concentración de proteínas (SDS-PAGE) antes y después de la acidificación se representa frente a la concentración inicial de proteínas antes de la acidificación para lotes de los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, y 19F. La diferencia de concentración de proteínas dividida por la concentración inicial de proteínas reflejaba la tasa de retirada de proteínas por la etapa de acidificación.

La Figura 14 muestra la eficacia de retirada de proteínas que se puede atribuir a la etapa de adsorción en carbono del procedimiento acortado de purificación de la invención. La cantidad de proteínas retirada (adsorbida sobre carbono) se representó frente a las cantidades iniciales de carga de proteínas para lotes de los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, y 19F. La cantidad de proteínas retiradas dividida por las cantidades iniciales de carga de proteínas reflejaba la tasa de retirada de proteínas por la etapa de adsorción en carbono.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento acortado de purificación para reducir los niveles de proteínas solubles en lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae* de producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados adecuados para su incorporación en vacunas de conjugado de neumococos. Para la mayoría de los serotipos para la vacuna 7-valente de conjugado de neumococos (7vPnC) actualmente comercializada (Prevnar®), así como la vacuna 13-valente de conjugado de neumococos (13vPnC) recién desarrollada, el actual procedimiento de purificación de polisacáridos requiere hasta diecisésis etapas. Estas etapas implican muchas operaciones caras, muy laboriosas y exigen mucha tecnología, tal como cromatografía y múltiples separaciones en membrana. El procedimiento de la presente invención elimina hasta ocho de estas etapas consiguiendo al mismo tiempo la misma purificación y elimina la necesidad de cromatografía. Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento más eficaz de purificación que es menos caro, consume menos tiempo e implica menos etapas.

El procedimiento acortado de purificación de la presente invención se refiere al descubrimiento de que la ultrafiltración y la diafiltración de un caldo de lisado celular aclarado de *S. pneumoniae*, seguido por acidificación del caldo de lisado concentrado con un ácido orgánico o uno mineral hasta un pH de 4,5, preferentemente aproximadamente 3,5, precipita al menos el 98 % de las proteínas en la solución sin afectar de forma grave al rendimiento de polisacáridos. Ultrafiltrando y diafiltrando el caldo de fermentación lisado y aclarado antes de la acidificación hasta un pH de menos de 4,5, preferentemente aproximadamente 3,5, se eliminan los efectos de "salado" de las proteínas y se aumenta la fracción de proteínas que está "desalada". "Salación" se refiere a solubilidad aumentada de las proteínas mientras que "desalado" se refiere a precipitación de las proteínas en solución según alcanzan sus puntos isoelectrómicos. La etapa de ultrafiltración y de diafiltración también evita la formación de espuma observada cuando el caldo tratado con carbonato sódico experimenta acidificación incluso hasta un pH de 5,0 (véase la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 2006/0228381). Por tanto, la ultrafiltración y la diafiltración del caldo de lisado aclarado hace posible usar cualquier agente de titulación de pH de bajo peso molecular tal como carbonato sódico durante la fermentación del serotipo de *S. pneumoniae* y evita la formación de espuma del caldo de lisado aclarado cuando se acidifica hasta un pH de menos de 4,5.

"Caldo de lisado aclarado" se refiere a un caldo de lisado que ha experimentado centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares.

"Diafiltrar", "diafiltración", "DF" y términos similares se refieren a, por ejemplo, usar membranas semipermeables con propiedades físicas y químicas apropiadas para retirar moléculas pequeñas de una solución.

"Ultrafiltrar", "ultrafiltración", "UF" y términos similares se refieren a, por ejemplo, usar membranas semipermeables

con propiedades físicas y químicas apropiadas para discriminar entre moléculas en una solución y moléculas de tipo concentrado en un volumen más pequeño de solución.

Dentro de los procedimientos de la presente invención, la ultrafiltración y la diafiltración típicamente comprenden filtración de "flujo transversal" o de "flujo tangencial" a fin de evitar la obstrucción de las membranas de filtración. En 5 la filtración de "flujo transversal", la solución a filtrar se pasa a través de la superficie de la membrana. Los materiales que pasan a través de la membrana se mencionan como permeado. Los materiales que no pasan a través de la membrana se mencionan como retenido. El retenido se recicla hasta un depósito de alimentación para volver a filtrarse.

Como se usa en la presente memoria, se usa un ácido orgánico o uno mineral para disminuir el pH del caldo de lisado ultrafiltrado y diafiltrado siempre que se consiga un pH de menos 4,5, particularmente aproximadamente 3,5. Por consiguiente, pueden usarse ácidos tanto orgánicos como minerales dentro de los procedimientos de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido mineral" se refiere a un ácido derivado de mineral inorgánico por reacción química en oposición a los ácidos orgánicos. Los ejemplos no limitantes, ejemplares de ácidos minerales que pueden usarse dentro de los procedimientos de la presente invención incluyen ácido 10 clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. En realizaciones particulares, el pH del caldo de lisado concentrado se disminuye hasta menos de 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1 o 3,0. En otras realizaciones, el pH del caldo de lisado concentrado se disminuye hasta aproximadamente 4,4, 15 aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,0, aproximadamente 3,9, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,4, 20 aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,0, aproximadamente 2,9, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,1 o aproximadamente 2,0.

El procedimiento acortado de purificación de la presente invención también se refiere al descubrimiento en que, en combinación con las etapas de concentración y bajo pH descritas anteriormente, la filtración mediante el uso de carbono activado precipita al menos el 90 % de las proteínas restantes sin afectar de forma grave al rendimiento de polisacáridos. En realizaciones particulares, la filtración con carbono usando carbono derivado de serrín u otros productos de la madera y activado con ácido fosfórico se descubrió que es más eficaz en reducir o retirar las impurezas de proteínas que carbonos usados dentro de los actuales procedimientos de filtración con carbono.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen un serotipo seleccionado de *Streptococcus pneumoniae*;
- (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- 35 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
- (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido;
- 40 (e) disminuir el pH del retenido de la etapa (d) hasta menos de 4,5, particularmente aproximadamente 3,5, para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, para de este modo formar una solución acidificada de retenido;
- (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado, particularmente durante al menos 2 horas con o sin agitación, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
- 45 (g) filtrar la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) a través de un filtro de carbono activado, particularmente un filtro de carbono activado que comprende carbono activado por ácido fosfórico basado en madera;
- (h) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (g), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
- 50 (i) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (h) usando un filtro estéril;

mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados en forma de una solución. La filtración a esterilidad de la etapa (i) es útil para retirar las bacterias y partículas de la solución concentrada de polisacárido purificado. Los serotipos no limitantes ejemplares de *S. pneumoniae* seleccionados para esta realización de la invención son 1,4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, y 23F. En una realización particular, la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido de la etapa (d). En otra realización, la etapa (g) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f). En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5. Para una estabilidad mejorada del polisacárido capsular sustancialmente purificado durante almacenamiento a largo plazo, sin embargo, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta 60 aproximadamente 7,5, y más particularmente hasta aproximadamente 7,4.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "lisado que contiene polisacárido capsular sustancialmente purificado" o "solución que contiene polisacáridos capsulares sustancialmente purificados" se refieren a un lisado celular o solución de *Streptococcus pneumoniae* a partir de la cual se han retirado las proteínas de forma que la relación porcentual de proteína a polisacárido (proteína/PS) sea de menos del 10 %, menos del 9 %, menos del 8 %, 5 menos del 7 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 % y la relación porcentual de ácido nucleico a polisacárido (NA/PS) sea menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 %. En realizaciones particulares, las relaciones porcentuales de proteína/PS y NA/PS para lisados o soluciones que contienen polisacárido capsular sustancialmente purificado que comprenden serotipos específicos son las siguientes: para el serotipo 1 la relación de proteína/PS es de menos del 2 % y la relación de 10 NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 4 la relación de proteína/PS es menor del 3 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 5 la relación de proteína/PS es menor o igual al 7,5 % y la relación de NA/PS es menor o igual 2 %, para el serotipo 6A la relación de proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 6B la relación de proteína/PS es menor del 4 % y la relación de NA/PS es menor del 1 %, para el serotipo 15 7F la relación de proteína/PS es menor del 5 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 9V la relación de proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 1 %, para el serotipo 14 la relación de proteína/PS es menor del 3 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 18C la relación de proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 19A la relación de proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 19F la relación de proteína/PS es menor del 3 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, y para el serotipo 23F la relación de 20 proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %. Los procedimientos para la cuantificación de concentraciones de proteína, polisacárido y ácido nucleico en el lisado celular o solución son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, análisis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico), HPLC (cromatografía de líquida de alto rendimiento) y SEC (cromatografía por exclusión de tamaño), 25 ensayos de Lowry modificados, espectrofotometría, SEC-MALLS (cromatografía por exclusión de tamaño/dispersión de luz láser de múltiple ángulo), y NMR (resonancia magnética nuclear).

Dentro de los procedimientos de la presente invención, las células bacterianas se pueden lisar mediante el uso de cualquier agente lítico. Un "agente lítico" es cualquier agente que ayuda en la descomposición de la pared celular y libera la autolisina que causa lisis celular incluyendo, por ejemplo, detergentes. Como se usa en el presente documento, el término "detergente" se refiere a cualquier detergente aniónico o catiónico capaz de inducir la lisis de 30 células bacterianas. Ejemplos representativos de dichos detergentes para su uso dentro de los procedimientos de la presente invención incluyen desoxicolato sódico (DOC), N-lauril sarcosina (NLS), ácido quenodesoxicólico de sodio y saponinas.

En una realización de la presente invención, el agente lítico usado para lisar las células bacterianas es DOC. DOC es la sal sódica del ácido biliar ácido desoxicólico, que se obtiene habitualmente de fuentes biológicas tales como vacas o bueyes. DOC activa la proteína LytA, que es una autolisina que está implicada en el crecimiento de la pared celular y en la división en *Streptococcus pneumoniae*. La proteína LytA tiene dominios de unión a colina en su parte C-terminal, y se sabe que mutaciones del gen *lytA* producen mutantes LytA que son resistentes a lisis con DOC.

Aunque no existen evidencias de que el uso de DOC durante la purificación de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* posea un riesgo para la salud, el uso de dichos reactivos biológicamente derivados podría generar 40 preocupaciones reguladoras potenciales. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, el agente lítico usado para lisar las células bacterianas es un agente lítico de origen no animal. Los agentes líticos de origen no animal para su uso dentro de los procedimientos de la presente invención incluyen agentes de fuentes no animales con modos de acción similares a los de DOC (es decir, que afectan a la función LytA y provocan la lisis de células de *Streptococcus pneumoniae*). Dichos agentes líticos de origen no animal incluyen, aunque sin limitación, 45 análogos de DOC, tensioactivos, detergentes y análogos estructurales de colina, y pueden determinarse usando procedimientos como se describe en la sección experimental en el presente documento a continuación. En una realización, el agente lítico no derivado de animales se selecciona del grupo que consiste en ácido decanesulfónico, tert-octilfenoxi poli(oxietileno)etanoles (por ejemplo, Igepal® CA-630, CAS núm.: 9002-93-1, disponible en Sigma Aldrich, St), condensados de óxido de etileno de octilfenol (por ejemplo, Triton® X-100, disponible en Sigma Aldrich, 50 St. Louis, MO), N-lauril sarcosina sódica (NLS), iminodipropionato de laurilo, dodecil sulfato de sodio, quenodesoxicólico, hidroxideoxicólico, glicodeoxicólico, taurodeoxicólico, taurochenodesoxicólico y colato. En otra realización, el agente lítico de origen no animal es NLS.

La presente invención también se refiere a modificaciones específicas de serotipo al procedimiento descrito anteriormente. Por ejemplo, como el polisacárido de serotipo 19A es inestable y su peso molecular cambia durante la purificación, se descubrió que modificaciones al procedimiento descrito eran útiles para estabilizar el polisacárido 55 19A. Estas modificaciones incluían realizar la etapa de ultrafiltración y de diafiltración antes de la acidificación a aproximadamente 4 °C a un pH de aproximadamente 6 en tampón fosfato sódico, mantener la solución acidificada de retenido durante al menos 2 horas a aproximadamente 4 °C para permitir la sedimentación del precipitado y ajustar el pH de la solución aclarada de polisacárido hasta 6 antes de la etapa de filtración con carbono activado. En contraste, se descubrió que para los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, se perdía menos 60 polisacárido y se conseguía mayor retirada de proteínas cuando la etapa de ultrafiltración y de diafiltración antes de la acidificación se llevaba a cabo en medios sin sal tales como agua, y esta etapa se podía llevar a cabo a temperatura ambiente a pH neutro.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* que comprende el serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F, que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F;
- 10 (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un detergente, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- 15 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
- 20 (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a temperatura ambiente a pH neutro en medio sin sal para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido sin sal;
- 25 (e) disminuir el pH del retenido sin sal de la etapa (d) hasta menos de 4,5, particularmente aproximadamente 3,5, para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, para de este modo formar una solución acidificada de retenido;
- 30 (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente con o sin agitación para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
- 35 (g) filtrar la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) a través de un filtro de carbono activado, particularmente un filtro de carbono activado que comprende carbono activado por ácido fosfórico basado en madera;
- 40 (h) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (g), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
- 45 (i) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (h) usando un filtro estéril;
- 50 mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados que comprenden el serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F en forma de una solución. En una realización particular, la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido sin sal de la etapa (d). En otra realización, la etapa (g) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f). En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5. Para una estabilidad mejorada del polisacárido capsular sustancialmente purificado durante almacenamiento a largo plazo, sin embargo, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5, y más particularmente hasta aproximadamente 7,4.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* que comprende el serotipo 19A, que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A;
- 10 (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un detergente, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- 15 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
- 20 (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a aproximadamente 4 °C a un pH de aproximadamente 6 en tampón fosfato sódico, fosfato sódico 25 mM, para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido;
- 25 (e) disminuir el pH del retenido de la etapa (d) hasta menos de 4,5, particularmente aproximadamente 3,5, para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, para de este modo formar una solución acidificada de retenido;
- 30 (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a aproximadamente 4 °C con o sin agitación para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
- 35 (g) ajustar el pH de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) hasta aproximadamente 6, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido de pH ajustado;
- 40 (h) filtrar la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g) a través de un filtro de carbono activado, particularmente un filtro de carbono activo que comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera;
- 45 (i) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (h), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
- 50 (j) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (i) usando un filtro estéril;
- 55 mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados que comprenden el serotipo 19A en forma de una solución. En una realización particular, la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido de la etapa (d). En otra realización, la etapa (h) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g). En otra realización, la diafiltración de la etapa (i) comprende

un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5. Para una estabilidad mejorada del polisacárido 19A sustancialmente purificado durante almacenamiento a largo plazo, sin embargo, la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5, y más particularmente hasta aproximadamente 7,4.

- 5 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo limitación.

Parte experimental

Los siguientes Ejemplos presentan resultados para los serotipos de polisacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 19F purificados a escala de 10 l mediante el uso del procedimiento mejorado de la presente invención, y los resultados se comparan con aquellos del actual procedimiento de purificación.

10 **Ejemplo 1. Procedimiento acortado de purificación para los serotipos de polisacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14 y 19A.**

Se obtuvieron caldos de fermentación de *S. pneumoniae* lisados con desoxicolato sódico (DOC) en dos días después de su recolección o se almacenaron a 4 °C y se procesaron en la siguiente semana. Como se describe a continuación, el presente procedimiento de purificación incluía los siguientes cambios en comparación con el procedimiento existente de purificación: 1) la etapa de acidificación se movió desde el inicio hasta después de la primera etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), y el pH se ajustó hasta 7,5 en lugar de 5; 2) el tampón de diafiltración se cambió de fosfato 0,025 M a agua desionizada (DI); 3) la adsorción en carbono se cambió a 2 discos de carbono CUNO R32SP (CUNO Inc., Wayne, NJ) mediante el uso de carbono activado con ácido fosfórico basado en madera, y el tiempo de adsorción se prologó de 4 a 12 rotaciones (cada rotación era de 22 minutos); y 4) el pH se ajustó hasta 7,4 durante la última etapa de diafiltración 30 K cuando se diafiltraba aproximadamente 5 veces. Se aplicó el mismo procedimiento de purificación para los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B o 7F. Para el serotipo 19A, las etapas se modificaron adicionalmente y la purificación se realizó en una habitación refrigerada, como se describe a continuación.

Etapas de purificación

25 Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente excepto para el tipo 19A, en cuyo caso el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C en una habitación refrigerada.

Aclaración del lisado: El propósito de esta etapa fue retirar los desechos celulares y aclarar el caldo. Esto se consiguió por centrifugación o filtración. El caldo se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos o hasta que el caldo estaba transparente a 20 °C (4 °C para el tipo 19A), o se filtró con un Millipore Prefilter (Millipore Corp., Billerica, MA) 30 con la adición de auxiliares de filtro Celpure® (Advanced Minerals, Santa Bárbara, CA). El lisado aclarado se recogió para procesamiento adicional y se desecharon los sedimentos.

Primera UF/DF (Ultrafiltración/Diafiltración): Esta etapa proporcionó reducción del volumen e intercambio de tampón y también retiró las impurezas de bajo peso molecular. El lisado aclarado se concentró hasta aproximadamente 1/8 del volumen original. La diafiltración se realizó usando aproximadamente 10 volúmenes de agua DI (pH 6, fosfato 25 mM para 19A).

Acidificación: Se retiró más del 98 % de las proteínas en esta etapa. Mientras se agitaba, se añadió cuidadosamente ácido fosfórico concentrado al retenido. El pH del retenido se ajustó hasta un valor diana de pH 3,5. El retenido acidificado se agitó durante media hora y se curó a temperatura ambiente para curarlo durante una noche (2 horas a 4 °C para 19A), provocando la precipitación de las proteínas y de los ácidos nucleicos.

40 Aclarado del retenido acidificado: Esta era la etapa de aclarado para retirar los precipitados después de la acidificación. La suspensión de solución acidificada se centrifugó en un rotor a 10.000 rpm (17.000 de fuerza centrífuga relativa o RCF) durante 1 hora a 20 °C (excepto para 6B, en cuyo caso la centrifugación fue de 6 horas a 37 °C). El sobrenadante se recogió y se desecharó el sedimento. También se puede usar diafiltración en profundidad 45 con un Millipore Prefilter (Millipore Corp., Billerica, MA) con la adición de auxiliares de filtro Celpure® (Advanced Minerals, Santa Bárbara, CA) para esta etapa.

Adsorción en carbono: En la mayoría de los casos, había un ligero color amarillo tras la centrifugación del retentado 100K acidificado. La eliminación del color se logró por medio de la adsorción de carbono mediante el uso de carbón activado con ácido fosfórico a base de madera. Esta etapa también retiró las proteínas residuales que permanecían después de la acidificación. La solución aclarada de polisacárido se hizo circular de nuevo a través del filtro de carbono durante 5-6 horas o durante una noche (para 19A, el pH se ajustó hasta 6 antes de la adsorción en carbono).

50 UF/DF 30 K final: Esta fue otra etapa de concentración e intercambio de tampón para concentrar la solución hasta una concentración final de polisacárido (PS) de > 2 g/l, que se diafiltró en agua desionizada (DI). Se concentró la solución de PS filtrada en carbono. Después, el concentrado se diafiltró 10X con agua DI. El pH se ajustó hasta 7,4 durante la diafiltración.

Filtración final a esterilidad con 0,2 µm: La solución final de PS se filtró a esterilidad con un filtro de 0,22 µm o unidad desechable estéril de filtración y se almacenó en un refrigerador a 4 °C.

Procedimientos analíticos

5 La cuantificación de concentraciones de proteína, PS y ácido nucleico se realizaron mediante el uso de procedimientos que son bien conocidos en la técnica, que incluyen análisis de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico), HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) y SEC (cromatografía por exclusión de tamaño), ensayos de Lowry modificados, espectrofotometría, SEC-MALLS (cromatografía por exclusión de tamaño/dispersión de luz láser de múltiples ángulos) y NMR (resonancia magnética nuclear).

Resultados y análisis

10 Lotes de purificación acortada de tipo 5: La comparación del rendimiento final de PS, el peso molecular de PS y los niveles de impurezas principales de tres lotes de purificación usando el procedimiento acortado y aquellos que se usan el procedimiento actual para el tipo 5 se muestran en la Tabla 1. Todos los casos de partida eran lotes de fermentación de alta densidad celular lisados con DOC, que tenían una mayor concentración de polisacárido (~ 0,5 g/l) que el caldo convencional de fermentación con SOP (~ 0,3 g/l). Se usó una membrana de 30 K o de 50 K para la primera etapa de UF/DF. Los niveles de impurezas se calcularon y usando relaciones de impureza/PS. Se usó el mismo enfoque para todos los demás serotipos descritos en el presente documento.

15

Tabla 1. Datos de ensayo para lotes del procedimiento acortado de purificación de tipo 5.

LOTE N.º	RENDIMIENTO DE PS (%)	RELACIÓN DE PROTEÍNA (%)	RELACIÓN DE NA (%)	PESO MOLECULAR DE PS (KG/MOL)	RELACIÓN DE C-PS (%)
L29276-27 (30K UF/DF)	56,7	1,2	0,12	299	20,7
L29276-32 (30K UF/DF)	54,6	1,8	0,12	282	24,7
L29276-52 (50K UF/DF)	60,2	1,4	0,03	275	22,8
Procedimiento actual	57	3,6	0,18	320	15,9
Especificación o valor esperado	50-60	≤ 7,5	≤ 2,0	NA	≤ 35

Como muestran los datos de la Tabla 1, las relaciones de proteína de los tres lotes mediante el uso del procedimiento acortado de purificación cumplían la especificación de ≤ 7,5 %, y también eran comparables con los del procedimiento actual. Las relaciones de ácido nucleico (NA), así como de polisacárido-C (C-PS), también estaban muy por debajo de las especificaciones de ≤ 2,0 % y de ≤ 35 %, respectivamente y eran comparables con los del procedimiento actual. Los resultados del rendimiento final de PS y los niveles de impurezas de los tres lotes mostrados en la Tabla 1 demuestran la reproducibilidad y robustez del procedimiento acortado.

20 Hubo alguna preocupación acerca de si los polisacáridos se podían hidrolizar a un pH inferior de 3,5. El cambio del tiempo de retención de PS durante el procedimiento de purificación, por lo tanto, se controló y se midió el peso molecular del PS purificado final. No se observaron cambios significativos en el tiempo de retención de PS de serotipo 5 a partir del chromatograma de HPLC. Tampoco hubo diferencias significativas en los pesos moleculares para el PS purificado por el procedimiento acortado y el del procedimiento actual (284 kg/mol) basándose en la medición MALLS. Por tanto, se concluyó que el peso molecular del PS purificado no se veía afectado de forma adversa por el procedimiento acortado de purificación.

25 30 El rendimiento de polisacárido en el procedimiento, la relación de proteína/polisacárido y la relación de ácido nucleico/polisacárido en cada una de las etapas del procesamiento para los tres lotes del procedimiento acortado se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento de PS en el procedimiento, relación de proteína (SDS-PAGE) y de Ácido Nucleico del tipo 5.						
ETAPA	RENDIMIENTO DE PS (%)			PROTEINA/PS (%)		
	L29276-27	LS29276-32	LS29276-52	LS29276-27	LS29276-32	LS2927652
Caldo	100,00	100,00	100,00	384,40	1026,60	193,26
Centrifugación	99,9	95,6	94,6	274,60	642,00	209,78
30/50K UF/DF	7,1	82,8	93,9	152,10	561,00	204,76
Acidificación	56,1	65,9	58,6	9,00	7,50	0,20
Carbono	57,7	55,7	58,7	0,20	1,90	0,50
30k UF/DF	54,5	54,6	60,3	0,10	1,00	0,09

Tabla 2, continuación.			
ETAPA	ÁCIDO NUCLEICO/PS (%)		
	LS29276-27	LS29276-32	LS29276-52
Caldo	825,80	579,83	344,70
Centrifugación	505,10	484,30	311,90
30/50K UF/DF	107,30	139,90	137,60
Acidificación	9,44	16,40	7,38
Carbono	0,22	0,30	0,74
30k UF/DF	0,11	0,12	0,19

- Siempre existe una pérdida de producto durante cada etapa de cualquier procedimiento de purificación. Para estos tres lotes del procedimiento acortado, la pérdida de PS sucedía principalmente en la primera etapa de UF/DF y en la etapa de acidificación. La pérdida de PS en la primera etapa de UF/DF se debía a la adsorción de PS o complejo de PS/proteína a la superficie de la membrana. Esta pérdida se minimizó aclarando el lado de retenido de la membrana con agua DI después de la diafiltración y combinando el aclarado con el retenido original. La pérdida de PS en la etapa de acidificación podía deberse a dos razones: adsorción física de PS a los sólidos de precipitación y unión del polisacárido a la proteína con co-precipitación durante la acidificación. Esta segunda posibilidad se investigó adicionalmente y los resultados mostraron evidencias de unión de PS/proteína.
- La Figura 1 muestra la reducción de la relación de proteína/PS en cada etapa de purificación. Aunque la etapa de purificación retiraba un pequeño porcentaje de proteínas, la mayoría de las proteínas se retiraba en la etapa de acidificación. Solamente se detectó una cantidad traza de proteína después de tratamiento a pH 3,5 incluso para el lote de mayor potencia de proteínas.
- Similar a la relación de proteína/PS, la relación de ácido nucleico/PS mostró variabilidad de niveles de impurezas entre los lotes. La etapa de UF/DF 30/50 K retiraba una cantidad significativa de ácido nucleico en comparación con la retirada de proteínas en la misma etapa de procesamiento. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, esto se puede deber al tamaño molecular de los ácidos nucleicos que es más pequeño que el de las proteínas, lo que los hace relativamente más fáciles de retirar por medio de la etapa de UF/DF 30/50 K. La primera etapa de centrifugación y acidificación también eliminó una cantidad considerable de ácido nucleico.
- La Tabla 2 muestra que la etapa de adsorción con carbono activado también reduce el nivel de proteína/PS y de NA/PS. La reducción del porcentaje no era tan significativa como en las dos primeras etapas, pero esta etapa era importante para retirar el color de la solución y aseguraba que el nivel de impurezas cumplía la especificación.

Lotes de purificación acortada de tipo 4. Se muestra un sumario de tres lotes de purificación acortada para el tipo 4 en la Tabla 3. Los caldos de alimentación para los tres lotes estaban lisados con DOC.

Tabla 3. Sumario de lotes de purificación acortada de tipo 4.

LOTE	RENDIMIENTO DE PS (%)	PROTEÍNA/PS (%)	ÁCIDO NUCLEICO/PS (%)	PESO MOLECULAR DE PS (KG/MOL)	RELACIÓN DE C-PS (%)
L29276-47	56,3	0,7	0,04	289	15,4
L29276-55	53,0	1,3	0,03	354	14,7
L29276-148	57,3	1,16	0,02	293	10,0
Procedimiento actual	71,1	0,05	0,02	285	
Especificación	NA	<3,0	<2,0	>350	<25

El rendimiento de PS de tipo 4 también estaba entre el 50 y el 60 %. La relación de proteína/PS y la relación de ácido nucleico/PS estaban dentro de sus especificaciones. La relación de C-PS también estaba dentro de la especificación. El peso molecular de los tres lotes estaba cercano a ~ 300 kg/mol. El PS de serotipo 4 purificado por el actual procedimiento de purificación usando el caldo similar de fermentación también dio un peso molecular inferior de 285 kg/mol. La comparación de los cromatogramas de HPLC del PS del caldo de fermentación y la solución purificada final mostró que no había diferencias en el tiempo de retención de PS. Esto sugirió que la diferencia en el peso molecular no estaba causada por el cambio del procedimiento, sino en su lugar se debía a la naturaleza intrínseca del procedimiento de fermentación.

El PS de Tipo 4 contiene un grupo piruvato en la molécula modificada, y este piruvato era importante para la conjugación para su uso en una vacuna de conjugado de neumococos. Para asegurar que la cantidad de piruvato no estaba afectada de forma adversa por el tratamiento ácido, se realizó análisis de RMN. La Figura 2 muestra los espectros de RMN para PS de tipo 4 convencional y los del lote L29276-47. No se observaron diferencias significativas entre los dos espectros. El segundo pico de la derecha en ambos espectros era piruvato, y la altura del pico del grupo piruvato era comparable en ambos espectros. Las relaciones de piruvato para los tres lotes del procedimiento acortado fueron de 0,8 mol/mol, y cumplían la especificación de > 0,7 mol/mol.

El rendimiento de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y de NA/PS para los tres lotes de tipo 4 se resumen en la Tabla 4. La pérdida de PS sucedía principalmente en la primera centrifugación, las etapas de acidificación y adsorción en carbono activado, con un promedio del 10 %, del 8 % y del 20 % respectivamente. El rendimiento global de PS era cercano al de tipo 5, aproximadamente el 55 %.

Tabla 4. Rendimiento de PS en el procedimiento, relación de proteína PS (SDS-PAGE) y de Ácido nucleico PS del tipo 4.

ETAPA	RENDIMIENTO DE PS (%)			PROTEINA/PS (%)		
	L29276-47	LS29276-55	LS29276-148	LS29276-47	LS29276-55	LS29276-148
Caldo	100,00	100,00	100,00	231,22	297,33	499,75
Centrifugación	85,8	97,8	88,0	198,69	247,40	534,61
50/100K UF/DF	85,1	86,4	87,7	235,90	249,24	364,98
Acidificación	84,2	72,0	78,6	0,42	1,81	0,41
Carbono	65,3	48,9	58,6	0,09	0,39	0,34
30k UF/DF	57,9	50,6	57,4	0,08	0,09	1,31

Tabla 4, continuación.

ETAPA	ÁCIDO NUCLEICO/PS (%)		
	LS29276-47	LS29276-55	LS29276-148
Caldo	321,84	282,5	302,71
Centrifugación	301,40	261,82	243,28
50/100K UF/DF	80,99	67,67	92,00
Acidificación	4,24	5,01	1,17
Carbono	0,08	0,92	0,38
30k UF/DF	0,05	0,06	0,07

La Figura 3 muestra el cambio promedio en el rendimiento de PS, la relación de proteína/PS y de NA/PS en cada una de las etapas de purificación para los tres lotes de la Tabla 4. La retirada de proteínas sucedía principalmente en la etapa de acidificación como se esperaba. La primera centrifugación y las etapas de UF/DF también retiraban colectivamente una cierta cantidad de proteínas, pero la reducción de proteínas era menor que en la etapa de acidificación.

Similar al tipo 5, la mayor parte de la reducción de la relación de ácido nucleico/PS tenía lugar en las etapas UF/DF 50/100 K, en la primera centrifugación y en la acidificación, y la reducción de NA en la primera etapa de UF/DF era más significativa que para proteínas. De nuevo, como se muestra en la Figura 3, la etapa de carbono activado retiraba una cierta cantidad de proteínas y NA y llevaba los niveles de impurezas por debajo de las especificaciones. También se retiraba el color de la solución.

Lotes de purificación acortada de tipo 19A: El polisacárido de tipo 19A es inestable y el peso molecular cambia durante la purificación. El procedimiento acortado de purificación se modificó ligeramente para estabilizar el polisacárido 19A. Estas modificaciones se resumen del siguiente modo: 1) las etapas de purificación se realizaron principalmente a 4 °C en la habitación refrigerada; 2) la primera diafiltración 100 K se refrigeró usando tampón fosfato 25 mM (4 °C) con un pH de 6 en lugar de usar agua a temperatura ambiente; 3) el tiempo de mantenimiento de acidificación se redujo desde una noche a 2 horas; y 4) después de aclarar el retenido 100 K acidificado, el pH se ajustó hasta 6 y se realizó adsorción en carbono activado a pH 6 en lugar de a 3,5.

Los resultados de dos lotes 19A purificados por el procedimiento acortado de purificación se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Sumario de lotes de purificación acortada de tipo 19A.

LOTE	RENDIMIENTO DE PS (%)	PROTEÍNA/PS (%)	NA/PS (%)	PESO MOLECULAR (KG/MOL)	C-PS (%)
L29276-116	61,58	0,14	0,01	525	3,8
L29276-143	76,15	1,43	0,01	488	2,8
Especificación	NA	<2	<2	NA	<10

Los rendimientos de PS de los dos lotes de purificación acortada fueron del 62 y 76%, respectivamente. La relación final de proteína/PS, la relación de ácido nucleico y la relación de C-PS cumplieron todas sus especificaciones respectivas. Los pesos moleculares finales de los polisacáridos de los dos lotes fueron de 525 kg/mol y de 488 kg/mol, respectivamente, y estaban cercanos a los de PS de 19A usado en ensayos clínicos en fase III (486 kg/mol).

La relación de proteína/PS para los dos lotes cumplía ambos la especificación de < 2 %. La relación tanto de NA como de C-PS de los dos lotes estaba dentro de sus especificaciones.

El rendimiento de PS, la reducción de proteína y NA en cada una de las etapas de purificación se muestra en la Tabla 6 y en la Figura 4. Los resultados mostraron la pérdida de PS en cada una de las etapas de purificación excepto en la primera etapa de centrifugación. Como los serotipos 5 y 4, la retirada de proteínas y NA tuvo lugar principalmente en las tres primeras etapas, y había apenas proteína y NA detectables después de la acidificación. Aunque la etapa de adsorción en carbono activado no retiraba una cantidad significativa de proteínas y NA, posiblemente debido a la muy baja concentración de proteínas y NA después de la acidificación, la etapa aún era necesaria para la eliminación del color.

Tabla 6. Rendimiento de PS en el procedimiento, relación de proteína/PS y de NA/PS de tipo 19A.

ETAPA	RENDIMIENTO DE PS (%)		PROTEÍNA/PS (%)		NA/PS (%)	
	L29276-116	L29276-143	L29276-116	L29276-143	L29276-116	L29276-143
Caldo	100,0	100,0	224,41	144,08	277,55	134,73
Concentrado	100,8	101,2	121,60	119,11	189,64	100,64
UF/DF 100K	87,7	90,3	103,83	105,16	56,87	26,36
Acidificación	90,4	72,1	0,28	0,84	0,03	0,03
Carbono	77,8	71,7	0,96	0,03	0,04	0,02
UF/DF 30K	61,0	76,1	0,54	0,00	0,02	0,01

Lotes de purificación acortada de tipo 7F: El tipo 7F es un polisacárido no iónico, que típicamente requiere cambio en las etapas durante la purificación mediante el uso del procedimiento existente en comparación con los serotipos descritos anteriormente. Sin embargo, el procedimiento acortado de purificación de la presente invención se aplicó satisfactoriamente al serotipo 7F sin la necesidad de desviación del procedimiento. Se purificaron dos lotes de caldo de tipo 7F usando el procedimiento acortado. Uno fue un caldo de fermentación convencional (L29276-107) y uno fue un caldo de alta densidad celular (L29276-157). Los resultados de los dos lotes se resumen en la Tabla 7.

5

Tabla 7. Sumario de lotes de purificación acortada de tipo 7F.

LOTE N.º	RENDIMIENTO DE PS (%)	PROTEÍNA/PS (%)	NA/PS (%)	PESO MOLECULAR (KG/MOL)	C-PS (%)
L29276-107	65,27	0,49	0,02	968	3,3
L29276-157	79,06	0,26	0,04	881	2,9
Especificación	NA	<5	<2	NA	<17

El rendimiento de PS de tipo 7F era realmente mayor que en los otros serotipos, posiblemente debido a menor unión del polímero no iónico a las moléculas proteicas cargadas. Las relaciones finales de proteína, de NA y de C-PS están todas dentro de sus especificaciones. El peso molecular del tipo 7F era comparable al de los lotes convencionales y aunque el peso molecular de 7F era bastante alto, la solución de PS no era muy viscosa debido al volumen excluido más pequeño del polímero no iónico.

10

El rendimiento de PS, la relación de proteína y de NA del tipo 7F en cada una de las etapas de purificación se muestran en la Tabla 8 y se representó el promedio de los dos lotes en la Figura 5.

Tabla 8. Rendimiento de PS en el procedimiento, relación de proteína/PS y de NA/PS del tipo 7F.

ETAPA	RENDIMIENTO DE PS (%)		PROTEÍNA/ PS (%)		ÁCIDO NUCLEICO/PS (%)	
	L29276-107	L29276-157	L29276-107	L29276-157	L29276-107	L29276-157
Caldo	100,00	100,00	274,10	189,24	258,55	134,64
Centrifugación	100,31	95,57	110,60	107,20	163,38	83,14
UF/DF 100K	84,19	95,39	139,38	27,53	54,02	32,74
Acidificación	70,89	84,08	0,44	0,10	1,80	0,94
Carbono	63,96	79,40	0,70	0,09	2,29	0,23
UF/DF 30K	57,24	77,70	0,30	0,05	0,06	0,00

Hubo alguna pérdida de PS de tipo 7F en cada etapa de purificación. Globalmente, la pérdida de PS fue menor que la de los serotipos 5 y 4. La reducción de la relación de proteína y de NA fue principalmente por las etapas de primera centrifugación, de UF/DF 100 K y de acidificación. Similar a otros serotipos, la UF/DF 100 K fue más eficaz

15

en retirar NA que en proteínas. Aunque la etapa de adsorción en carbono activado no retiraba una cantidad significativa de proteínas y de NA debido a niveles muy bajos de impurezas después de la acidificación, la etapa aún era necesaria para la eliminación del color.

- 5 Lotes de purificación acortada de tipo 6B: Se purificaron dos lotes de 6B usando el procedimiento acortado de purificación. Se descubrió que el aclarado del retenido 100 K acidificado tardaba más tiempo que los otros serotipos (6 horas en lugar de 1 hora). Excepto por esta diferencia, el procedimiento de purificación fue similar al de los serotipos. Los resultados de los dos lotes se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Sumario de purificación acortada de tipo 6B.

LOTE	RENDIMIENTO DE PS (%)	PROTEÍNA/PS (%)	NA/PS (%)	PESO MOLECULAR (KG/MOL)	C-PS (%)
L29276-161	69,50	1,73	0,28	857	3,6
L29276-164	74,50	1,41	0,17	1142	3,9
Especificación	NA	<4	<1	>800	<10

Todos los niveles de impurezas (proteínas, NA y C-PS) estaban dentro de sus especificaciones. El rendimiento de PS fue relativamente alto, y también la relación de proteína de NA en comparación con los otros serotipos.

- 10 El rendimiento de PS en el procedimiento, las relaciones de proteína y de NA en cada una de las etapas de purificación se muestran en la Tabla 10 y en la Figura 6.

Tabla 10. Rendimiento de PS en el procedimiento promedio, relación de proteína y de NA de tipo 6B.

ETAPA	RENDIMIENTO DE PS (%)		PROTEÍNA/PS (%)		ÁCIDO NUCLEICO/PS (%)	
	L29276 -161	L29276-164	L29276-161	L29276-164	L29276-161	L29276-164
Caldo	100,00	100,00	238,20	288,80	215,12	237,67
Centrifugación	101,43	116,54	95,88	123,59	104,08	104,47
UF/DF 100K	104,11	105,47	68,15	88,14	22,13	47,81
Acidificación	91,98	101,45	0,71	0,43	1,06	2,24
Carbono	80,71	91,42	0,39	0,23	0,45	0,74
UF/DF 30K	72,67	77,28	1,23	0,46	0,37	0,25

Similar a 19A, la pérdida de PS sucedía en cada una de las etapas de purificación excepto en la primera etapa de centrifugación, en que hubo un ligero aumento de PS. La retirada de proteínas y de NA se consiguió principalmente por la primera centrifugación, por la primera UF/DF 100 K y por la etapa de acidificación. Sin embargo, también hubo alguna reducción de la relación de proteína y de NA en la etapa de adsorción en carbono.

- 15 Lotes de purificación acortada de tipo 6A: Se purificaron dos lotes de tipo 6A usando el procedimiento acortado de purificación. El rendimiento de PS, los niveles de impurezas y el peso molecular de las soluciones finales se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Sumario de lotes de purificación acortada de tipo 6A.

LOTE	CALDO	RENDIMIENTO DE PS (%)	PROTEÍNA/ PS (%)	NA/PS (%)	PESO MOLECULAR (KG/MOL)	C-PS (%)
L29276-138	Convencional	75,75	1,23	0,04	640	7,3
L29276-183	Alta densidad celular	72,56	0,20	0,01	670	5,1
Especificación		NA	<2,00	<2,00	NA	<15

Los rendimientos finales de PS de los dos lotes 6A fueron ambos > 70 %, que eran los más altos entre los serotipos procesados mediante el uso del procedimiento acortado. Las relaciones de proteína, de NA y de C-PS estaban todas dentro de las especificaciones.

5 La Tabla 12 y la Figura 7 muestran el cambio en el rendimiento de PS en el procedimiento, la relación de proteína y de NA en cada una de las etapas de purificación. Apenas hubo pérdida de PS en las etapas de primera centrifugación y 100K UF/DF. En las etapas de acidificación y adsorción con carbón activado se produjo una pérdida de PS de entre el 10 y el 15%, que se aproxima a la de los demás serotipos. La reducción principal de la relación de proteína y de NA era por la primera centrifugación, por UF/DF 100 K y por acidificación. Después de la acidificación, ambas relaciones de proteína y de NA ya estaban por debajo de sus especificaciones. Para las proteínas, la acidificación era la etapa más eficaz, mientras que para NA, la UF/DF 100 K reducía la mayor cantidad de la relación de NA/PS. Aunque la etapa de adsorción en carbono activado no retiraba una cantidad significativa de proteínas y de NA debido a niveles muy bajos de impurezas después de la acidificación, la etapa aún era necesaria para la eliminación del color.

10

Tabla 12. Rendimiento de PS en el procedimiento, relación de proteína y de NA de tipo 6A.

	RENDIMIENTO DE PS (%)		PROTEÍNA/PS (%)		ÁCIDO NUCLEICO/PS (%)	
ETAPA	L29276-138	L29276-183	L29276-138	L29276-183	L29276-138	L29276-183
Caldo	100,00	100,00	214,35	138,71	211,45	163,88
Centrifugación	99,35	97,80	183,43	149,71	177,03	150,41
UF/DF 100K	93,19	100,40	114,72	103,00	43,38	40,43
Acidificación	89,87	87,90	0,16	0,87	1,09	0,97
Carbono	76,02	75,70	0,62	0,85	0,09	0,07
UF/DF 30K	75,57	72,90	0,00	0,07	0,04	0,02

15 Lotes de purificación acortada de tipo 1: Se resumen dos lotes de tipo 1 purificados por el procedimiento acortado en la Tabla 13. El lote L29276-170 se purificó a partir de caldo de fermentación de alta densidad celular y L29276-173 era de caldo de fermentación convencional.

Tabla 13. Sumario de lotes de purificación acortada de tipo 1.

LOTE	CALDO	RENDIMIENTO DE PS (%)	PROTEÍNA/PS (%)	NA/PS (%)	PESO MOLECULAR (KG/MOL)	C-PS (%)
L29276-170	Alta densidad celular	50,96	0,44	0,08	501	5,3
L29276-173	SOP	53,84	1,23	0,01	458	11,9
Especificación		NA	<2	<2	NA	<15

Los rendimientos de PS para ambos lotes fueron de aproximadamente el 50 %, y los niveles de impurezas para proteínas, para NA y para C-PS estuvieron todos dentro de sus especificaciones.

20 El rendimiento de PS en el procedimiento, las relaciones de proteína y de NA después de cada una de las etapas de purificación se muestran en la Tabla 14 y en la Figura 8. Las tendencias fueron similares a otros serotipos modificados. La pérdida de PS sucedía principalmente en las etapas de acidificación y adsorción en carbono activado, y la mayoría de la retirada de proteínas y de NA sucedía en las tres primeras etapas. Se retiraba más NA en la etapa de UF/DF 100 K que proteínas. Aunque la etapa de adsorción en carbono activado no retiraba una cantidad significativa de proteínas y de NA debido a niveles muy bajos de impurezas después de la acidificación, la etapa aún era necesaria para la eliminación del color.

25

Tabla 14. Rendimiento de PS en el procedimiento promedio, relación de proteína y de NA de tipo 1.						
ETAPA	RENDIMIENTO DE PS (%)		PROTEÍNA/PS (%)		NA/PS (%)	
	L29276-170	L29276-173	L29276-170	L29276-173	L29276-170	L29276-173
Caldo	100,00	100,00	453,30	595,20	594,41	1178,98
Centrifugación	93,99	105,63	301,86	396,97	340,55	1018,47
UF/DF 50/1 00K	88,33	105,62	232,34	235,08	17,49	182,56
Acidificación	66,54	87,67	0,54	4,87	1,09	5,85
Carbono	55,85	59,69	1,91	1,86	0,49	0,01
UF/DF 30K	51,24	55,59	0,36	0,92	1,65	0,01

Lotes de purificación acortada de tipo 14: Se purificaron dos lotes de serotipo 14 usando el procedimiento acortado de purificación sin desviaciones del procedimiento. El rendimiento final de PS y los niveles de impurezas se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Sumario de lotes de purificación acortada de tipo 14.						
LOTE	CALDO	RENDIMIENTO DE PS (%)	PROTEÍNA/ PS (%)	NA/PS (%)	PESO MOLECULAR (KG/MOL)	C-PS (%)
L32874-155	Alta densidad celular	51,3	2,06	0,03	520	4,2
L32874-163	SOP	56,7	1,39	0,03	662	2,9
Especificación		NA	<3	<2	>400	<15

- 5 Similar al serotipo 7F, el serotipo 14 es un polisacárido no iónico, y su procedimiento actual de purificación es ligeramente diferente de los otros serotipos. Sin embargo, el procedimiento acortado de purificación de la presente invención se aplicó satisfactoriamente al serotipo 14 sin la necesidad de dichas etapas adicionales. Los rendimientos de PS de los dos lotes del procedimiento acortado de purificación fueron del 50-60 %, y las relaciones de proteína y de NA estuvieron dentro de sus especificaciones. Los pesos moleculares del PS purificado también cumplían la especificación.
- 10 El rendimiento de PS en el procedimiento, las relaciones de proteínas y de NA se resumen en la Tabla 16 y en la Figura 9. Se observaron tendencias similares de pérdida de PS, retirada de proteínas y de NA que para los otros serotipos ensayados descritos anteriormente.

Tabla 16. Promedio de rendimiento de PS en el procedimiento, relación de Proteína y de Ácido Nucleico del tipo 14.				
ETAPA	RENDIMIENTO DE PS (%)		PROTEINA/PS (%)	
	L32874-155	LS232874-163	LS32874-155	LS232874-163
Caldo	100,00	100,00	109,73	286,56
Centrifugación	91,40	90,80	110,88	201,48
50/100K UF/DF	82,40	68,70	45,52	165,69
Acidificación	65,40	93,90	0,65	0,47
Carbono	59,40	74,60	0,60	0,10
30k UF/DF	53,10	57,60	0,57	0,41

Tabla 16, continuación.

ETAPA	ÁCIDO NUCLEICO/PS (%)	
	LS32874-155	LS232874-163
Caldo	192,80	272,5
Centrifugación	135,50	201,82
50/100K UF/DF	47,10	64,54
Acidificación	0,89	1,08
Carbono	0,17	0,21
30k UF/DF	0,13	0,25

Ejemplo 2. Comparación de diferentes serotipos (serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 19F).

A fin de comparar la purificación de los diferentes serotipos mediante el uso del procedimiento acortado de purificación de la presente invención, se representó la retirada de PS de todos los serotipos descritos en el Ejemplo 1 más los serotipos 9V, 18C y 19F en un gráfico en la Figura 10. La mayoría de los serotipos seguía una tendencia similar con pérdida de PS en cada una de las etapas de purificación. Hubo un aumento en el rendimiento de PS para el tipo 6B en la primera etapa de centrifugación y del tipo 14 en la etapa de acidificación. El porcentaje de pérdida de PS varió de un serotipo a otro. El tipo 5 parecía perder la mayoría de PS en la etapa de acidificación y el tipo 14 en la etapa de adsorción en carbono activado.

Las relaciones de proteína/PS para cada etapa de purificación para cada uno de los serotipos se muestran en la Figura 11. La figura muestra que había una diferencia en las relaciones iniciales de proteína/PS para los diferentes serotipos, teniendo los tipos 1, 4, 5, 9V, 19F y 18C las mayores relaciones iniciales de proteína/PS. Aunque las relaciones de proteína/PS eran mucho mayores para los tipos 1, 4, 5, 9V, 19F y 18C en comparación con los otros serotipos incluso después de la primera etapa de UF/DF, la etapa de acidificación reducía enormemente la relación de proteína/PS y no quedaba mucha más proteína después de esta etapa.

Como se muestra en la Figura 2, las relaciones de NA/PS también variaban de un serotipo a otro. Los tipos 1 y 5 tenían la mayor relación de NA/PS, seguido por los tipos 18C y 4. La primera etapa de centrifugación y de UF/DF retiraba una cantidad significativa de NA de estos serotipos y el tipo 1 parecía ser el más eficaz. Había muy poco NA después de la etapa de acidificación.

Ejemplo 3. Análisis de eficacia de la etapa de acidificación y de adsorción en carbono activado (serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 19F).

Para la purificación de polisacáridos PnC, la impureza más significativa y difícil de retirar son las proteínas. Para entender mejor la eficacia de retirada de impurezas del procedimiento acortado, se analizaron dos de las etapas principales de purificación, la acidificación y la adsorción en carbono activado, para la retirada de proteínas. Para la etapa de acidificación, la diferencia en la concentración de proteínas (SDS-PAGE) antes y después de la acidificación se representó frente a la concentración inicial de proteínas antes de la acidificación para los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 19F usando el procedimiento acortado de purificación de la invención (Figura 13).

Debido a los cambios relativamente pequeños en el volumen de solución antes y después de la etapa de acidificación, la diferencia en la concentración de proteínas dividida por la concentración inicial de proteínas reflejaba la tasa de retirada de proteínas por la etapa de acidificación. La Figura 13 muestra la pendiente del ajuste lineal de la diferencia en la concentración de proteínas con respecto a la concentración inicial de proteínas (por ensayo de SDS-PAGE). Se observó una muy buena relación lineal entre el cambio de concentración de proteínas y la concentración inicial, con el R^2 cercano a 1. La pendiente era de 0.9876, que corresponde a una retirada de proteínas del 98,76 % (asumiendo un cambio insignificante de volumen de solución). Por lo tanto, para todos los serotipos estudiados, la etapa de acidificación era muy eficaz y, de promedio, retiraba más del 98 % de las proteínas.

Similar a la etapa de acidificación, también se evaluó la eficacia de la etapa de adsorción en carbono activado al representar la cantidad de proteínas retirada (adsorbida en carbono) con respecto a la carga inicial de proteínas (Figura 14). Se observó una buena relación lineal entre las proteínas retiradas y la carga inicial de proteínas, aunque el R^2 (0,9723) no era tan alto como para la etapa de acidificación. Como la pendiente de este ajuste lineal corresponde a la tasa de retirada de proteínas, la etapa de adsorción en carbono activado producía una retirada de proteínas del 93,87 %.

En base a un análisis de las etapas de acidificación y de adsorción en carbono activado, después de las dos etapas quedaba solamente aproximadamente un 0,1 % de proteínas en la solución.

Conclusiones para los Ejemplos 1-3

Se desarrolló un procedimiento acortado de purificación para remplazar el actual procedimiento de purificación para polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*. El procedimiento acortado de purificación se aplicaba directamente a los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C y 19F y para 19A con una ligera desviación. El procedimiento se realizó a escala de 10 l usando caldos de fermentación lisados con DOC. Los niveles de impurezas, incluyendo las relaciones de proteína/PS, de NA/PS y de C-PS/PS, cumplían, todos, sus respectivas especificaciones. Los rendimientos de PS eran por encima del 50 % y comparables a los del actual procedimiento de purificación. El 10 rendimiento de PS en el procedimiento, las relaciones de proteína/PS y de NA/PS se representaron para comparar el comportamiento de diferentes serotipos. Se descubrió que los serotipos 1,5, 9V, 19F y 18C eran los más difíciles de purificar basándose en las relaciones de proteína/PS antes y después de la etapa de UF/DF 100 K.

El análisis de etapas mostró que las etapas de acidificación y de adsorción en carbono activado retiraban más del 98 % y del 90 % de las proteínas, respectivamente (medido por SDS-PAGE).

15 **Ejemplo 4. Sustitución de agentes líticos de origen no animal por desoxicolato sódico en la producción de polisacáridos**

El presente ejemplo investigó si agentes líticos de origen no animal se podrían usar como sustituto para desoxicolato sódico (DOC) dentro del procedimiento descrito anteriormente para la producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados de *Streptococcus pneumoniae*. Como se describe anteriormente, DOC activa la proteína 20 LytA, que es una autolisina que está implicada en el crecimiento de la pared celular y en la división en *Streptococcus pneumoniae*. La proteína LytA tiene dominios de unión a colina en su parte C-terminal, y se sabe que mutaciones del gen *lytA* producen mutantes LytA que son resistentes a lisis con DOC.

25 Se desarrolló un rápido ensayo en placa de microtitulación para identificar compuestos que causan lisis celular por un mecanismo similar al de DOC. Se identificaron varias alternativas de origen no animal a DOC que son igual de eficaces que DOC en la eliminación de células de *Streptococcus pneumoniae* y en la liberación de polisacárido. Despues del procesamiento usando condiciones convencionales, el tamaño y la pureza de los polisacáridos producidos con los compuestos de origen no animal eran idénticos a los producidos con DOC.

Procedimientos

30 **Lisis celular:** Los compuestos a ensayar se añadieron al caldo de fermentación a una concentración final del 0,1 al 0,01 % (v/v) y se permitió que la solución se incubara a 37 °C durante una hora. La solución después se almacenó a 2-8 °C durante una noche. La siguiente mañana la solución se centrifugó para retirar todos los desechos celulares. Se analizó el caldo sin células por SEC-HPLC para determinar la concentración de polisacárido liberado. La lisis podía realizarse a cualquier temperatura entre 2-37 °C, preferentemente a un intervalo de pH de 6,0-7,5. La concentración del detergente era típicamente entre el 0,05-0,2 % dependiendo del detergente particular.

35 **Ensayo de microtitulación:** Se ideó un rápido ensayo en placa de microtitulación para examinar la lisis dependiente de *lytA* de neumococos por diferentes detergentes o tensioactivos. Se usaron dos pares de cepas isogénicas de *S. pneumoniae* en el ensayo; un miembro de cada par era de tipo silvestre para el gen *lytA* mientras que la otra cepa portaba una delección en el gen *lytA*. Por tanto, si la lisis era dependiente de una función *lytA* activa, ese detergente no lisaría las cepas mutantes. Las cuatro cepas, R6X, R6X Δ*lytA*, D39 y D39 Δ*lytA*, se cultivaron en medio HySoy 40 hasta aproximadamente fase semi-log ($DO_{600} \sim 0,2-0,8$; DO_{600} = densidad óptica a 600 nm). Las células después se centrifugaron y se resuspendieron los sedimentos celulares en medio HySoy. A cada pocillo de la placa de microtitulación, se le añadieron 100 µl de suspensión celular, junto con 10 µl de soluciones madre de detergente o agua como control. Despues de aproximadamente 15 minutos a 36 °C, se midió la DO_{600} de las muestras con un espectrofotómetro Spectramax® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se observaron los siguientes resultados para 45 las células recién preparadas o las congeladas y descongeladas: células de tipo silvestre expuestas a DOC, dodecil sulfato sódico, Triton® X-100 y N-lauril sarcosina todas tenían valores de DO comparables al blanco de medio, que indicaba que había sucedido lisis. Por otro lado, las células Δ*lytA* no se lisaban en presencia de estos detergentes, lo que indica que la función LytA es necesaria para que estos detergentes lisen las células.

50 **Aislamiento de PS usado para estudios analíticos comparativos:** Se hicieron crecer cultivos en medio Hy-Soy en biorreactores de 10 l. El pH se controló a aproximadamente 7,0 usando NaOH o Na₂CO₃. Al final del cultivo (indicado por ausencia de aumento adicional en la densidad óptica), los cultivos se trataron con DOC al 0,12 % o con NLS al 0,1 %. Los cultivos se incubaron durante 12-16 horas. La eficacia de eliminación celular se confirmó sembrando una muestra de caldo tratado en placas de agar con sangre-TSA. El polisacárido se purificó del lisado aclarado usando procedimientos convencionales (como se describe anteriormente). El polisacárido purificado se examinó usando una diversidad de técnicas analíticas convencionales apropiadas para determinar la pureza e identidad del material.

55 El contenido de PS del lisado se determinó mediante el uso de SEC-HPLC acoplada a un detector del índice de refracción (RI).

Selección de agentes líticos de origen no animal usando los serotipos 1 y 6B

5 Se cultivaron por separados los serotipos 1 y 6B de *S. pneumoniae* en medios basados en Hy-Soy. Los cultivos se recogieron por separado y se distribuyeron por separado en tubos. Los compuestos de origen no animal a seleccionar para la actividad lítica comparable con DOC se prepararon como soluciones madre (en disolventes adecuados) y se añadieron a los cultivos. Después de incubación durante una noche, los tubos se centrifugaron y se determinó el contenido de PS de los lisados para cada serotipo por SEC-HPLC y se compararon con DOC.

Selección de agentes líticos de origen no animal usando mutantes *lytA*

10 Se cultivaron pares isogénicos de cepas que contenían la mutación *lytA* en un medio basado en Hy-Soy. Las células se recogieron y se distribuyeron en pocillos en una placa de microtitulación. El compuesto de ensayo se añadió y se incubó el cultivo. Después de 15 minutos a 36 °C, se determinó la densidad óptica (DO₆₀₀) de cada pocillo mediante el uso de un lector de placa SpectraMax® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) (véanse las Tablas 17 y 18, que resumen los resultados de dos ensayos diferentes para compuestos ejemplares).

Tabla 17. Cambio en la densidad óptica para cepas mutantes *lytA* (Ensayo 1)

Compuesto	Cambio en la DO ₆₀₀			
	R6X	R6X Δ <i>lytA</i>	D39	D39 Δ <i>lytA</i>
Blanco				
Sin adición				
Ácido desoxicólico, 0,1%	100%	34%	99%	47%
Ácido litocólico, 0,1%	20%	16%	8%	-2%
Ácido tauroglicocólico, 0,1%	51%	-16%	47%	-20%
Ácido heptanoico, 0,1%	25%	-57%	7%	-30%
SDS, 0,1%	99%	28%	95%	36%
Ácido octanosulfónico, 0,1%	43%	6%	34%	16%
Triton® X-100, 0,1%	91%	22%	97%	30%
Tween 80, 0,1%	36%	14%	20%	19%
Tween 20, 0,1%	44%	22%	28%	19%
N-lauryl sarcosina, 0,1%	100%	-34%	89%	-44%
Pluronic L31, 0,1%	39%	0%	17%	-38%
Pluronic L-61, 0,1%	23%	-3%	-19%	14%
Pluronic L81, 0,1%	21%	-3%	-14%	10%
Antarox 17-R-2, 0,1%	37%	24%	7%	16%

Tabla 18. Cambio en la densidad óptica para cepas mutantes *lytA* (Ensayo 2)

Compuesto	Cambio en la DO ₆₀₀			
	R6X	R6X Δ <i>lytA</i>	D39	D39 Δ <i>lytA</i>
Blanco				
Sin adición				
Agua	-8%	-8%	3%	-8%
Ácido desoxicólico, 0,1%	103%	20%	101%	41%

SDS, 0,1%	102%	-13%	100%	16%
N-lauril sarcosina, 0,1%	102%	-40%	101%	14%
Triton® X-100, 0,1%	101%	-19%	100%	4%
Tween 20, 0,1%	6%	-17%	-5%	-3%
Ácido octanosulfónico, 0,1%	13%	3%	18%	-3%

En base a los estudios de selección descritos anteriormente, se identificaron las siguientes alternativas de agente líítico de origen no animal a DOC: ácido decanosulfónico, Igepal® CA-630 (terc-octilfenoxi polí(oxietileno)etanol; CAS núm.: 9002-93-1; disponible en Sigma Aldrich, St. Louis, MO), N-lauril sarcosina sódica (NLS), iminodipropionato de laurilo, dodecil sulfato sódico, Triton® X-100, quenodesoxicolato, hiodesoxicolato, glicodesoxicolato, taurodesoxicolato, tauroquenodesoxicolato y colato.

5

Comparación de PS lisado con DOC a PS lisado con NLS

Se purificaron los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B y 7F de polisacáridos de *S. pneumoniae* a la escala de 10 l como se describe anteriormente en los Ejemplos 1 y 2 mediante el uso del procedimiento mejorado de la presente invención. Sin embargo, en un grupo se usó NLS (0,1 %) como agente líítico mientras que en otro grupo se usó DOC (0,12 %) como agente líítico.

10

Se midieron el rendimiento de PS, las relaciones de proteína/PS, las relaciones de NA/PS y el peso molecular de PS como se describe anteriormente, y los resultados se resumen en la Tabla 19. Estos resultados mostraron que el uso de NLS como agente líítico en los procedimientos de purificación de la invención producía rendimientos relativamente altos de PS con niveles relativamente bajos de proteínas y de ácido nucleicos. De hecho, para la mayoría de los serotipos ensayados, el uso de NLS como agente líítico producía mayores rendimientos de PS en comparación con el uso de DOC.

15

Tabla 19. Caracterización de PS para diferentes serotipos usando DOC frente a NLS

Serotipo	Agente líítico	Rendimiento de PS (%)	Proteína/PS (%)	Ácido nucleico/PS (%)	PM por SEC MALLS (g/mol, 10 ⁶)
1	DOC 0,12%	20%	4,2%	0,04%	0,615
1	NLS 0,1%	41%	2%	0,04%	0,65
4	DOC 0,12%	72%	0,05%	0,02%	0,38
4	NLS 0,1%	57%	0,67%	0,25%	0,34
5	DOC 0,12%	57%	3,6%	0,18%	0,32
5	NLS 0,1%	63%	1,8 %	0,01%	0,35
6A	DOC 0,12%	56%	0,7 %	0,00%	0,55
6A	NLS 0,1%	66%	1,1 %	0,05%	0,43
6B	DOC 0,12%	38%	0,6 %	0,05%	0,969
6B	NLS 0,1%	55%	0,1 %	0,01%	1,0
7F	DOC 0,12%	73%	0,7 %	0,06%	0,814
7F	NLS 0,1%	76%	0,5 %	0,02%	0,912

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención.

20

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, será obvio que se pueden poner en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* que comprende la ultrafiltración y la diafiltración de un caldo lisado celular clarificado de *S. pneumoniae*, seguido de la acidificación del caldo lisado concentrado hasta un pH inferior a 4,5.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH del caldo de lisado concentrado se disminuye hasta menos de 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1 o 3,0.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH del caldo de lisado concentrado se disminuye hasta aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,0, aproximadamente 3,9, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,0, aproximadamente 2,9, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,1 o aproximadamente 2,0.
- 15 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la acidificación se consigue mediante el uso de ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico.
- 5 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el proceso precipita al menos el 98 % de las proteínas de la solución.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de acidificación va seguida de una filtración con carbón activado.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho procedimiento precipita al menos el 90% de la proteína restante.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho *S. pneumoniae* se selecciona entre los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.
- 25 9. Una solución que contiene polisacáridos capsulares sustancialmente purificados obtenidos por medio del procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que la relación porcentual de proteína a polisacárido (proteína/PS) sea de menos del 10 %, menos del 9 %, menos del 8 %, menos del 7 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 % y la relación porcentual de ácido nucleico a polisacárido (NA/PS) sea menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 %.
- 30 10. La solución de la reivindicación 11, en la que:
 - el polisacárido capsular es del serotipo 1 y la relación proteína/PS es inferior al 2% y la relación NA/PS es inferior al 2%;
 - el polisacárido capsular es del serotipo 4 y la relación proteína/PS es inferior al 3% y la relación NA/PS es inferior al 2%;
 - 35 - el polisacárido capsular es del serotipo 5 y la relación proteína/PS es inferior o igual al 7,5% y la relación NA/PS es inferior o igual al 2%;
 - el polisacárido capsular es del serotipo 6A y la relación proteína/PS es inferior al 2% y la relación NA/PS es inferior al 2%;
 - el polisacárido capsular es del serotipo 6B y la relación proteína/PS es inferior al 4% y la relación NA/PS es inferior al 1%;
 - el polisacárido capsular es del serotipo 7F y la relación proteína/PS es inferior al 5% y la relación NA/PS es inferior al 2%;
 - el polisacárido capsular es del serotipo 9V y la relación proteína/PS es inferior al 2% y la relación NA/PS es inferior al 1%;
 - 40 - el polisacárido capsular es del serotipo 14 y la relación proteína/PS es inferior al 3% y la relación NA/PS es inferior al 2%;
 - el polisacárido capsular es del serotipo 18C y la relación proteína/PS es inferior al 2% y la relación NA/PS es inferior al 2%;
 - el polisacárido capsular es del serotipo 19A y la relación proteína/PS es inferior al 2% y la relación NA/PS es inferior al 2%;
 - el polisacárido capsular es del serotipo 19F y la relación proteína/PS es inferior al 3% y la relación NA/PS es inferior al 2%; o
 - el polisacárido capsular es del serotipo 23F y la relación proteína/PS es inferior al 2% y la relación NA/PS es inferior al 2%.
- 55 11. Un procedimiento de fabricación de una vacuna de neumococos, que comprende producir polisacáridos capsulares purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* por un procedimiento

reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y mediante el uso de dichos polisacáridos capsulares purificados en la fabricación de una vacuna de neumococos.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la vacuna de neumococos contiene polisacárido conjugado con un vehículo proteico.

Figura 1

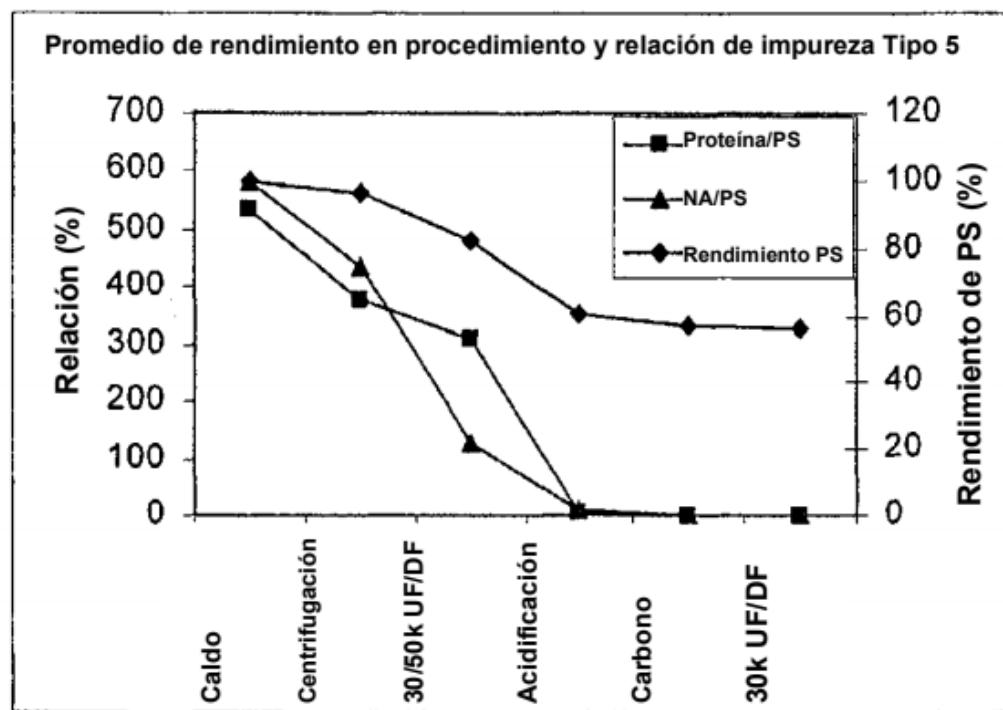
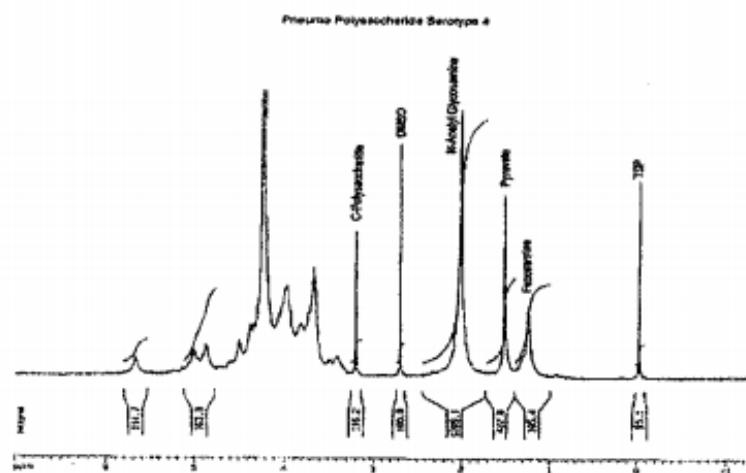


Figura 2

A.



B.

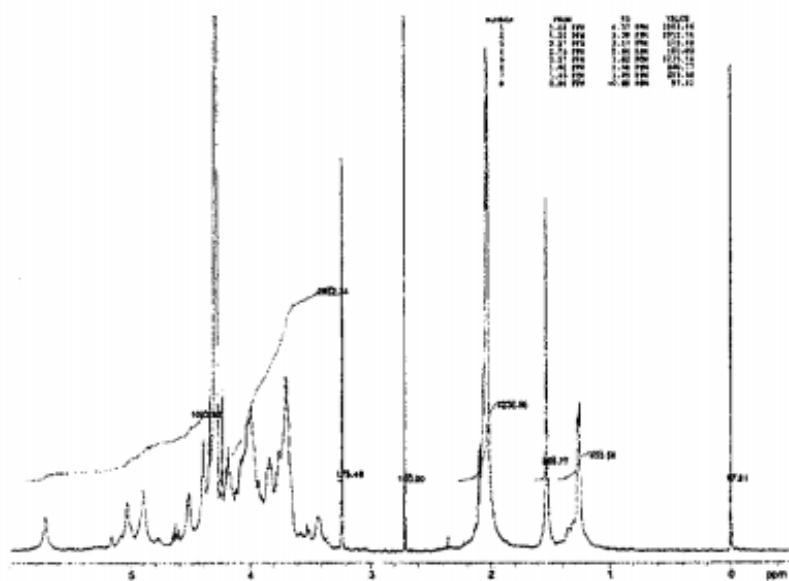


Figura 3

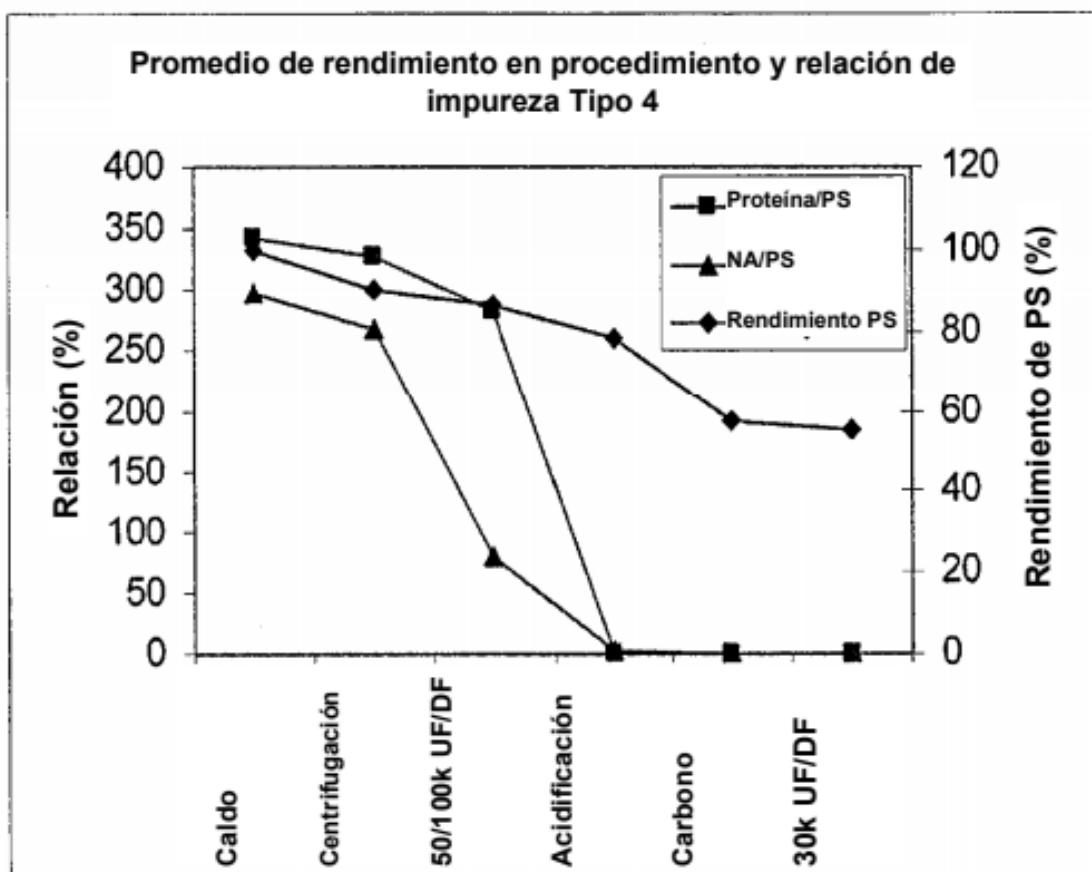


Figura 4

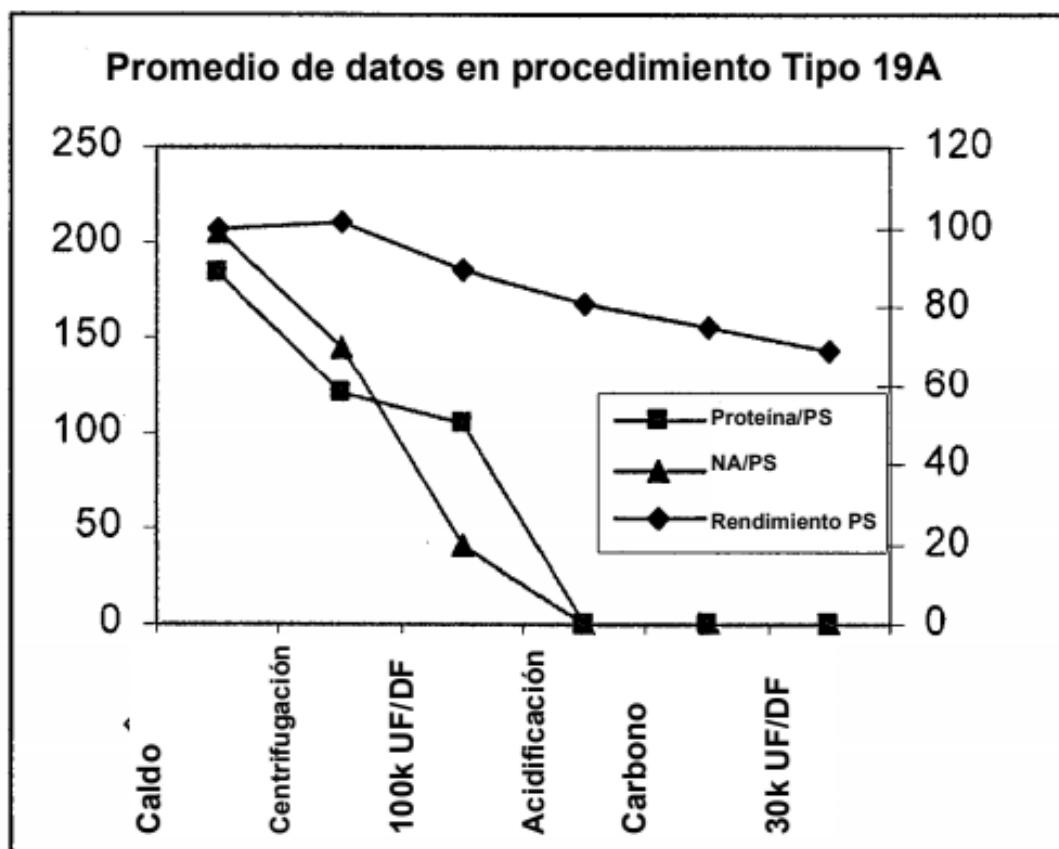


Figura 5

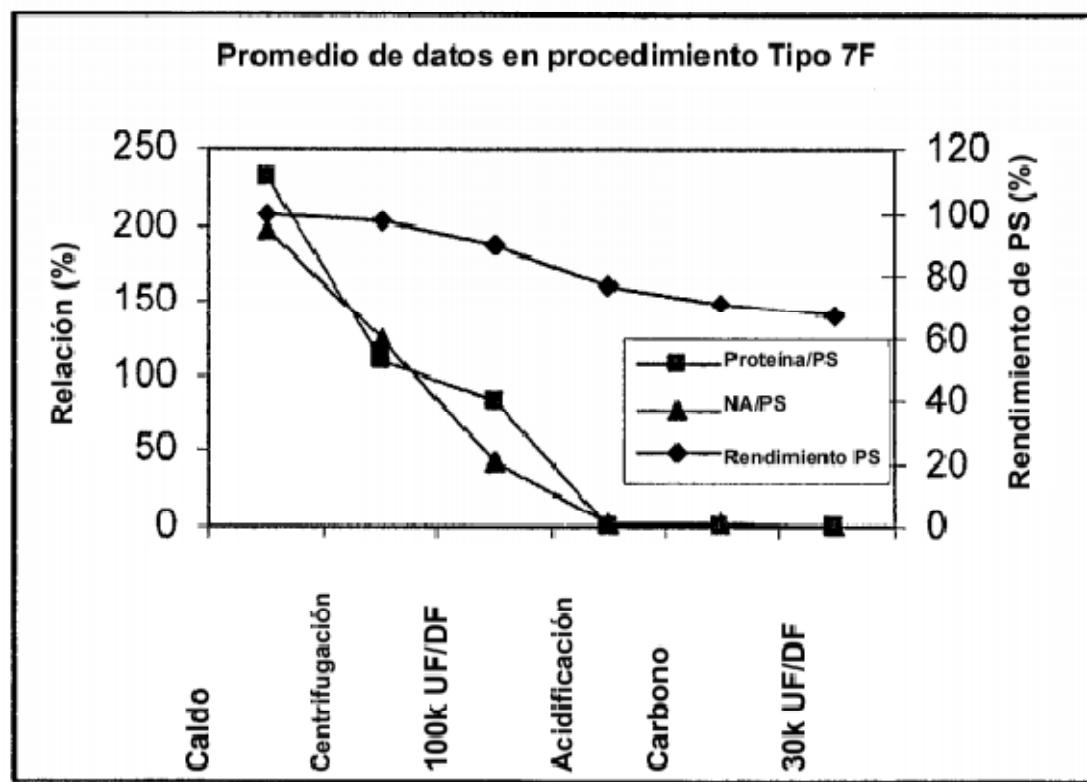


Figura 6

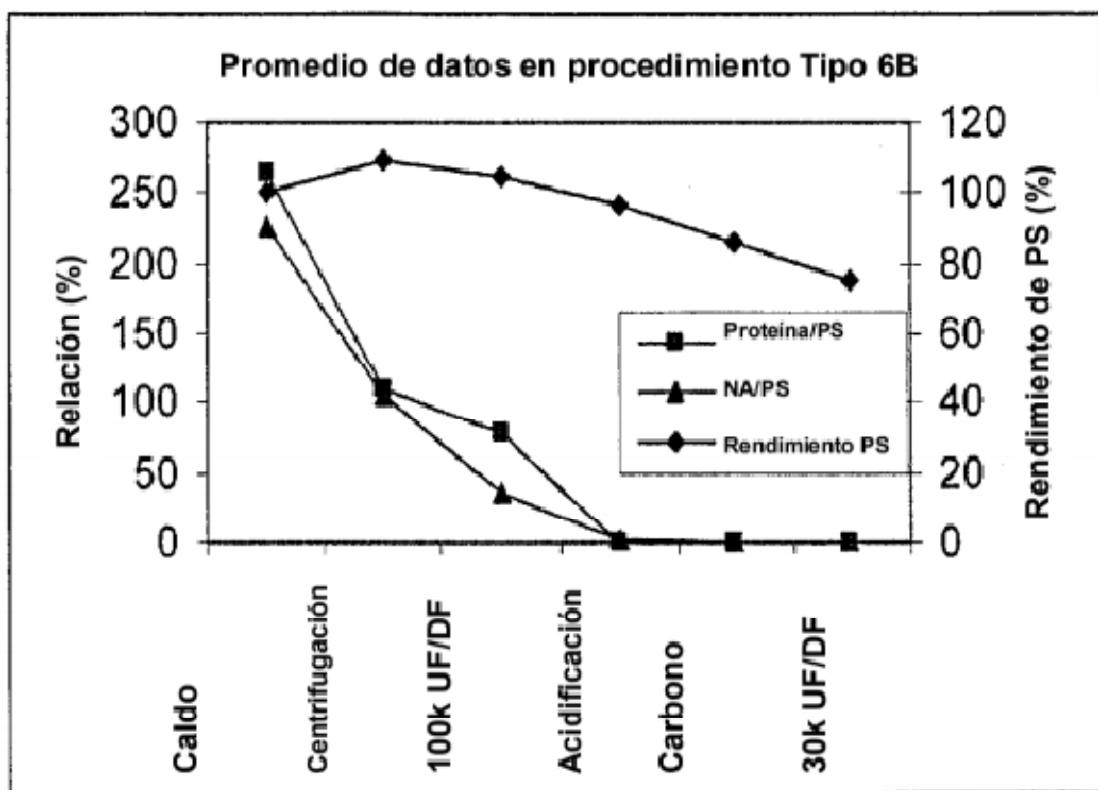


Figura 7

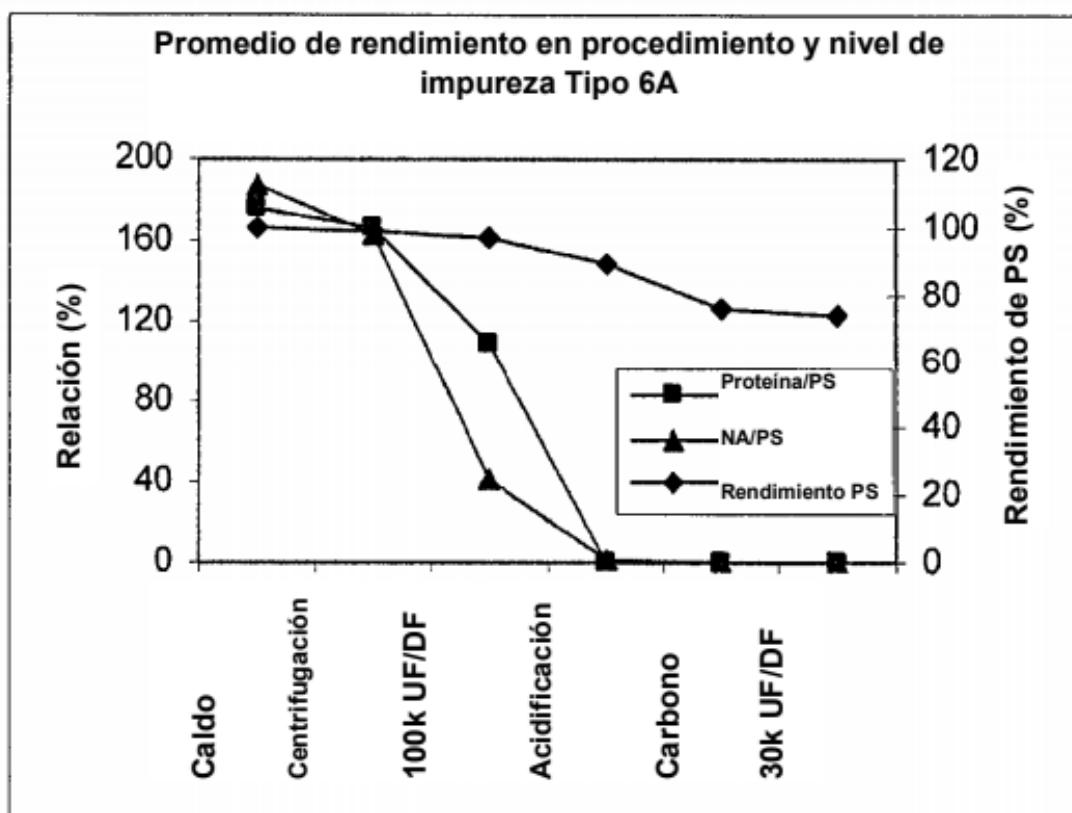


Figura 8

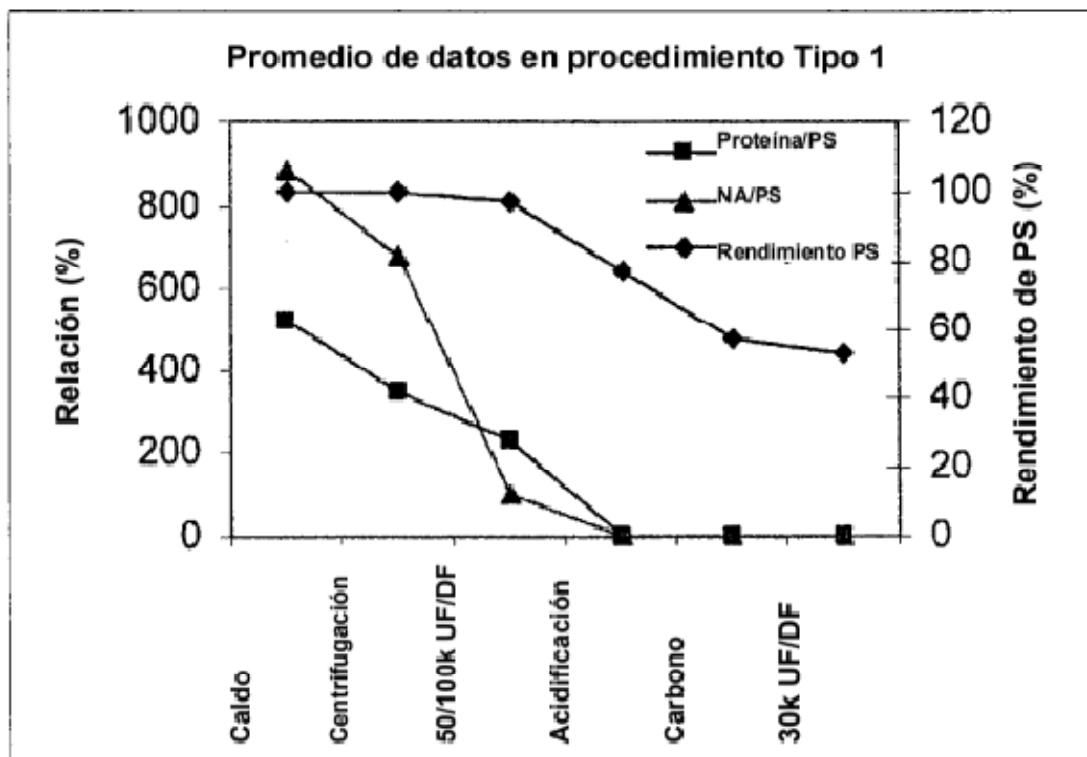


Figura 9

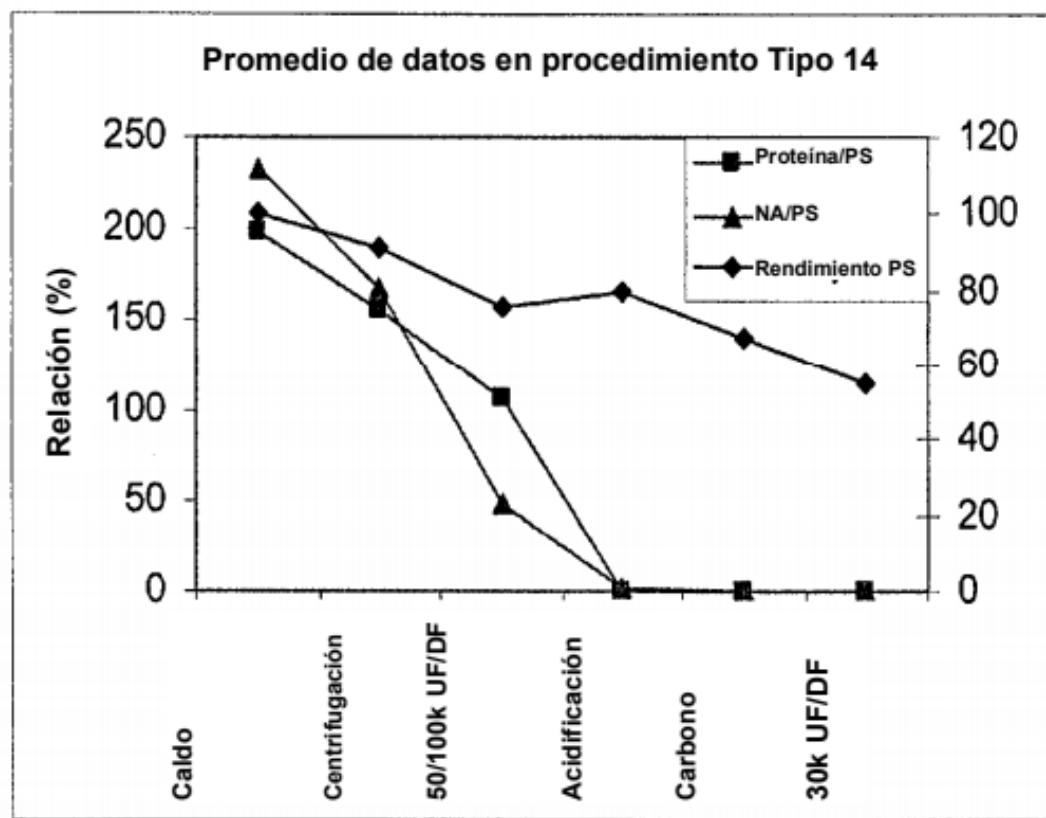


Figura 10

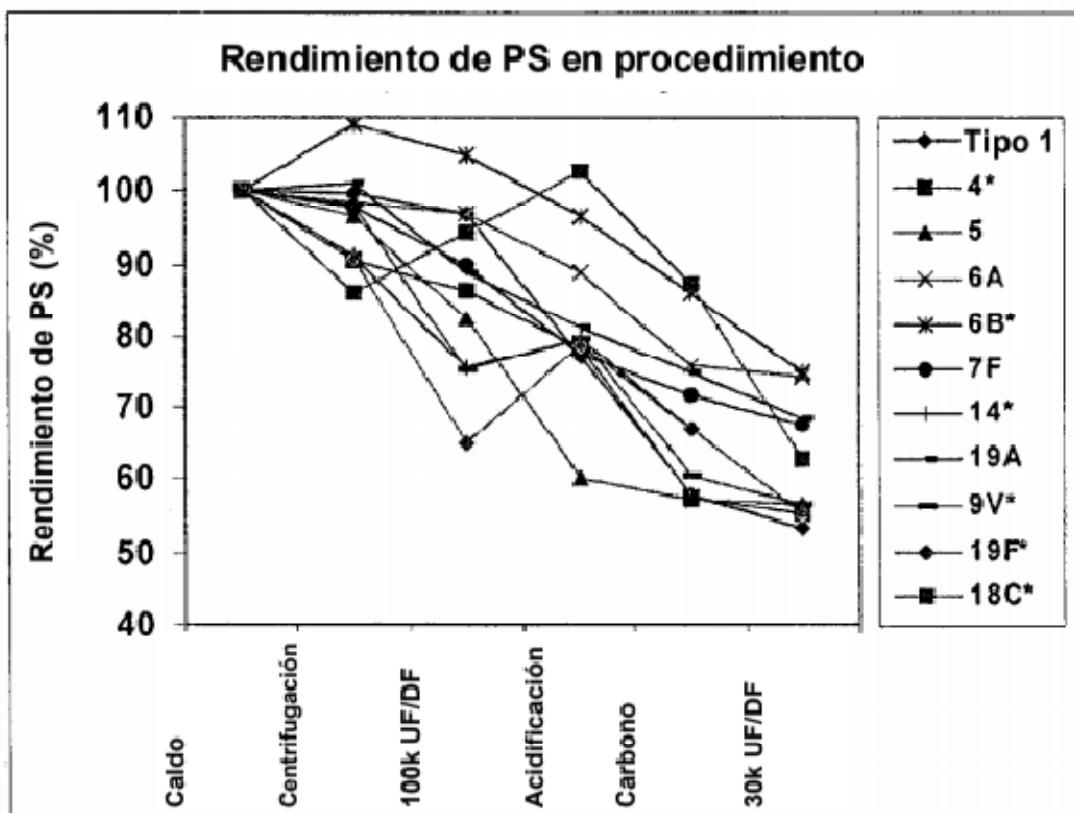


Figura 11

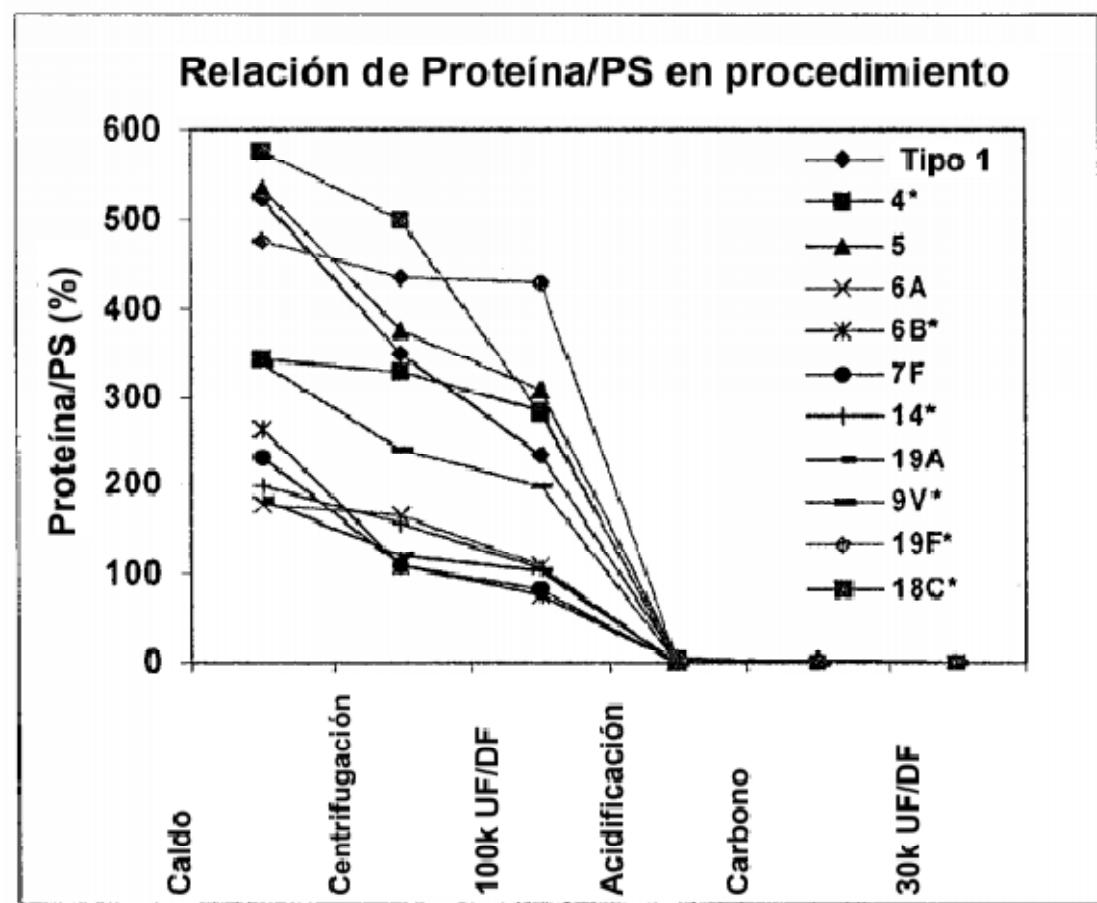


Figura 12

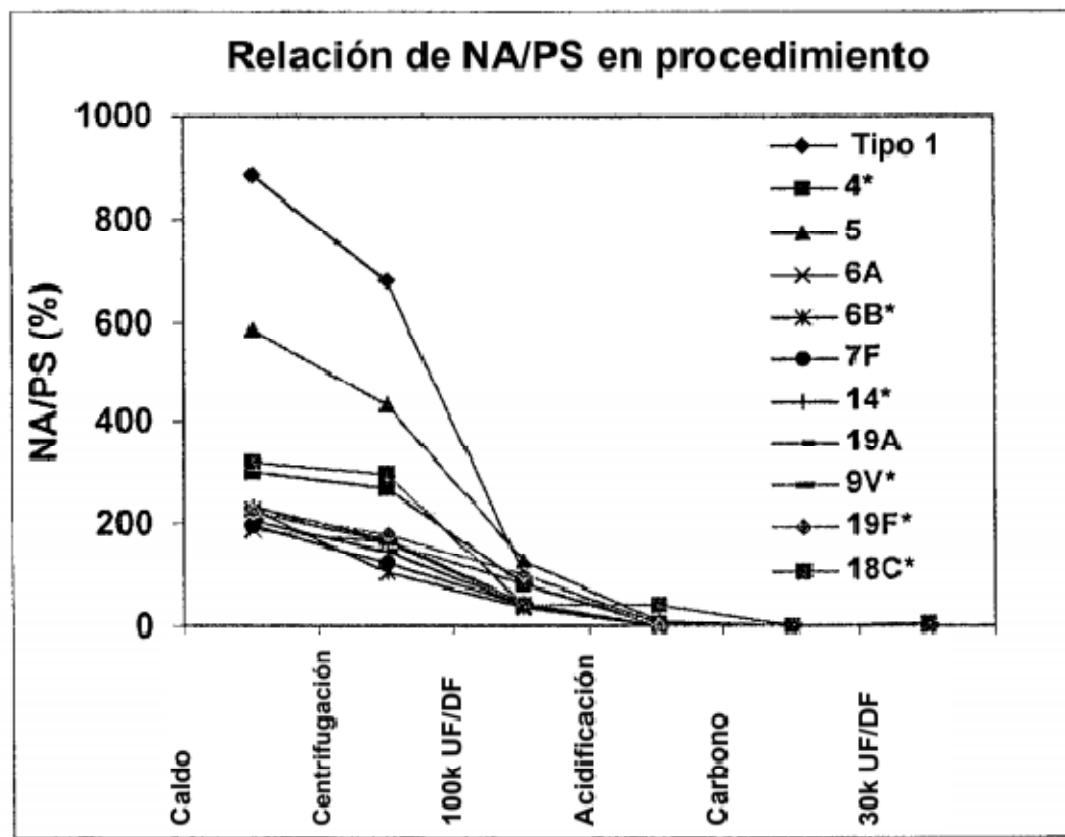


Figura 13

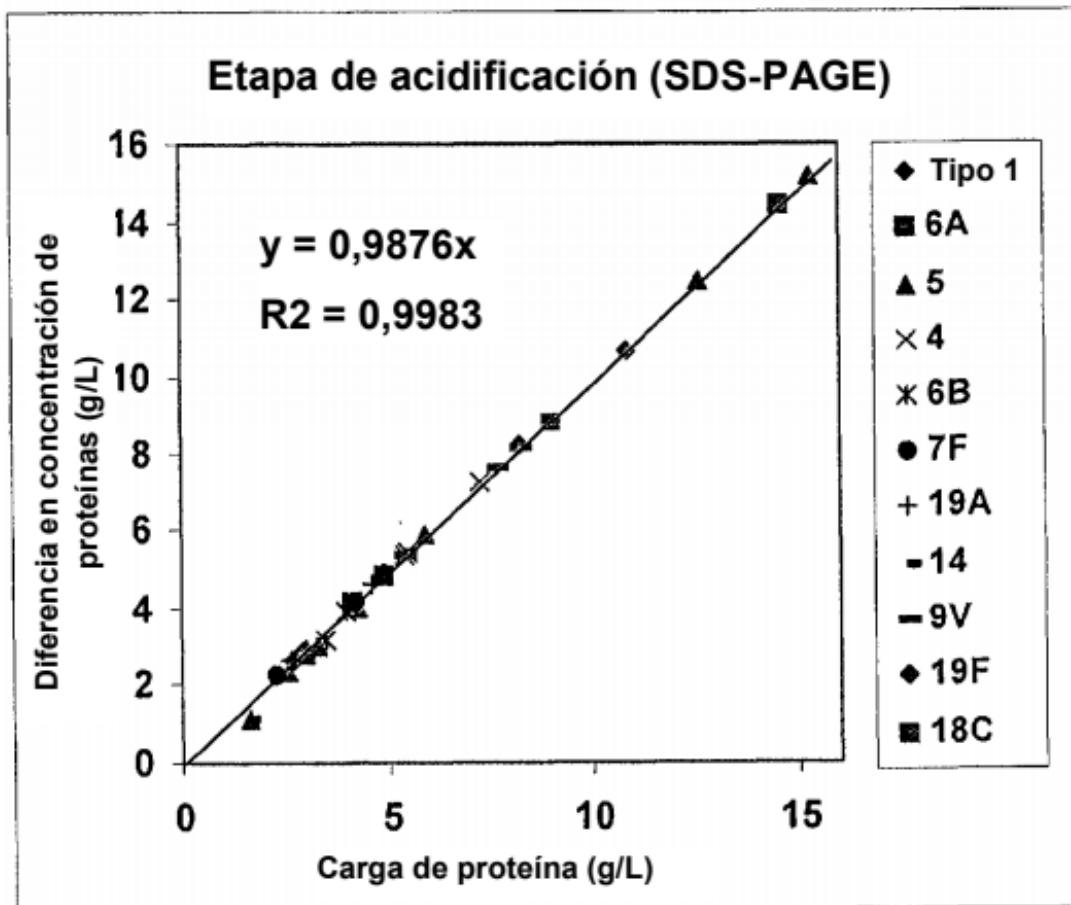


Figura 14

