

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 769**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2002 E 02757857 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1461418**

54 Título: **Procedimientos de producción de 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA)**

30 Prioridad:

30.03.2001 US 280089 P

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

26.07.2013

73 Titular/es:

**CORIXA CORPORATION (100.0%)
SUITE 200, 1124 COLUMBIA STREET
SEATTLE, WA 98104, US**

72 Inventor/es:

**MYERS, KENT R. y
SNYDER, D. SCOTT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 415 769 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

Procedimientos de producción de 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA).

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general, al campo de la producción biosintética de 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA). Más particularmente, se refiere a procedimientos de mejora del rendimiento de congéneres de 3D-MLA deseados o minimización del coste de purificación de precursores de lipopolisacárido (LPS) de 3D-MLA.

2. Descripción de técnica relacionada

10 Desde hace tiempo se reconoce que los lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS) son potentes estimulantes del sistema inmunitario. Puede provocarse una variedad de respuestas, tanto beneficiosas como perjudiciales, por cantidades de submicrogramo de LPS. El hecho de que algunas de las respuestas sean perjudiciales, y algunas de éstas puedan ser mortales, ha descartado el uso clínico de LPS por sí mismo. Se ha observado que el componente de LPS más responsable de la actividad endotóxica es el lípido A.

15 Por consiguiente, se ha hecho un gran esfuerzo por atenuar los atributos tóxicos de LPS o lípido A sin disminuir los beneficios inmunoestimulantes de estos compuestos. Entre estos esfuerzos fueron notables los de Edgar Ribi y sus colaboradores, que dieron como resultado la producción del derivado de lípido A 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA; composiciones que comprenden 3D-MLA están comercialmente disponibles bajo el nombre comercial MPL[®] de Corixa Corporation (Seattle, WA)). Se ha mostrado que 3D-MLA tiene esencialmente las mismas propiedades inmunoestimulantes que el lípido A, pero menor endotoxidad (Myers y col., patente de EE.UU. nº 4.912.094). Myers y col. también informaron del siguiente procedimiento para la producción de 3D-MLA. Primero, LPS o lípido A obtenido de una cepa mutante rugosa profunda de una bacteria Gram-negativa (por ejemplo, R595 de *Salmonella minnesota*) se somete a reflujo en disoluciones de ácido mineral de concentración moderada (por ejemplo, HCl 0,1 N) durante un periodo de aproximadamente 30 min. Esto conduce a la desfosforilación en la posición 1 de la glucosamina del extremo reductor y a la descarbohidratación en la posición 6' de la glucosamina no reductora del lípido A. Segundo, el lípido A descarbohidratado desfosforilado (también conocido como monofosforil lípido A o MLA) se somete a una hidrólisis básica, por ejemplo, disolviendo en un disolvente orgánico tal como cloroformo:metanol (CM) 2:1 (v/v), saturando la disolución con una disolución acuosa de Na₂CO₃ 0,5 M a pH 10,5 y evaporando al vacío el disolvente. Esto conduce a eliminación selectiva del resto ácido β-hidroximiriístico en la posición 3 del lípido A, resultando 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA).

20 La calidad del 3D-MLA producido mediante el procedimiento anterior es altamente dependiente de la pureza y composición del LPS obtenido de la bacteria Gram-negativa. Por ejemplo, el componente de lípido A de LPS es una mezcla de especies estrechamente relacionadas que contienen entre aproximadamente 5-7 restos de ácido graso. En la formación de 3D-MLA, como es evidente de la discusión anterior, un resto de ácido graso se elimina, dando 3D-MLA con entre aproximadamente 4-6 restos de ácido graso. Se mantiene generalmente que 3D-MLA con al menos 6 restos de ácido graso se prefiere en términos de la combinación de beneficios inmunoestimulantes mantenidos o potenciados, toxicidad reducida y otras propiedades deseables (Qureshi y Takayama, en "The Bacteria," vol. XI (Iglewski y Clark, eds.), Academic Press, 1990, pág. 319-338).

25 Otro ejemplo, la extracción a escala comercial de LPS de bacterias Gram-negativas normalmente implica el procedimiento de Chen (Chen y col., J. Infect. Dis. 128:543 (1973)); concretamente la extracción con CM, que conduce a una fase de CM rica en LPS y fosfolípidos de la que luego puede purificarse el LPS. Sin embargo, la purificación de LPS de la fase de CM rica en LPS y fosfolípidos normalmente requiere múltiples etapas de precipitación para obtener LPS de suficiente pureza para su uso en aplicaciones inmunoestimulantes tales como, por ejemplo, uso como adyuvante de vacuna.

30 Por tanto, sería deseable disponer de procedimientos para preparar convenientemente composiciones de LPS altamente puras. Además, sería deseable disponer de procedimientos para generar composiciones de LPS cuyas composiciones tuvieran 3D-MLA con niveles elevados de congéneres de hexaacilo.

35 Se han usado técnicas de fermentación conocidas para preparar cultivos de bacterias Gram-negativas que comprenden LPS fácilmente purificables. Estas técnicas conocidas normalmente implican recoger cultivos bacterianos en fase estacionaria temprana, de acuerdo con prácticas bacteriológicas convencionales. Sin embargo, se ha observado que el grado de acilación del LPS producido según condiciones conocidas es variable. Por ejemplo, el contenido de especies de heptaacilo en el lípido A de R595 de *S. minnesota* puede variar del 20% al 80%, dependiendo del lote (Rietschel y col., Rev. Infect. Dis. 9:S527 (1987)). Esta variabilidad en el contenido de congéneres de heptaacilo produciría diferencias significativas en el contenido de congéneres de hexaacilo en el 3D-MLA preparado a partir de estos lotes de LPS.

Sumario de la invención

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de lipopolisacárido (LPS) que comprende:

- (a) cultivar un cultivo de una cepa bacteriana mutante rugosa profunda en un medio;
- 5 (b) mantener el cultivo en fase estacionaria durante al menos aproximadamente 2 h;
- (c) recoger células del cultivo; y
- (d) extraer LPS de las células.

El procedimiento permite la producción de un LPS que da 3D-MLA con una proporción relativamente alta (es decir, al menos aproximadamente el 20% en moles) de congéneres que comprenden 6 restos de ácido graso.

10 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la memoria descriptiva y están incluidos para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

15 La Figura 1 muestra placas de CCF de extractos de etanol y muestras de LPS obtenidas con diferentes temperaturas durante las extracciones con etanol. La placa de la izquierda muestra, de izquierda a derecha, los extractos de etanol a temperaturas de 22 °C, 37 °C y 50 °C. La muestra de la derecha de esta placa es una muestra de LPS auténtica. La placa a la derecha muestra el LPS obtenido de cada preparación. Las muestras en los carriles 3, 4 y 5 se corresponden con LPS de células sometidas a pre-extracciones con etanol a 22 °C, 37 °C y 50 °C, respectivamente. Las bandas pesadas a $R_f \sim 0,6$ se corresponden con fosfolípido e impurezas de ácidos grasos. Los niveles de estas impurezas se reducen aumentando la temperatura de las extracciones con etanol, y son muy bajos en la muestra que se pre-extrajo a 50 °C.

Descripción de realizaciones ilustrativas

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de lipopolisacárido (LPS) que comprende:

- 25 (a) cultivar un cultivo de una cepa bacteriana mutante rugosa profunda en un medio;
- (b) mantener el cultivo en fase estacionaria durante al menos aproximadamente 2 h;
- (c) recoger células del cultivo; y
- (d) extraer LPS de las células.

30 Los lipopolisacáridos son el principal lípido constituyente en la valva externa de la membrana externa de bacterias Gram-negativas. La fracción de lipopolisacáridos de una bacteria Gram-negativa comprende, entre otros componentes, lípido A. Como se ha descrito, el lípido A puede descarbohidratarse y desfosforilarse parcialmente para dar monofosforil lípido A (MLA), y MLA puede desacilarse selectivamente en la posición 3 para dar 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA).

35 Sin embargo, el lípido A producido por bacterias Gram-negativas normalmente comprende varias especies que tienen la misma estructura de lípido A global, pero se diferencian en el número de restos de ácido graso que contienen. Grupos de especies del lípido A con el mismo número de ácidos grasos se denominan en el presente documento "congéneres". Los congéneres del lípido A que tienen de 4 a 7 restos de ácido graso se producen por cultivo a escala comercial convencional de bacterias Gram-negativas tales como R595 de *S. minnesota*. Como resultado, 3D-MLA producido de, por ejemplo, lípido A de R595 de *S. minnesota* tiene una composición de congéneres que normalmente oscila de 3 a 6 restos de ácido graso (debido a que 3D-MLA ha experimentado pérdida de un resto de ácido graso).

40 La heterogeneidad en la composición de congéneres de 3D-MLA (mediante lípido A y MLA) es atribuible a dos fuentes: (1) variabilidad biosintética en el ensamblaje del lípido A y (2) pérdida de restos de ácido graso del esqueleto del lípido A durante el procesamiento a 3D-MLA. Aunque no se desea quedar ligado a teoría, se cree que la variabilidad biosintética se produce debido a la especificidad por sustratos no absolutos de las aciltransferasas que participan en las etapas terminales de la biosíntesis del lípido A, entre otras explicaciones. La pérdida de restos de ácido graso del esqueleto del lípido A también puede producirse durante las hidrólisis ácidas y alcalinas normalmente usadas en la producción de 3D-MLA.

Sorprendentemente, se descubrió que la composición de congéneres de 3D-MLA puede alterarse alterando los parámetros de un procedimiento de cultivo de una cepa bacteriana mutante rugosa profunda que produce lípido A. Específicamente, se descubrió que el mantenimiento del cultivo de la cepa bacteriana mutante rugosa profunda en fase estacionaria durante al menos aproximadamente 5 h antes de recogerla produce un cambio en las proporciones de congéneres del lípido A así producidos de forma que, normalmente, al menos aproximadamente el 20% en moles del 3D-MLA producido después a partir del lípido A contiene 6 ácidos grasos. Preferentemente, al menos aproximadamente el 50% en moles de 3D-MLA contiene 6 ácidos grasos. Se ha encontrado que es particularmente eficaz un mantenimiento en el tiempo de la fase estacionaria de aproximadamente 5,5 h. Esto es a diferencia de los procedimientos de cultivo típicos conocidos en la técnica, en los que la recogida se produce casi inmediatamente después de la entrada del cultivo en la fase estacionaria; en el procedimiento conocido, el contenido de congéneres del LPS es altamente variable y produce 3D-MLA con contenido de congéneres de hexaacilo variable.

Por "cepa bacteriana mutante rugosa profunda" se quiere significar una cepa de una bacteria Gram-negativa que tiene un fenotipo rugoso profundo. Un fenotipo "rugoso profundo" significa que el resto de polisacárido unido al lípido A consiste en solo aproximadamente 2-3 residuos de ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO). Preferentemente, la cepa bacteriana mutante rugosa profunda está seleccionada del género *Salmonella*. Más preferentemente, si la cepa bacteriana mutante rugosa profunda es del género *Salmonella*, es de la especie *Salmonella minnesota*, e incluso más preferentemente es la cepa R595 de *Salmonella minnesota*. Pueden usarse otras cepas bacterianas mutantes rugosas profundas, tales como cepas de *Proteus mirabilis*, entre otras.

Puede usarse cualquier técnica apropiada para cultivar una cepa bacteriana mutante rugosa profunda. Normalmente, esto implicará el uso de al menos un biorreactor a escala comercial. En una realización, la técnica implica inocular un biorreactor relativamente pequeño (por ejemplo, 15 l) con células de la cepa bacteriana mutante rugosa profunda, cultivar la cepa bacteriana mutante rugosa profunda hasta una fase estacionaria, seguido de transferencia aséptica del caldo de células de 15 l a un biorreactor grande (por ejemplo, 750 l).

El cultivo puede realizarse sobre cualquier medio conocido o descubierto para permitir el crecimiento de la cepa bacteriana mutante rugosa profunda. En una realización preferida, el medio es M9, una mezcla de sales inorgánicas complementada con dextrosa y casaminoácidos. La composición de M9 es muy conocida para un experto habitual en la técnica.

Después de obtenerse la cepa bacteriana mutante rugosa profunda en fase estacionaria durante al menos aproximadamente 5 h, las células pueden recogerse del cultivo y extraerse el LPS de las células. Pueden emplearse técnicas conocidas para recoger las células del cultivo y extraer LPS de las células, aunque una técnica preferida para extraer LPS de las células se describe a continuación.

La recogida puede realizarse por cualquier técnica conocida. En una realización preferida, después de mantener el cultivo en fase estacionaria durante al menos aproximadamente 5 h, el contenido del biorreactor se bombea a un aparato de filtración tangencial para separar el medio agotado de las células.

El LPS se extrae posteriormente de las células por cualquier técnica apropiada. Técnicas conocidas incluyen el procedimiento de Galanos, que implica extraer LPS con una mezcla de fenol, cloroformo y éter de petróleo (PCP), seguido de evaporación del cloroformo y éter de petróleo, adición de acetona y agua para precipitar LPS y recuperación del LPS por centrifugación o filtración (Galanos y col., Eur. J. Biochem. 9:245 (1969)), y el procedimiento de Chen, citado anteriormente, que implica extraer LPS con una mezcla de cloroformo y metanol (CM), seguido de una serie de etapas de precipitación en metanol.

Una mejora del procedimiento de Chen se describe más adelante, y se prefiere para la fabricación de LPS y sus derivados para aplicaciones comerciales.

Independientemente de la técnica de extracción, el resultado es un LPS secado sustancialmente puro que puede procesarse adicionalmente por hidrólisis ácida e hidrólisis básica secuenciales para formar 3D-MLA, como se enseña por Ribí, patente de EE.UU. nº 4.436.727, y Myers y col., patente de EE.UU. nº 4.912.094. Para resumir las enseñanzas de estas referencias como una realización preferida para la formación de 3D-MLA, el LPS se hace reaccionar con un ácido orgánico o inorgánico, y luego se liofiliza para producir MLA. El ácido inorgánico es preferentemente ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. El ácido orgánico es preferentemente ácido toluenosulfónico o ácido tricloroacético. La reacción puede realizarse a una temperatura de entre aproximadamente 90 °C y aproximadamente 130 °C durante un tiempo suficiente para completar la hidrólisis, comúnmente entre aproximadamente 15 min y aproximadamente 60 min. El MLA puede tratarse con un disolvente, preferentemente acetona, para disolver ácidos grasos y otras impurezas, y se elimina el disolvente de ácidos grasos rico en impurezas.

Posteriormente, el MLA se somete a tratamiento alcalino suave para eliminar selectivamente el ácido β -hidroximirístico de la posición 3 del MLA (bajo condiciones alcalinas suaves, solo el ácido β -hidroximirístico en la posición 3 es lábil). El tratamiento alcalino suave puede llevarse a cabo en medios acuosos u orgánicos. Disolventes orgánicos apropiados

incluyen metanol u otros alcoholes, sulfóxido de dimetilo (DMSO), dimetilformamida (DMF), cloroformo, diclorometano o mezclas de los mismos, entre otros. También pueden emplearse combinaciones de agua y disolventes orgánicos miscibles con agua.

5 La base alcalina usada para realizar la hidrólisis está seleccionada preferentemente de hidróxidos, carbonatos, fosfatos o aminas. Bases inorgánicas ilustrativas incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato sódico, bicarbonato potásico, bicarbonato sódico y bicarbonato potásico, entre otros. Bases orgánicas ilustrativas incluyen alquilaminas (tales como dietilamina y trietilamina, entre otras), entre otras.

10 En medios acuosos, el pH es normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 14, preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 12. La reacción de hidrólisis se realiza normalmente a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 80 °C, preferentemente de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, durante un periodo de aproximadamente 10 min a aproximadamente 48 h.

Una técnica preferida para la hidrólisis alcalina implica disolver MLA en CM 2:1 (v/v), saturar la disolución con un tampón acuoso de Na₂CO₃ 0,5 M a pH 10,5 y luego evaporar al vacío el disolvente a 45-50 °C bajo un aspirador a vacío (aproximadamente 100 mm de Hg).

15 En otra realización, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de extracción de lipopolisacárido (LPS) de un cultivo de células de cepa bacteriana mutante rugosa profunda que comprende:

(a) extraer las células con una disolución que consiste esencialmente en al menos aproximadamente el 75% en peso de un alcohol alifático que tiene de 1 a 4 átomos de carbono y el resto agua, produciendo así células con contenido de fosfolípidos reducido;

20 (b) extraer las células con contenido de fosfolípidos reducido con una disolución que comprende cloroformo y metanol, dando así una disolución de LPS en cloroformo y metanol.

25 Las células de cepa bacteriana mutante rugosa profunda, el cultivo de las mismas y procedimientos de preparación del cultivo son como se han descrito anteriormente. Preferentemente, la cepa bacteriana mutante rugosa profunda está seleccionada del género *Salmonella* o *Escherichia*. Más preferentemente, si la cepa bacteriana mutante rugosa profunda es del género *Salmonella*, es de la especie *Salmonella minnesota*, e incluso más preferentemente es la cepa R595 de *Salmonella minnesota*. Si la cepa bacteriana mutante rugosa profunda es del género *Escherichia*, más preferentemente es de la especie *Escherichia coli*, y más preferentemente es la cepa D31m4 de *Escherichia coli*.

30 La primera etapa de extracción puede realizarse con cualquier alcohol alifático de cadena corta. El alcohol alifático puede ser lineal, ramificado o cíclico. Preferentemente, el alcohol alifático tiene de 2 a 4 átomos de carbono y es miscible con agua. Más preferentemente, el alcohol alifático es etanol.

35 La disolución que comprende el alcohol alifático puede comprender cualquier proporción de alcohol alifático del 75% en peso o superior. Preferentemente, la disolución comprende entre aproximadamente el 85% en peso y aproximadamente el 95% en peso de alcohol alifático. Esencialmente, el resto de la disolución es agua. Pueden estar presentes trazas de otros compuestos como resultado de purificación incompleta u otra contaminación del alcohol alifático y componentes del agua de la disolución.

La temperatura a la que se realiza la primera etapa de extracción puede ser cualquier temperatura que sea eficaz en proporcionar extracción suficiente del fosfolípido de las células cultivadas. Preferentemente, la temperatura está entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 65 °C. Más preferentemente, la temperatura está entre aproximadamente 45 °C y aproximadamente 55 °C.

40 Otros parámetros de la primera etapa de extracción, tales como tasa de adición de la disolución de alcohol alifático, duración del contacto de la disolución y las células y agitación o ausencia de la misma, entre otros, pueden variarse rutinariamente por un experto habitual en la técnica.

45 La primera etapa de extracción produce (i) una fase de disolución de alcohol alifático rica en fosfolípidos y (ii) células con un contenido de fosfolípidos reducido. El componente de LPS de las membranas celulares se segrega sustancialmente completamente con las células con un contenido de fosfolípidos reducido.

La segunda etapa de extracción implica extraer las células con un contenido de fosfolípidos reducido con una disolución de cloroformo:metanol (CM).

50 Cualquier proporción de cloroformo y metanol conocida por ser adecuada para su uso en extraer LPS de membranas celulares (tal como en el procedimiento de Chen) puede usarse en la segunda etapa de extracción. Normalmente, la proporción de cloroformo con respecto a metanol es de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 9:1. También pueden usarse mezclas de disolventes con propiedades equivalentes a aquellas de CM para obtener LPS de las células con un contenido de fosfolípidos reducido.

Una ventaja del presente procedimiento con respecto al procedimiento de Chen consiste en la eliminación de fosfolípido en la primera etapa de extracción. Mientras que la extracción con CM del procedimiento de Chen produce una disolución de LPS que contiene niveles sustanciales de fosfolípidos, la segunda etapa de extracción de la presente invención, que se realiza sobre células con un contenido de fosfolípidos reducido, produce una disolución rica en LPS que carece sustancialmente de fosfolípido. Procedimientos alternativos de producción de preparaciones de LPS que están relativamente libres de fosfolípidos, tales como el procedimiento de Galanos (véase anteriormente), son menos deseables debido a que no son aceptados por la producción a gran escala, usan mezclas de disolventes que plantean problemas de salud y de seguridad (por ejemplo, fenol:cloroformo:éter de petróleo), o ambos.

Dada la ausencia sustancial de fosfolípido de la disolución de LPS, la posterior purificación del LPS según este procedimiento es generalmente más simple y menos cara que bajo el procedimiento de Chen. Se ha encontrado que puede formarse un residuo de LPS seco de suficiente pureza evaporando el cloroformo y metanol de la disolución de LPS.

Opcionalmente, el LPS puede procesarse adicionalmente, tal como por las etapas de hidrólisis ácida e hidrólisis básicas descritas anteriormente, para producir MLA o 3D-MLA.

El 3D-MLA producido siguiendo los procedimientos descritos anteriormente puede usarse para una variedad de fines. Un uso preferido es un inmunoestimulante o adyuvante para composiciones farmacéuticas que comprenden un polinucleótido inmunogénico, polipéptido, anticuerpo, linfocito T o célula presentadora de antígeno (APC). Un inmunoestimulante o adyuvante se refiere a esencialmente cualquier sustancia que intensifique o potencie una respuesta inmunitaria (mediada por anticuerpo y/o célula) a un antígeno exógeno.

Una respuesta inmunitaria que puede estimular el MLA o 3D-MLA producido según la presente invención es la tipo Th1. Se ha observado que una combinación de monofosforil lípido A (MLA), preferentemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MLA), junto con una sal de aluminio, es eficaz como adyuvante para provocar una respuesta predominantemente de tipo Th1. Altos niveles de citocinas tipo Th1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 y IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno administrado. A diferencia, altos niveles de citocinas tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales. Tras la administración de una composición farmacéutica que comprende MLA o 3D-MLA, un paciente sustentará una respuesta inmunitaria que incluye respuestas tipo Th1 y Th2. Si la respuesta es predominantemente tipo Th1, el nivel de citocinas tipo Th1 aumentará a un mayor grado que el nivel de citocinas tipo Th2. Los niveles de estas citocinas pueden evaluarse fácilmente usando ensayos convencionales. Para una revisión de las familias de citocinas véase Mosmann y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989.

En una realización preferida, el sistema de adyuvante incluye la combinación de un monofosforil lípido A (MLA), preferentemente 3D-MLA, con un derivado de saponina (tal como Quil A o derivados del mismo, que incluyen QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); escina; digitonina; o saponinas de *Gypsophila* o *Chenopodium quinoa*), tal como la combinación de adyuvante de QS21 y 3D-MLA, como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 se inactiva con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739. Otras formulaciones preferidas comprenden una emulsión aceite en agua y tocoferol. Otra formulación de adyuvante particularmente preferida que emplea QS21, 3D-MLA y tocoferol en una emulsión aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

Los siguientes ejemplos están incluidos para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Debe apreciarse por aquellos expertos en la técnica que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y así puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplo 1 - Procedimientos generales

A. Preparación de medios

El crecimiento celular se realizó en medio M9, que se prepara combinando disoluciones estériles de sales inorgánicas, casaminoácidos y dextrosa. La disolución salina M9 se prepara normalmente en el fermentador y contiene las siguientes sales: 2,0 g/l de NaCl, 0,2 g/l de MgSO₄·7H₂O, 3,0 g/l de KH₂PO₄, 6,0 g/l de Na₂HPO₄ y 1,0 g/l de NH₄Cl. Disoluciones estériles de 20% (peso/volumen) de casaminoácidos (20 ml/l) y 50% (peso/volumen) de dextrosa (32 ml/l) se añaden entonces asépticamente al fermentador para dar el medio completo.

B. Crecimiento de semillas

Normalmente, un matraz Erlenmeyer de 250 ml estéril se cargó con 50 ml de medio M9 estéril. Un vial de semillas de R595 de *Salmonella minnesota* (aprox. 10⁸ ufc) se descongeló y se añadió al matraz, que luego se tapó con un tapón de gasa. El cultivo se incubó a 37 °C durante 6-8 h, hasta que el robusto crecimiento es evidente.

C. Crecimiento celular

Cultivos de R595 de *Salmonella minnesota* se cultivaron en un fermentador BioFlo III (New Brunswick Scientific, Inc.) equipado con un recipiente de vidrio de 2,5 l. En una ejecución típica, el recipiente se cargó con 2,0 l de disolución de sales M9, se esterilizó en autoclave y las disoluciones estériles de casaminoácidos y dextrosa se añadieron luego asépticamente. El fermentador se equipó con líneas de alimentación para antiespumante (0,1% de SAG-471, Witco Corp.) y NH₄OH (30%), además de sondas para pH, dO₂ y espuma. El medio se ajustó a pH 6,9 usando la alimentación de NH₄OH. El fermentador se inoculó luego con el cultivo de semillas entero y se incubó a 37 °C con burbujeo de aire (normalmente 2,0 l/min) y agitación (normalmente 50 rpm). La fase de crecimiento del cultivo se monitorizó midiendo la densidad óptica a 590 nm. Las células se recogieron por tanto centrifugación como filtración de flujo tangencial, se lavaron con agua y se liofilizaron.

D. Extracción de lipopolisacárido (LPS)

Se aisló LPS según el procedimiento de Qureshi y col. (1986) con leves modificaciones. En una ejecución típica, las células secadas se agitaron primero a una concentración de 20 mg/ml en 90% de etanol (v/v) a temperatura ambiente durante 1 h y luego se recuperaron por filtración a vacío. Las células se sometieron a una segunda extracción con etanol, seguida de extracciones secuenciales con acetona y éter dietílico (15 min cada una, ambas a 40 mg/ml basado en el peso inicial), y el polvo de éter resultante se dejó secar al aire durante la noche. Mientras tanto se preparó una disolución de fenol (89%):cloroformo:éter de petróleo 19:45:72 (v/v/v; abreviado PCP) y se dejó reposar durante la noche. El polvo de éter se suspendió en PCP, que se separó por decantación del exceso de agua, a una concentración de 70 mg/ml. La disolución se agitó durante 30 min y luego se centrifugó (3000 x g, 15 min, 0-5 °C). La fracción de sobrenadante se decantó en un matraz redondo y el sedimento de células se extrajo una segunda vez con PCP. Las fracciones de sobrenadante se combinaron y se evaporaron rotatoriamente a 40 °C hasta que todos los disolventes volátiles se eliminaron en gran parte. Entonces se midió el volumen restante. Se añadió agua gota a gota hasta que fue evidente una turbidez persistente, y luego se añadieron 5 volúmenes de acetona seguido de 1 volumen de éter dietílico (ambos enfriados en un baño de hielo) a la disolución de fenol con agitación rápida. La disolución se dispuso en un baño de hielo durante 30 min y el LPS precipitado se recuperó luego por centrifugación (5000 x g, 15 min, 0-5 °C). Generalmente fue necesario filtrar por gravedad la fracción de sobrenadante para recuperar cualquier LPS que no quedó en el sedimento. El LPS se lavó una vez en un volumen mínimo de acetona fría, se recuperó por centrifugación/filtración y luego se secó a vacío. Rendimientos típicos fueron del 4-5% basado en el peso seco inicial de las células.

E. Preparación de 4'-monofosforil lípido A (MLA)

Se suspendió LPS en agua a una concentración de 10 mg/ml, usando sonicación en baño a 45-55 °C para ayudar en la dispersión del material sólido. La disolución resultante debe ser ligeramente turbia sin sólido visible a simple vista. A esta disolución se añadió 1 volumen de HCl 0,2 N, y luego se dispuso en un baño de agua hirviendo durante 15 min. La reacción se inactivó en un baño de hielo, y luego se extrajo con 5 volúmenes (con respecto a la disolución de LPS inicial) de cloroformo:metanol 2:1 (v/v). La disolución bifásica se agitó con vórtex y las fases se separaron por centrifugación a baja velocidad (500-1000 x g). La fase inferior se recuperó y se evaporó bajo nitrógeno, dando MLA en bruto.

F. Preparación de 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MLA)

MLA en bruto se disolvió en cloroformo:metanol 2:1 (v/v) a una concentración de entre aproximadamente 1-5 mg/ml, y 3,0 ml de esta disolución se transfirieron a un tubo de ensayo de 16 x 100 mm. Se añadieron 0,4 ml adicionales de metanol al tubo, y luego se dispuso en un baño de agua a 50 °C durante 10 min. La reacción se inició mediante la adición de 40 µl de KHCO₃ 0,5 M, pH 10,5, y la disolución se incubó a 50 °C durante 20 min. Al final de este tiempo, el tubo se sacó del baño de agua y la reacción se inactivó mediante la adición de 2,0 ml de HCl 0,1 N (enfriado), seguido de agitación con vórtex. Se recuperó 3D-MLA mediante la adición de 1,0 ml de metanol, agitación con vórtex, centrifugación (500-1000 x g) y evaporación de la fase inferior (orgánica) a sequedad bajo nitrógeno.

Ejemplo 2 - Procedimientos analíticos

A. Cromatografía en capa fina (CCF) de MLA y muestras relacionadas

Todos los análisis de CCF se llevaron a cabo usando placas de 5 x 10 cm recubiertas con gel de sílice 60 (E Merck). Las muestras se aplicaron generalmente a las placas de CCF como disoluciones de 10 mg/ml en cloroformo:metanol 4:1 (v/v), aplicándose 3 µl de disolución (30 µg de muestra) en pequeñas manchas a una línea de 5 mm usando una pipeta capilar. Las placas se revelaron con un sistema de disolventes que comprendía cloroformo/metanol/agua/hidróxido de amonio 50:31:6:2 (v/v). Las bandas sobre las placas reveladas se visualizaron pulverizando con una disolución de 10% (peso/volumen) de ácido fosfomolibdico en etanol, seguido de calentamiento a 150-160 °C. En algunos casos, las intensidades relativas de las manchas se cuantificaron por

densitometría de barrido con un Shimadzu CS9000U Dual Wavelength Flying Spot Scanner (Shimadzu Corp.), usando una longitud de onda de barrido de 520 nm.

B. Análisis de MLA/3D-MLA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

5 Las muestras a analizar se convirtieron primero en la forma de ácido libre lavando una disolución de 3-5 mg de muestra en 5 ml de cloroformo:metanol (2:1 v:v) con 2 ml de HCl 0,1 N. El sistema bifásico se agitó con vórtex, se centrifugó y la fase inferior (orgánica) se transfirió a un tubo de ensayo y se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se metiló entonces mediante tratamiento con diazometano. Brevemente, una disolución etérea de diazometano se preparó disponiendo 60-100 mg de 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG; Aldrich) en un vial de 2 dracmas (7,10 ml), añadiendo 60 µl de éter dietílico por mg de MNNG, luego añadiendo 9 µl de NaOH 5 N por 10 mg de MNNG mientras se agitaba la disolución a <-10 °C. Tras completarse la reacción, la fase de éter de color amarillo limón se secó transfiriéndola a un segundo vial que contenía varios sedimentos de NaOH y rotando, todo mientras está a <-10 °C. La muestra lavada con ácido se disolvió en 1 ml de cloroformo:metanol 4:1 (v:v), se dispuso en un baño a <-10 °C y se añadió gota a gota con agitación disolución de diazometano hasta que persistió un tono amarillo débil. El disolvente se evaporó entonces a temperatura ambiente bajo una corriente de nitrógeno y se secó adicionalmente a vacío durante al menos 30 min.

Los análisis cromatográficos se realizaron sobre una columna de fase inversa C₁₈ (Nova-Pak, 4 µm de tamaño de partícula, 8 mm x 10 cm [Waters]). Las muestras metiladas se disolvieron en cloroformo:metanol 4:1 (v/v) a una concentración de 100 µg/ml y se pasaron a través de un filtro de jeringuilla de PTFE de 0,45 µm. Normalmente se usó un volumen de inyección de 20-25 µl, seguido de elución con un gradiente lineal del 20 al 80% de isopropanol en acetonitrilo durante 60 min a una velocidad de flujo de 2 ml/min con monitorización a 210 nm.

C. Análisis del contenido de congéneres de LPS por HPLC

LPS tiende a ser un material altamente heterogéneo debido a la variabilidad en 1) el número de residuos de azúcar en el antígeno O y regiones centrales, 2) sustituciones polares en la región central y sobre los fosfatos en el lípido A, y 3) el número y localización de ácidos grasos unidos al esqueleto del lípido A. Es esta última fuente de 25 variabilidad la que es de interés con respecto al contenido de congéneres de 3D-MLA (MPL®). La hidrólisis de LPS a MLA y 3D-MLA elimina la variabilidad en el antígeno O y las regiones centrales; sin embargo, también introduce heterogeneidad adicional debido a la pérdida incontrolada de ácidos grasos ligados a O. Esto previene que el patrón de acilación en el LPS intacto se conozca con exactitud. Para superar esto se desarrolló un procedimiento en el que los fosfatos y la región central se eliminaban bajo condiciones suaves que no producían la pérdida de ácidos 30 grasos ligados a O. El lípido A desfosforilado resultante (fosforil lípido A cero, o ZPL) puede entonces analizarse por HPLC, dando una reflexión precisa del patrón de acilación en el LPS parental.

El procedimiento se llevó a cabo normalmente del siguiente modo. Se hidrolizaron entre 0,5-5,0 mg de muestra de LPS en 200 µl de ácido fluorhídrico concentrado durante 3-4 h a 27 °C. Esta reacción debe hacerse en un tubo de teflón herméticamente cerrado y en una campana extractora bien ventilada. El HF se eliminó mediante 35 evaporación bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente, y el hidrolizado se disolvió entonces en cloroformo:metanol 4:1 (v/v) y se transfirió a un tubo de ensayo de vidrio de 16 x 100 mm, y el disolvente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se suspendió en 1,0 ml de 0,1% de trietilamina usando sonicación en baño, se añadió 1,0 ml de NaOAc 40 mM y el tubo se suspendió en un baño de agua hirviendo durante 30-45 min. La reacción se inactivó enfriando en un baño de hielo y el ZPL se recuperó por extracción 40 con 5 ml de cloroformo:metanol 2:1 (v/v). La fase orgánica se transfirió a un pequeño vial de tapa roscada y el disolvente se evaporó bajo nitrógeno. El ZPL se derivatizó añadiendo 200 µl de 10 mg/ml de O-(3,5-dinitrobenzil)hidroxilamina-HCl (Regis Technologies, Inc.) en piridina, cerrando herméticamente el vial, luego incubando a 60 °C durante 3 h. La piridina se evaporó bajo nitrógeno y el residuo se secó adicionalmente a vacío durante >30 min. El residuo se suspendió entonces en 500 µl de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se cargó 45 sobre un lecho de 0,5-1,0 ml de Accell-QMA (forma de acetato; Waters) que se había equilibrado previamente en el mismo disolvente. La columna se aclaró con un total de 5,0 ml de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) en varias pequeñas porciones y el eluato se recogió en un tubo de ensayo de 16 x 100 mm. Se añadieron 2,0 ml de HCl 0,1 N al eluato, el sistema bifásico se agitó con vórtex, se centrifugó brevemente a 500-1000 x g y la fase inferior (orgánica) se transfirió a otro tubo de ensayo y se evaporó bajo nitrógeno. El residuo se disolvió en 100-300 µl 50 de cloroformo:metanol 4:1 (v/v) y se filtró a través de un filtro de jeringuilla de PTFE de 0,45 µm. El filtro se aclaró dos veces con cloroformo:metanol 4:1 (v/v) y el filtrado se evaporó bajo nitrógeno. El filtrado se recogió finalmente en 50-150 µl de cloroformo:metanol 4:1 (v/v) y se transfirió a un vial de autoinyector para análisis por HPLC. Las condiciones de HPLC fueron del siguiente modo: columna de fase inversa C₁₈ (por ejemplo, Waters), volumen de inyección de 10 µl, gradiente lineal del 20 al 80% de isopropanol en acetonitrilo durante 60 min a 55 una velocidad de flujo de 2 ml/min, monitorización a 254 nm.

Ejemplo 3 - Comparación de composición de congéneres de MLA/3D-MLA de cultivos recogidos en momentos diferentes

5 Se realizó una serie de ejecuciones en fermentador con los siguiente parámetros: 2,0 l de medio M9 (pH inicial 6,84-6,87), 2 l/min de flujo de aire, agitación a 50 rpm, 37 °C, sin control de pH. Los cultivos se monitorizaron midiendo la densidad óptica a 590 nm y se detuvieron cuando se obtuvo la fase de crecimiento deseada. Las células se procesaron y se extrajeron como se ha descrito anteriormente dando muestras de LPS que luego se hidrolizaron a MLA y 3D-MLA y se analizaron por HPLC (véanse los Ejemplos 1 y 2). Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de congéneres de MLA y 3D-MLA de células recogidas a diferentes edades.

Ejecución	Descripción	Edad del cultivo en la recogida	Tiempo en fase estacionaria	MLA		3D-MLA
				hexaacilo 3-O-desacilado	heptaacilo	hexaacilo 3-O-desacilado
A	Exponencial tardía	6,75 h	N/A	12,4%	12,2%	9,9%
B	Fase estacionaria temprana	9,5 h	~0,5 h	9,2%	6,8%	9,2%
C	Fase estacionaria tardía	15 h	~6 h	19,5%	13,2%	21,5%

10 Los datos muestran que los cultivos de R595 de *S. minnesota* alteran el patrón de acilación de su LPS durante la fase estacionaria, produciendo un aumento en el contenido global de hexaacilo 3-O-desacilado más especies de heptaacilo en MLA derivado de este LPS, y esto da lugar a su vez a contenido elevado de especies de hexaacilo 3-O-desacilado en 3D-MLA preparado a partir de este MLA.

15 **Ejemplo 4 - Comparación de la composición de congéneres de LPS de cultivos recogidos en diferentes momentos**

20 Se realizó una serie de ejecuciones en fermentador con los siguiente parámetros: 2,0 l de medio M9 (pH inicial 6,84-6,87), 2 l/min de flujo de aire, agitación a 225 rpm, 37 °C, sin control de pH. La fase de crecimiento de los cultivos se monitorizó midiendo la densidad óptica a 590 nm. Las células se procesaron y se extrajeron como se ha descrito en el Ejemplo 1 dando muestras de LPS. Las muestras de LPS se hidrolizaron a ZPL y se analizaron por HPLC como se describe en Ejemplo 2. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de congéneres de LPS de células recogidas a diferentes edades.

Ejecución	Descripción	Edad del cultivo en el momento de la recogida	Tiempo en fase estacionaria	Contenido de congéneres		
				3-O-acil-hexaacilo	hexaacilo 3-O-desacilado	heptaacilo
A	Fase estacionaria temprana	9 h	~0,5 h	76%	0%	24%
B	Fase estacionaria tardía	15 h	~6 h	48%	17%	19%

25 No se detectó componente de hexaacilo 3-O-desacilado en el LPS de las células en la fase estacionaria temprana (ejecución A). Así, la única fuente de congéneres hexaacilados en 3D-MLA preparado a partir de este LPS sería el material heptaacilado (24%). A diferencia, el LPS de células recogidas en la fase estacionaria tardía contuvo tanto especies de heptaacilo como de hexaacilo 3-O-desacilado (19% y 17%, respectivamente). Ambas de estas especies contribuirían al contenido de hexaacilo en 3D-MLA (MPL®) preparado a partir de este LPS. Fue inesperado encontrar que las células producen especies de LPS de hexaacilo 3-O-desacilado bajo ciertas condiciones.

Ejemplo de referencia 5 - Efecto de la temperatura de pre-extracción sobre la pureza de LPS de R595 de *S. minnesota*

5 Células de R595 de *S. minnesota* se cultivaron en un fermentador de 80 l (New Brunswick Scientific) usando esencialmente las mismas condiciones que se han explicado resumidamente en el Ejemplo 1. Las células se concentraron por filtración de flujo tangencial, pero no se centrifugaron, y la suspensión contuvo 51,5 mg de masa de células secas por ml. Se prepararon tres disoluciones en las que alícuotas de 150 ml de la suspensión de células se combinaron cada una con 600 ml etanol. Las disoluciones de etanol se agitaron durante 1 h a 22 °C, 37 °C y 50 °C y se filtraron. Las células se sometieron a una segunda extracción con etanol bajo las mismas condiciones, excepto que se usó 95% de etanol. Las células se recuperaron por filtración por succión y luego se extrajeron durante la noche en cloroformo:metanol 4:1 (v/v) a 50 °C. Las disoluciones se filtraron y los filtrados se evaporaron rotatoriamente a sequedad, dando las preparaciones de LPS. Las muestras de los filtrados de la primera y segunda extracción con etanol obtenidas a cada temperatura, además del LPS obtenido de las células pre-extraídas, se analizaron por cromatografía en capa fina según el procedimiento en el Ejemplo 2. Las imágenes de las placas de CCF se muestran en la Figura 1.

15 La Figura 1 muestra placas de CCF de extractos de etanol y muestras de LPS obtenidas con diferentes temperaturas durante las extracciones con etanol. La placa de la izquierda muestra, de izquierda a derecha, los extractos de etanol a temperaturas de 22 °C, 37 °C, y 50 °C. La muestra de la derecha de esta placa es una muestra de LPS auténtica. La placa a la derecha muestra el LPS obtenido de cada preparación. Las muestras en los carriles 3, 4, y 5 se corresponden con LPS de células sometidas a pre-extracciones con etanol a 22 °C, 37 °C y 50 °C, respectivamente. Las bandas pesadas a $R_f=0,6$ se corresponden con fosfolípido e impurezas de ácidos grasos. Los niveles de estas impurezas se reducen aumentando la temperatura de las extracciones con etanol, y son muy bajos en la muestra que se pre-extrajo a 50 °C.

25 Es evidente de las placas de CCF en la Figura 1 que la pre-extracción con etanol a temperaturas elevadas es eficaz en la eliminación de impurezas que de otro modo son co-extraídas con cloroformo:metanol 4:1 (v/v). La pre-extracción a 50 °C produce LPS que está ampliamente libre de estas impurezas.

Ejemplo de referencia 6 - Comparación de LPS obtenido por con y sin pre-extracción con etanol

30 Tres lotes de células de R595 de *S. minnesota* se cultivaron en un fermentador de 750 l (B. Braun) usando esencialmente las mismas condiciones que se han explicado resumidamente en el Ejemplo 1. Las células se recogieron por filtración de flujo tangencial, y una muestra de la suspensión de células se obtuvo de cada lote y se liofilizó. La masa de células se sometió a dos pre-extracciones con 90% de etanol a 50 °C durante 1 h. Las células se recuperaron por filtración de flujo tangencial entre extracciones. Las células se extrajeron luego durante la noche con cloroformo:metanol 4:1 (v/v) a reflujo. El extracto se recuperó por filtración de flujo tangencial y se evaporó a sequedad. Las muestras de células liofilizadas se extrajeron durante la noche en cloroformo:metanol 4:1 (v/v) a reflujo, y las disoluciones se filtraron y los filtrados se evaporaron a sequedad. Las muestras de LPS obtenidas con y sin pre-extracción con etanol se analizaron por CCF esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Las placas de CCF se barrieron de aproximadamente $R_f=0,01$ a 0,90 y se calculó la relación de intensidad en la región de LPS ($R_f=0,01$ a 0,20) con respecto a la intensidad total para cada muestra. Los resultados se facilitan en la Tabla 3.

Tabla 3. Pureza de LPS de células con y sin pre-extracción con etanol.

Ejecución	Número de lote	Porcentaje de intensidad total en la región de LPS ¹	
		sin pre-extracción con etanol	con sin pre-extracción con etanol
A	48020-B2698C	7	86
B	48020-C0598A	11	83
C	48020-C0598B	14	88

Nota: 1 Porcentaje de intensidad total en la región de LPS = $[(\text{intensidad en } R_f=0,01 \text{ a } 0,20)/(\text{intensidad en } R_f=0,01 \text{ a } 0,90)] \times 100$

40 Los resultados en la Tabla 3 demuestran que el LPS obtenido tras la pre-extracción de células de R595 de *S. minnesota* con 90% de etanol a 50 °C es sustancialmente más puro que el material de células sin pre-extracción.

Todos los procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden prepararse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una composición de lipopolisacárido (LPS) que comprende:
 - (a) Cultivar un cultivo de una cepa bacteriana mutante rugosa profunda en un medio;
 - (b) Mantener el cultivo en fase estacionaria durante al menos 5 h;
 - 5 (c) Recoger células del cultivo; y
 - (d) Extraer LPS de las células
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cepa bacteriana mutante rugosa profunda es del género *Salmonella*
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la cepa bacteriana mutante rugosa profunda del género *Salmonella* es de la especie *Salmonella minnesota*
- 10 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la cepa bacteriana mutante rugosa profunda de la especie *Salmonella minnesota* es la cepa R595 de *Salmonella minnesota*
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio es M9.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el mantenimiento se realiza durante entre 5 h y aproximadamente 6 h.
- 15 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el LPS puede usarse para producir un monofosforil lípido A 3-O-desacilado que tiene al menos el 20% en moles del grupo de congéneres de hexaacilo.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones a 7 que comprende además someter el LPS a hidrólisis ácida e hidrólisis básica secuenciales para formar monofosforil lípido A 3-O-desacilado.

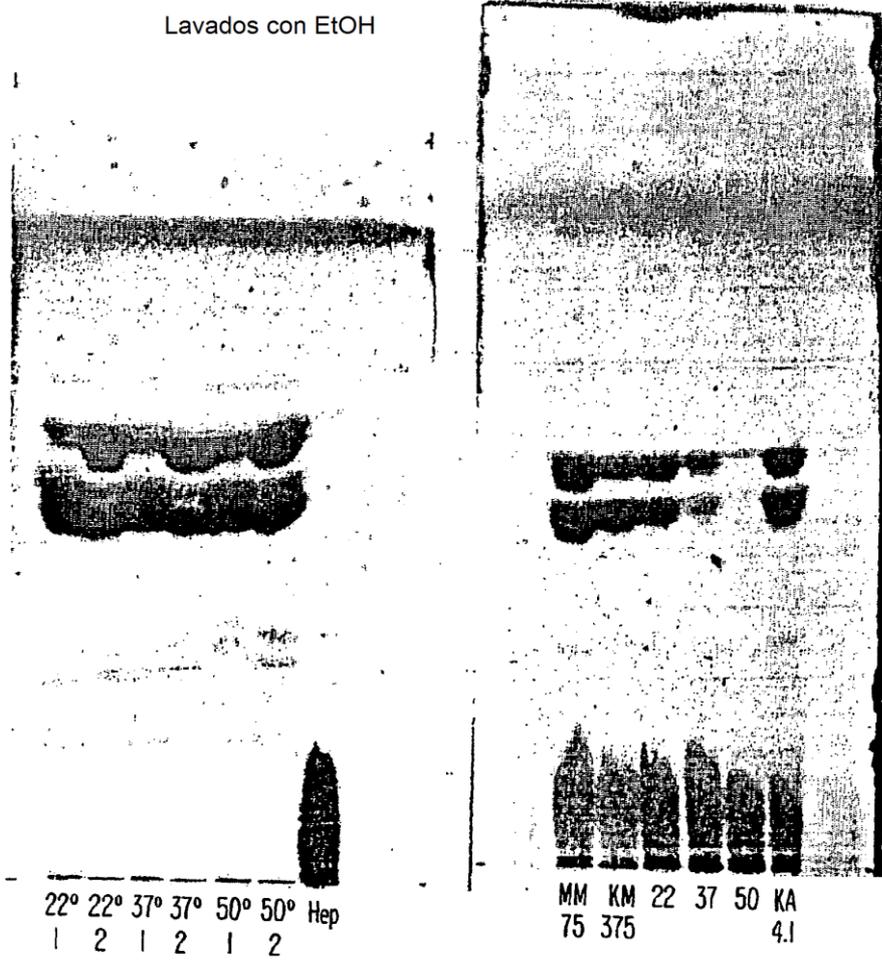


FIG. 1.