

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 415**

51 Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2013 PCT/KR2013/008048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14038879**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2013 E 13834636 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2894225**

54 Título: **Método de producción de un polisacárido capsular que tiene un serotipo neumocócico**

30 Prioridad:

07.09.2012 KR 20120099348

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

26.01.2018

73 Titular/es:

**SK CHEMICALS CO., LTD. (100.0%)
Sampyeong-dong, 310 Pangyo-ro Bundang-gu
Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-400, KR**

72 Inventor/es:

**SHIN, JIN-HWAN;
PARK, MAHN-HOON;
KIM, HUN;
NOH, MYEONG-JU y
PARK, SU-JIN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 651 415 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

Método de producción de un polisacárido capsular que tiene un serotipo neumocócico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de producción de un polisacárido capsular que tiene un serotipo neumocócico y, más en particular, a un método de producción de un polisacárido capsular que tiene un serotipo neumocócico mediante la retirada de impurezas tales como proteínas y ácidos nucleicos de un caldo de cultivo de células bacterianas que producen el serotipo neumocócico.

Antecedentes de la técnica

El neumococo (*Streptococcus pneumoniae*) es una bacteria Grampositiva que pertenece a la familia *Streptococcaceae*, dentro del orden *Lactobacillus*, y que provoca enfermedades tales como la neumonía, la bacteriemia, la otitis media y la meningitis en seres humanos. Las células de los serotipos neumocócicos tienen una cápsula que es un recubrimiento polisacárido que rodea a cada célula. Esta cápsula interfiere con la fagocitosis evitando que los anticuerpos se adhieran a las células bacterianas. Las células se han clasificado en más de 90 serotipos basándose en las características inmunológicas, se notifica que algunos de los mismos provocan enfermedades invasivas. Se identificó un total de 37 serotipos a partir de *Streptococcus pneumoniae* invasivo recogido de 1996 a 2008, y los principales serotipos, 19F > 23F > 19A > 6A > 3 > 9V > 6B en este orden de frecuencia, suponen una mayoría del 53,4 %. Se han utilizado polisacáridos capsulares de estos serotipos neumocócicos en la producción de vacunas tales como vacunas de polisacáridos y vacunas conjugadas de polisacáridos-proteínas.

Los polisacáridos capsulares utilizados en la producción de vacunas de polisacáridos y vacunas conjugadas de polisacáridos-proteínas se obtienen a partir de caldos de cultivo de células bacterianas que producen los serotipos respectivos. Cada cepa se cultiva a temperatura, pH y agitación óptimas hasta que alcanza una densidad máxima. Para obtener polisacáridos capsulares neumocócicos que no se secretan fuera del citoplasma, se realiza una lisis celular utilizando un agente de lisis tal como desoxicolato de sodio (DOC). Cuando se lisan las células, se liberan diversas proteínas y ácidos nucleicos de la cepa, junto con los polisacáridos capsulares, y éstos deben retirarse mediante un proceso de purificación post-cultivo. Para minimizar el riesgo de eventos adversos por cualquier sustancia distinta de un antígeno después de la vacunación, existen especificaciones estrictas para el contenido de proteínas y ácidos nucleicos. Por ejemplo, en el caso de Prevnar 7™, el contenido de proteínas y ácidos nucleicos en cada serotipo satisface las especificaciones del 2-5 % o menos y del 1-2 % o menos sobre la base del peso seco, respectivamente.

La Publicación de Patente Internacional N.º WO 2006/110352 divulga un método de producción de polisacáridos capsulares que comprende el cultivo de *Streptococcus pneumoniae*, la lisis celular, la precipitación de proteínas mediante la acidificación del lisado celular a un pH de menos de 5,5, la incubación sin agitación y la centrifugación y/o filtración. Además, la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2008/118752 divulga un método de producción de polisacáridos capsulares mediante la realización de una ultrafiltración y una diafiltración de un lisado celular, seguidas de un proceso de precipitación de proteínas mediante acidificación y Massaldi et al., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Academic Press, EE.UU., vol. 55, N.º 1 (2010), páginas 37-43, describe la producción de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14. Sin embargo, todos estos métodos de producción relacionados requieren el proceso de precipitación de proteínas mediante acidificación con un ajustador de pH, lo que hace que el proceso global sea complicado y además provoca la modificación del polisacárido capsular y la generación de sustancias nocivas.

50 **Descripción detallada del concepto inventivo****Problema técnico**

Los inventores han realizado diversos estudios con el fin de mejorar un método de producción de un polisacárido capsular que tenga un serotipo neumocócico. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que el pH puede reducirse a un intervalo adecuado para la precipitación de proteínas, en concreto, a un pH de 5,5 o inferior mediante productos del cultivo (especialmente, ácido láctico, etc.), cuando se realiza un cultivo adicional en las mismas condiciones sin ajuste de pH. Es decir, los inventores descubrieron que el proceso de precipitación de proteínas a través de la acidificación con un ajustador de pH puede eliminarse mediante la realización de un cultivo adicional sin ajuste de pH y realizando después la lisis celular y el proceso de precipitación de proteínas.

En consecuencia, el objetivo de la presente invención es proporcionar un método mejorado de producción de un polisacárido capsular que tenga un serotipo neumocócico.

65

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de producción de un polisacárido capsular que tiene un serotipo neumocócico, que comprende las siguientes etapas de:

- 5 (a) cultivar células bacterianas que producen un serotipo neumocócico, mientras se mantiene el pH de un caldo de cultivo en el intervalo de 7,0 a 9,4;
- (b) finalizar el cultivo de la etapa (a) en un momento entre cuando la absorbancia del caldo de cultivo permanece constante y cuando la absorbancia comienza a disminuir;
- 10 (c) realizar un cultivo adicional del caldo de cultivo obtenido de la etapa (b) sin ajuste de pH hasta que el pH del caldo de cultivo alcanza un pH de 5,5 o inferior;
- (d) añadir un agente de lisis al caldo de cultivo obtenido de la etapa (c) para lisar las células, precipitar las proteínas y retirar las proteínas precipitadas y los residuos celulares para obtener un lisado celular aclarado; y
- 15 (e) aislar y purificar el polisacárido capsular del lisado obtenido de la etapa (d) y donde no se utiliza un ajustador de pH para la precipitación de proteínas.

En el método de producción de la presente invención, el serotipo neumocócico puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F.

20 El cultivo de la etapa (a) puede realizarse a 34-38 °C con agitación a 50-150 rpm.

En una realización de la presente invención, la etapa (b) puede realizarse mediante la finalización del cultivo de la etapa (a) a las 1 a 3 horas desde el momento en el que la absorbancia del caldo de cultivo permanece constante.

25 El cultivo adicional de la etapa (c) puede realizarse a 34-38 °C con agitación a 50-150 rpm sin ajuste del pH.

El agente de lisis utilizado en la etapa (d) puede ser desoxicolato de sodio. En otra realización de la presente invención, la etapa (d) puede realizarse mediante la adición del agente de lisis al caldo de cultivo obtenido de la etapa (c) para lisar las células, incubando después el lisado celular resultante a 10-20 °C durante 3-24 horas sin agitación para precipitar las proteínas y retirando las proteínas precipitadas y los residuos celulares por centrifugación.

30 En otra realización más de la presente invención, el aislamiento y la purificación de la etapa (e) pueden incluir las siguientes etapas:

- 35 (i) filtrar el lisado obtenido de la etapa (d) utilizando un filtro de profundidad;
- (ii) concentrar un filtrado obtenido de la etapa (i), seguido de ultrafiltración y centrifugación;
- (iii) hacer reaccionar el sobrenadante obtenido de la etapa (ii) con un tensioactivo catiónico y, después, centrifugar la solución obtenida para producir un sedimento o sobrenadante que contiene polisacáridos capsulares;
- 40 (iv) hacer reaccionar los polisacáridos capsulares obtenidos de la etapa (iii) con yoduro de sodio, seguido de centrifugación, obteniendo de este modo el sobrenadante;
- (v) añadir carbón activado a la solución obtenida de la etapa (iv), seguido de filtración; y
- 45 (vi) concentrar un filtrado obtenido de la etapa (v), seguido de ultrafiltración y centrifugación, obteniendo de este modo polisacáridos capsulares.

En la realización anterior, la concentración de la etapa (ii) puede realizarse utilizando una membrana de 100 kDa y la concentración de la etapa (vi) puede realizarse utilizando una membrana de 30 kDa. Adicionalmente, el tensioactivo catiónico utilizado en la etapa (iii) puede ser bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio y puede utilizarse a una concentración del 5 ~ 3,0 %. Además, el carbón activado utilizado en la etapa (v) puede utilizarse a una concentración del 1 ~ 5 % (p/v).

Efectos ventajosos

55 En un método de producción de acuerdo con la presente invención, no se utiliza un ajustador de pH para la precipitación de proteínas. Es decir, la presente invención demostró que cuando el cultivo adicional de células bacterianas que producen un serotipo neumocócico se realiza en las mismas condiciones sin ajuste de pH, el pH puede reducirse a un intervalo adecuado para la precipitación de proteínas, en concreto, un pH de 5,5 o menor, mediante productos del cultivo (especialmente, ácido láctico, etc.). Por tanto, el método de producción de la presente invención no requiere el uso del ajustador de pH para la precipitación de proteínas, minimizando de este modo la modificación de los polisacáridos capsulares y la generación de sustancias nocivas y simplificando el proceso de producción. El polisacárido capsular que tiene el serotipo neumocócico obtenido mediante el método de producción de la presente invención puede utilizarse ventajosamente para producir vacunas de polisacáridos y vacunas conjugadas de polisacáridos-proteínas.

65

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los cambios de pH en el caldo de cultivo y las condiciones para el cultivo de células bacterianas que producen el serotipo neumocócico 3;

La FIG. 2 muestra los cambios de pH en el caldo de cultivo y las condiciones para el cultivo de células bacterianas que producen el serotipo neumocócico 6B;

La FIG. 3 muestra los cambios de pH en el caldo de cultivo y las condiciones para el cultivo de células bacterianas que producen el serotipo neumocócico 7F;

La FIG. 4 muestra los cambios de pH en el caldo de cultivo y las condiciones para el cultivo de células bacterianas que producen el serotipo neumocócico 14;

La FIG. 5 muestra los cambios de pH en el caldo de cultivo y las condiciones para el cultivo de células bacterianas que producen el serotipo neumocócico 19A; y

La FIG. 6 muestra los cambios de pH en el caldo de cultivo y las condiciones para el cultivo de células bacterianas que producen el serotipo neumocócico 23F.

Mejor modo

La presente invención proporciona un método de producción de un polisacárido capsular que tiene un serotipo neumocócico, que incluye las siguientes etapas:

(a) cultivar células bacterianas que producen un serotipo neumocócico, mientras se mantiene el pH de un caldo de cultivo en el intervalo de 7,0 a 9,4;

(b) finalizar el cultivo de la etapa (a) en un momento entre cuando la absorbancia del caldo de cultivo permanece constante y cuando la absorbancia comienza a disminuir;

(c) realizar un cultivo adicional del caldo de cultivo obtenido de la etapa (b) sin ajuste de pH hasta que el pH del caldo de cultivo alcanza un pH de 5,5 o inferior;

(d) añadir un agente de lisis al caldo de cultivo obtenido de la etapa (c) para lisar las células, precipitar las proteínas y retirar las proteínas precipitadas y los residuos celulares para obtener un lisado celular aclarado; y

(e) aislar y purificar el polisacárido capsular del lisado obtenido de la etapa (d) y donde no se utiliza un ajustador de pH para la precipitación de proteínas.

En la etapa (a) del método de producción de acuerdo con la presente invención, el serotipo neumocócico puede ser cualquier tipo de serotipo que se utilice en la producción de vacunas neumocócicas; por ejemplo, los serotipos pueden incluir el serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, pero no se limitan a los mismos. Las células bacterianas que producen los serotipos neumocócicos son conocidas en la técnica y puede utilizarse cualquier célula bacteriana conocida sin ninguna limitación (por ejemplo, véase el documento WO 2006/110381). El cultivo de la etapa (a) del método de producción de acuerdo con la presente invención puede realizarse en un medio general, tal como un medio a base de soja, mientras se mantenga el pH del caldo de cultivo en el intervalo de 7,0 a 9,4, preferentemente, de 7,2 a 8,2 mediante el uso de, por ejemplo, hidróxido de sodio. El cultivo puede realizarse en cualesquiera condiciones de cultivo conocidas, por ejemplo, a 34-38 °C con agitación a 50-150 rpm. Se proporcionan condiciones de pH adecuadas para el cultivo de siembra y el cultivo principal para la producción de serotipos representativos de *Streptococcus pneumoniae* en la siguiente Tabla 1.

[Tabla 1]

Condición de pH para cada serotipo		
2	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
3	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
4	pH 7,6 ± 0,6	pH 7,6 ± 0,6
5	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
6A	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
6B	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
7F	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
9N	pH 7,6 ± 0,6	pH 7,6 ± 0,6
9V	pH 7,6 ± 0,6	pH 7,6 ± 0,6
14	pH 7,6 ± 0,6	pH 7,6 ± 0,6
18C	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
19A	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
19F	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
22F	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
23F	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2
33F	pH 7,2 ± 0,2	pH 7,2 ± 0,2

El método de producción de acuerdo con la presente invención no requiere el uso de un ajustador de pH para la precipitación de proteínas. Es decir, los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que el pH puede reducirse a un intervalo adecuado para la precipitación de proteínas, en concreto, a un pH de 5,5 o inferior mediante los productos de cultivo (especialmente, ácido láctico, etc.), cuando se realiza un cultivo adicional en las mismas condiciones, sin ajuste del pH. Por tanto, el método de producción de la presente invención incluye realizar el cultivo adicional sin ajuste del pH después de cultivar células bacterianas que producen los serotipos neumocócicos, preferentemente, en el punto temporal cuando las células bacterianas alcanzan un crecimiento máximo, y después realizar los procesos de lisis celular y de precipitación de proteínas. Por tanto, el método de producción de la presente invención no requiere el uso de un ajustador de pH para la precipitación de proteínas, minimizando de este modo la modificación del polisacárido capsular y la generación de sustancias nocivas y simplificando el proceso de producción.

El método de producción de la presente invención, por tanto, incluye la etapa de finalizar el cultivo de la etapa (a) en un momento entre cuando la absorbancia del caldo de cultivo permanece constante y cuando la absorbancia comienza a disminuir [es decir, la etapa (b)] ; y la etapa de realizar un cultivo adicional del caldo de cultivo obtenido de la etapa (b) sin ajuste de pH hasta que el pH del caldo de cultivo alcanza un pH de 5,5 o inferior [es decir, la etapa (c)].

A medida que el cultivo se realiza de acuerdo con la etapa (a) del método de producción de la presente invención, las células bacterianas proliferan y la absorbancia [por ejemplo, la absorbancia a 590 nm (DO_{590})] del caldo de cultivo aumenta gradualmente hasta alcanzar la meseta (el máximo crecimiento) y después permanece constante (aproximadamente 7-24 horas después de comenzar el cultivo). Posteriormente, la absorbancia disminuye a las 1 a 3 horas. En una realización de la presente invención, por tanto, la etapa (b) puede mediante la finalización del cultivo de la etapa (a) a las 1 a 3 horas desde el momento cuando la absorbancia del caldo de cultivo permanece constante. El cultivo adicional de la etapa (c) puede realizarse sin ajuste de pH en las mismas condiciones que en la etapa (a), es decir, a 34-38 °C con agitación a 50-150 rpm. Cuando se realiza dicho cultivo adicional, el pH del caldo de cultivo disminuye espontáneamente a 5,5 o inferior, proporcionando de este modo un pH adecuado necesario para la precipitación de proteínas.

El método de producción de la presente invención incluye la etapa de añadir un agente de lisis al caldo de cultivo obtenido de la etapa (c) para lisar las células, precipitar las proteínas y retirar las proteínas precipitadas y los residuos celulares para obtener un lisado celular aclarado [es decir, la etapa (re)].

La lisis celular puede realizarse de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, un método divulgado en el documento WO 2006/110381, el documento WO 2008/118752, etc. Por ejemplo, la lisis celular puede realizarse utilizando desoxicolato de sodio como agente de lisis. El desoxicolato de sodio puede utilizarse a una concentración de 0,10-0,15 % (concentración después de la adición de desoxicolato de sodio), pero no se limita a ello. Como se lisan las células, los polisacáridos capsulares de los serotipos neumocócicos son liberados fuera del citoplasma. Además, la precipitación de proteínas puede realizarse mediante, por ejemplo, la incubación a 10-20 °C y la eliminación de las proteínas precipitadas y desechos de células puede realizarse por un método típico (por ejemplo, centrifugación). En una realización de la presente invención, la etapa (d) puede realizarse mediante la adición de un agente de lisis al caldo de cultivo obtenido de la etapa (c) para lisar las células, precipitando proteínas por incubación del lisado obtenido a 10-20 °C durante 3-24 horas sin agitación y la eliminación de las proteínas precipitadas y restos celulares por centrifugación.

El método de producción de la presente invención incluye la etapa de aislar y purificar el polisacárido capsular del lisado mediante la retirada de impurezas (por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos contenidos en las células) del lisado obtenido de la etapa (d) [es decir, la etapa (e)]. El aislamiento y la purificación del polisacárido capsular pueden realizarse de acuerdo con un método de purificación conocido, por ejemplo, un método divulgado en el documento WO 2006/110381 y el documento WO 2008/118752. En una realización, el aislamiento y la purificación de la etapa (e) pueden incluir las siguientes etapas:

- (i) filtrar el lisado obtenido de la etapa (d) utilizando un filtro de profundidad;
- (ii) concentrar un filtrado obtenido de la etapa (i), seguido de ultrafiltración y centrifugación;
- (iii) hacer reaccionar el sobrenadante obtenido de la etapa (ii) con un tensioactivo catiónico y, después, centrifugar la solución resultante para obtener un sedimento o sobrenadante que contiene polisacáridos capsulares;
- (iv) hacer reaccionar los polisacáridos capsulares obtenidos de la etapa (iii) con yoduro de sodio, seguido de centrifugación, obteniendo de este modo un sobrenadante;
- (v) añadir carbón activado a la solución obtenida de la etapa (iv), seguido de filtración; y
- (vi) concentrar un filtrado obtenido de la etapa (v), seguido de ultrafiltración y centrifugación, obteniendo de este modo polisacáridos capsulares.

En la realización anterior, los lisados que permanecen incluso después de la centrifugación para la retirada de las proteínas y los residuos celulares precipitados se retiran por filtración mediante el filtro de profundidad.

Adicionalmente, las proteínas y los ácidos nucleicos pueden retirarse mediante la repetición de la concentración/ultrafiltración dos veces. En una realización, la concentración de la etapa (ii) puede realizarse utilizando una membrana de 100 kDa y la concentración de la etapa (vi) puede realizarse utilizando una membrana de 30 kDa. En este proceso, la ultrafiltración también puede ser denominarse 'diafiltración'.

5 Adicionalmente, el tensioactivo catiónico utilizado en la etapa (iii) puede ser bromuro de cetiltrimetilamonio. El bromuro de cetiltrimetilamonio (bromuro de cetrimonio, bromuro de hexadecil-trimetilamonio (HB)) puede utilizarse a una concentración del 0,5-3 % (concentración después de la adición de bromuro de cetiltrimetilamonio). El tensioactivo catiónico utilizado como HB puede precipitarse y retirarse mediante el uso de yoduro de sodio. Cuando se realiza la centrifugación en la etapa (iii), puede haber presentes polisacáridos capsulares en el sedimento (por ejemplo, serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9N, 9V, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, etc.) o en el sobrenadante (por ejemplo, serotipo 7F, 14, 33F, etc.). Los polisacáridos capsulares obtenidos en forma de sedimento pueden disolverse en un disolvente apropiado (por ejemplo, solución acuosa de cloruro de sodio, etc.) y después pueden utilizarse en la etapa posterior (es decir, la reacción con yoduro de sodio). Los polisacáridos capsulares presentes en el sobrenadante pueden utilizarse en la etapa posterior (es decir, la reacción con yoduro de sodio) sin separación adicional.

Adicionalmente, el carbón activado en la etapa (v) puede utilizarse preferentemente a una concentración del 1-5 % (p/v).

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, los siguientes Ejemplos que se describen en el presente documento deben considerarse en un sentido descriptivo solamente y con fines de limitación.

25 Ejemplo

Un medio a base soja utilizado en los siguientes Ejemplos tiene la composición como en la Tabla 2 a continuación.

[Tabla 2]

Composición del medio	contenido por litro (g)
Peptona de (Soytone™, BD 243620)	28
Cloruro de sodio	3,5
Fosfato de potasio	0,7

30 Ejemplo 1. Producción de polisacáridos capsulares de los serotipos neumocócicos 3, 6B y 19A

<Preparación de banco de células>

35 Se obtuvieron reservas de las semillas respectivas que producen los serotipos neumocócicos 3, 6B y 19A de la American Type Culture Collection [ATCC]. Las cepas utilizadas en el cultivo de siembra y el cultivo principal se proporcionan en la siguiente Tabla 3.

[Tabla 3]

Serotipo	ATCC N.º
3	6303
6B	6326
19A	10357

40 Se crearon varias generaciones de reservas de semillas (generaciones F1, F2 y F3). Se produjeron dos generaciones adicionales de reservas de semillas. La primera generación adicional se cultivó a partir de un vial F3 y la generación posterior se cultivó a partir de un vial de la primera generación adicional. Los viales de semillas se almacenaron congeladas (<-70 °C) con glicerol sintético como crioconservante. Para la preparación del banco de células, todos los cultivos se cultivaron en un medio a base de soja. Antes de la congelación, las células se concentraron por centrifugación, el medio gastado se retiró y los sedimentos celulares se volvieron a suspender en un medio recién preparado que contenía un crioconservante (por ejemplo, glicerol sintético).

<Cultivo y recuperación>

50 Se utilizaron cultivos del banco de células de trabajo para inocular botellas de semillas que contenían un medio a base de soja para el cultivo. Después de alcanzar una absorbancia objetivo, la botella de siembra se usó para inocular un fermentador que contenía el medio a base de soja. El cultivo se realizó a 34-38 °C y 120 rpm mientras se mantenía el pH a aproximadamente 7,2 o superior utilizando NaOH 3 N. El muestreo se realizó cada 2-3 horas para medir la absorbancia. Cuando la absorbancia comenzó a aumentar drásticamente, el muestreo se realizó cada 0,5-1 horas y se midió la absorbancia. El cultivo finalizó aproximadamente 1 hora después de que la absorbancia

alcanzase un valor determinado y permaneciese constante. Después de la finalización del cultivo, se realizó un cultivo adicional sin ajuste de pH en las mismas condiciones de temperatura y rpm hasta que el pH alcanzó un valor de 5,5 o inferior. Después de la finalización del cultivo adicional, se añadió desoxicolato de sodio a una concentración del 0,12 % para lisar las células. El lisado obtenido de este modo se enfrió a 10-15 °C y después se incubó a la misma temperatura durante aproximadamente 3 horas sin agitación para conducir a la precipitación de proteínas. Posteriormente, el lisado resultante se centrifugó para retirar las proteínas y los residuos celulares precipitados.

<Purificación>

La solución obtenida mediante la centrifugación se filtró utilizando un filtro de profundidad para retirar las proteínas y los residuos celulares que no habían sedimentado durante la centrifugación. El filtrado resultante se concentró utilizando una membrana de 100 kDa y después la solución concentrada resultante se sometió a ultrafiltración utilizando tampón de fosfato de sodio 25 mM (pH 7,2). La ultrafiltración se realizó hasta que la conductividad del dializado alcanzó aproximadamente 3-4 mS/cm y la presión transmembrana (PTM) se fijó en 0,5-1,5 bar (50 kPa-150 kPa) o menos. Se retiraron las impurezas de la solución resultante y se añadió bromuro de cetrimonio (bromuro de hexadecil-trimetilamonio (HB)) a la solución a una concentración de aproximadamente el 1,0 % p/v, seguido de agitación durante aproximadamente 1 hora. Después, se realizó centrifugación para precipitar los polisacáridos. El sedimento obtenido de este modo se disolvió en solución acuosa aproximadamente 0,25 M de cloruro de sodio y se añadió yoduro de sodio (NaI) a los mismos a una concentración de aproximadamente el 0,5 % p/v. Esta solución se centrifugó para recuperar el sobrenadante y se añadió carbón activado lentamente a la solución resultante a una concentración de aproximadamente el 2,0 % p/v, mientras que se agitaba, seguido de agitación durante aproximadamente 1 hora y filtración. El filtrado resultante se concentró utilizando una membrana de 30 kDa y después la solución concentrada se sometió a ultrafiltración utilizando aproximadamente 10 veces el volumen de agua triplemente destilada. La ultrafiltración se realizó hasta que la conductividad del dializado alcanzó aproximadamente 10 μ S/cm y la presión transmembrana (TMP) se fijó en 0,5-1,5 bar (50 kPa-150 kPa) o menos. La solución concentrada resultante se sometió a filtración estéril y se almacenó congelada a -20 °C o menos.

El contenido de proteína total, el contenido de ácido nucleico total, el contenido de polisacárido total y el rendimiento de la purificación evaluados en cada etapa de purificación se proporcionan en las siguientes Tablas 4 a 6.

[Tabla 4]

Contenido de proteína, contenido de ácido nucleico y recuperación de polisacárido capsular del serotipo 3						
	Contenido de proteína total (mg)	Relación de contenido de proteína a polisacárido (%)	Contenido de ácido nucleico (mg)	Relación de contenido de ácido nucleico a polisacárido (%)	Contenido de polisacárido total (mg)	Rendimiento de purificación (%)
Filtro de profundidad	581320,00	354,46	27354,00	16,68	164000,00	100,00
Concentración/ultrafiltración 100 kDa	6829,00	5,57	601,60	0,49	122.600,00	74,76
CTAB/NaI	7322,00	7,44	204,00	0,21	98400,00	60,00
Carbón activado	412,00	0,45	58,80	0,06	91600,00	55,85
Concentración/ultrafiltración 30 kDa	352,50	0,44	28,20	0,04	80400,00	49,30

[Tabla 5]

Contenido de proteína, contenido de ácido nucleico y recuperación de polisacárido capsular del serotipo 6B						
	Contenido de proteína total (mg)	Relación de contenido de proteína a polisacárido (%)	Contenido de ácido nucleico (mg)	Relación de contenido de ácido nucleico a polisacárido (%)	Contenido de polisacárido total (mg)	Rendimiento de purificación (%)
Filtro de profundidad	137280,00	65,37	4872,40	2,32	210000,00	100,00
Concentración/ultrafiltración 100 kDa	8986,00	4,59	576,26	0,29	195800,00	93,24
CTAB/NaI	7030,00	4,30	352,06	0,22	163600,00	77,90
Carbón activado	1376,00	0,93	76,96	0,05	148400,00	70,67
Concentración/ultrafiltración 30 kDa	843,00	0,70	43,23	0,04	120000,00	67,57

[Tabla 6]

Contenido de proteína, contenido de ácido nucleico y recuperación de polisacárido capsular del serotipo 19A						
	Contenido de proteína total (mg)	Relación de contenido de proteína a polisacárido (%)	Contenido de ácido nucleico (mg)	Relación de contenido de ácido nucleico a polisacárido (%)	Contenido de polisacárido total (mg)	Rendimiento de purificación (%)
Filtro de profundidad	1735640,00	2479,49	5053,30	7,22	70000,00	100,00
Concentración/ultrafiltración 100 kDa	10288,00	16,87	252,56	0,41	61000,00	87,14
CTAB/Nal	5528,00	10,31	593,54	1,11	53600,00	76,57
Carbón activado	12,00	0,03	0,39	ND**	42400,00	60,57
Concentración/ultrafiltración 30 kDa	8,00	0,02	0,06	ND	44650,00	60,86
ND*. No detectado						

Los resultados de las Tablas 4 a 6 demostraron que los polisacáridos capsulares obtenidos mediante el método de producción de acuerdo con la presente invención satisficieron un patrón para el contenido de proteína residual sin ningún proceso de acidificación separado, y las tasas de recuperación de los polisacáridos capsulares también fueron del 49 % o más (polisacárido capsular serotipo 3), del 65 % o más (polisacárido capsular serotipo 6B) y del 60 % o más (polisacárido capsular serotipo 19A), respectivamente. Por tanto, el método de producción de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para producir eficazmente polisacáridos capsulares mediante el proceso simplificado.

Ejemplo 2. Producción de polisacáridos capsulares de los serotipos neumocócicos 7F y 14

<Preparación del banco de células>

Se obtuvieron reservas de las semillas respectivas que producen los serotipos neumocócicos 7F y 14 de la American Type Culture Collection [ATCC]. Las cepas utilizadas en el cultivo de siembra y el cultivo principal se proporcionan en la siguiente Tabla 7.

[Tabla 7]

Serotipo	ATCC N.º
7F	10351
14	6314

Se crearon varias generaciones de reservas de semillas (generaciones F1, F2 y F3). Se produjeron dos generaciones adicionales de reservas de semillas. La primera generación adicional se cultivó a partir de un vial F3 y la generación posterior se cultivó a partir de un vial de la primera generación adicional. Los viales de semillas se almacenaron congeladas (<-70 °C) con glicerol sintético como crioconservante. Para la preparación del banco de células, todos los cultivos se cultivaron en un medio a base de soja. Antes de la congelación, las células se concentraron por centrifugación, el medio gastado se retiró y los sedimentos celulares se volvieron a suspender en un medio recién preparado que contenía un crioconservante (por ejemplo, glicerol sintético).

<Cultivo y recuperación>

Se utilizaron cultivos del banco de células de trabajo para inocular botellas de semillas que contenían un medio a base de soja para el cultivo. Después de alcanzar una absorbancia objetivo, la botella de siembra se usó para inocular un fermentador que contenía el medio a base de soja. El cultivo se realizó a 34-38 °C y 120 rpm mientras se mantenía el pH a aproximadamente 7,2 o superior utilizando NaOH 3 N. El muestreo se realizó cada 2-3 horas para medir la absorbancia. Cuando la absorbancia comenzó a aumentar drásticamente, el muestreo se realizó cada 0,5~1 horas para medir la absorbancia. El cultivo finalizó aproximadamente 1 hora después de que la absorbancia alcanzase un valor determinado y permaneciese constante. Después de la finalización del cultivo, se realizó un cultivo adicional sin ajuste de pH en las mismas condiciones de temperatura y rpm hasta que el pH alcanzó un valor de 5,5 o inferior. Después de la finalización del cultivo adicional, se añadió desoxicolato de sodio a una concentración del 0,12 % para lisar las células. Los lisados obtenidos de este modo se enfriaron a 10~15 °C y después se incubaron a la misma temperatura durante aproximadamente 3 horas sin agitación para conducir a la precipitación de proteínas. Posteriormente, el lisado resultante se centrifugó para retirar las proteínas y los residuos celulares precipitados.

<Purificación>

La solución obtenida mediante la centrifugación se filtró utilizando un filtro de profundidad para retirar las proteínas y los residuos celulares que no habían sedimentado durante la centrifugación. El filtrado resultante se concentró utilizando una membrana de 100 kDa y después la solución concentrada resultante se sometió a ultrafiltración utilizando tampón de fosfato de sodio 25 mM (pH 7,2). La ultrafiltración se realizó hasta que la conductividad del dializado alcanzó aproximadamente 3-4 mS/cm y la presión transmembrana (PTM) se fijó en 0,5-1,5 bar (50 kPa-150 kPa) o menos. Se retiraron las impurezas de la solución resultante y se añadió bromuro de cetrimonio (bromuro de hexadecil-trimetilamonio (HB)) a una concentración de aproximadamente el 1,0 % p/v seguido de agitación durante aproximadamente 1 hora y centrifugación para recuperar el sobrenadante. Después, se añadió yoduro de sodio (NaI) al mismo a una concentración de aproximadamente el 0,5 % p/v. La solución obtenida se centrifugó para recuperar el sobrenadante y se añadió carbón activado lentamente a la solución resultante a una concentración de aproximadamente el 2,0 % p/v, mientras que se agitaba, seguido de agitación durante aproximadamente 1 hora y filtración. El filtrado resultante se concentró utilizando una membrana de 30 kDa y después la solución concentrada se sometió a ultrafiltración utilizando aproximadamente 10 veces el volumen de agua triplemente destilada. La ultrafiltración se realizó hasta que la conductividad del dializado alcanzó aproximadamente 10 µs/cm y la presión transmembrana (TMP) se fijó en 0,5-1,5 bar (50 kPa~150 kPa) o menos. La solución concentrada resultante se sometió a filtración estéril y se almacenó congelada a -20 °C o menos.

El contenido de proteína total, el contenido de ácido nucleico total, el contenido de polisacárido total y el rendimiento de la purificación evaluados en cada etapa de purificación se proporcionan en las siguientes Tablas 8 a 9.

[Tabla 8]

Contenido de proteína, contenido de ácido nucleico y recuperación de polisacárido capsular del serotipo 7F						
	Contenido de proteína total (mg)	Relación de contenido de proteína a polisacárido (%)	Contenido de ácido nucleico (mg)	Relación de contenido de ácido nucleico a polisacárido (%)	Contenido de polisacárido total (mg)	Rendimiento de purificación (%)
Filtro de profundidad	1861130,00	1604,42	4325,00	3,73	116000,00	100,00
Concentración/ultrafiltración 100 kDa	21352,00	21,39	546,80	0,55	99800,00	86,03
CTAB/NaI	5962,00	6,47	565,70	0,61	92200,00	79,48
Carbón activado	428,00	0,50	269,67	0,32	85200,00	73,45
Concentración/ultrafiltración 30 kDa	259,00	0,42	21,30	0,03	61300,00	60,26

[Tabla 9]

Contenido de proteína, contenido de ácido nucleico y recuperación de polisacárido capsular del serotipo 14						
	Contenido de proteína total (mg)	Relación de contenido de proteína a polisacárido (%)	Contenido de ácido nucleico (mg)	Relación de contenido de ácido nucleico a polisacárido (%)	Contenido de polisacárido total (mg)	Rendimiento de purificación (%)
Filtro de profundidad	138480,00	121,47	6609,40	5,80	114000,00	100,00
Concentración/ultrafiltración 100 kDa	10624,00	12,92	1369,61	1,67	82200,00	72,11
CTAB/NaI	3706,00	4,10	491,22	0,54	90400,00	79,30
Carbón activado	656,00	0,99	274,56	0,42	66000,00	57,89
Concentración/ultrafiltración 30 kDa	209,00	0,41	68,09	0,13	50490,00	55,87

Los resultados de las Tablas 8 y 9 demostraron que los polisacáridos capsulares obtenidos mediante el método de producción de acuerdo con la presente invención satisficieron un patrón para el contenido de proteína residual sin ningún proceso de acidificación separado, y las tasas de recuperación de los polisacáridos capsulares también fueron del 60 % o más (polisacárido capsular serotipo 7F) y del 55 % o más (polisacárido capsular serotipo 14), respectivamente. Por tanto, el método de producción de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para producir eficazmente polisacáridos capsulares mediante el proceso simplificado.

Ejemplo 3. Producción de polisacáridos capsulares del serotipo neumocócico 23F

<Preparación de banco de células>

5 Se obtuvo una reserva de semillas que produce el serotipo neumocócico 23F de la American Type Culture Collection [ATCC, N.º 6323]. Se crearon varias generaciones de reservas de semillas (generaciones F1, F2 y F3). Se produjeron dos generaciones adicionales de reservas de semillas. La primera generación adicional se cultivó a partir de un vial F3 y la generación posterior se cultivó a partir de un vial de la primera generación adicional. Los viales de semillas se almacenaron congeladas (<-70 °C) con glicerol sintético como crioprotector. Para la preparación del
10 banco de células, todos los cultivos se cultivaron en un medio a base de soja. Antes de la congelación, las células se concentraron por centrifugación, el medio gastado se retiró y los sedimentos celulares se volvieron a suspender en un medio recién preparado que contenía un crioprotector (por ejemplo, glicerol sintético).

<Cultivo y recuperación>

15 Se utilizó un cultivo del banco de células de trabajo para inocular una botella de semillas que contenía un medio a base de soja para el cultivo. Después de alcanzar una absorbancia objetivo, la botella de siembra se usó para inocular un fermentador que contenía el medio a base de soja. El cultivo se realizó a 34-38 °C y 120 rpm mientras se mantenía el pH a aproximadamente 7,2 o superior utilizando NaOH 3 N. El muestreo se realizó cada 2-3 horas para
20 medir la absorbancia. Cuando la absorbancia comenzó a aumentar drásticamente, el muestreo se realizó cada 0,5~1 hora para medir la absorbancia. El cultivo finalizó aproximadamente 1 hora después de que la absorbancia alcanzase un valor determinado y permaneciese constante. Después de la finalización del cultivo, se realizó un cultivo adicional sin ajuste de pH en las mismas condiciones de temperatura y rpm hasta que el pH alcanzó un valor de 5,5 o inferior. Después de la finalización del cultivo adicional, se añadió desoxicolato de sodio a una
25 concentración del 0,12 % para lisar las células. El lisado obtenido de este modo se enfrió a 10~15 °C y después se incubó a la misma temperatura durante aproximadamente 3 horas sin agitación para conducir a la precipitación de proteínas. Posteriormente, el lisado resultante se centrifugó para retirar las proteínas y los residuos celulares precipitados.

30 <Purificación>

La solución obtenida mediante la centrifugación se filtró utilizando un filtro de profundidad para retirar las proteínas y los residuos celulares que no habían sedimentado durante la centrifugación. El filtrado resultante se concentró utilizando una membrana de 100 kDa y después la solución concentrada resultante se sometió a ultrafiltración utilizando tampón de fosfato de sodio 25 mM (pH 7,2). La ultrafiltración se realizó hasta que la conductividad del dializado alcanzó aproximadamente 3~4 mS/cm y la presión transmembrana (PTM) se fijó en 0,5~1,5 bar (50 kPa-150 kPa) o menos. Se retiraron las impurezas de la solución resultante y se añadió bromuro de cetrimonio (bromuro de hexadecil-trimetilamonio (HB)) a una concentración de aproximadamente el 2,5 % p/v seguido de agitación durante aproximadamente 1 hora y centrifugación para precipitar los polisacáridos. El sedimento obtenido de este
40 modo se disolvió en solución acuosa aproximadamente 0,25 M de cloruro de sodio y se añadió yoduro de sodio (NaI) a los mismos a una concentración de aproximadamente el 0,5 % p/v. Esta solución se centrifugó para recuperar el sobrenadante y se añadió carbón activado lentamente a la solución resultante a una concentración de aproximadamente el 2,0 % p/v, mientras que se agitaba, seguido de agitación durante aproximadamente 1 hora y filtración. El filtrado resultante se concentró utilizando una membrana de 30 kDa y después la solución concentrada se sometió a ultrafiltración utilizando aproximadamente 10 veces el volumen de agua triplemente destilada. La ultrafiltración se realizó hasta que la conductividad del dializado alcanzó aproximadamente 10 µs/cm y la presión transmembrana (TMP) se fijó en 0,5~1,5 bar (50 kPa~150 kPa) o menos. La solución concentrada resultante se sometió a filtración estéril y se almacenó congelada a -20 °C o menos.

50 El contenido de proteína total, el contenido de ácido nucleico total, el contenido de polisacárido total y el rendimiento de la purificación evaluados en cada etapa de purificación se proporcionan en la siguiente Tabla 10.

[Tabla 10]

Contenido de proteína, contenido de ácido nucleico y recuperación de polisacárido capsular del serotipo 19A						
	Contenido de proteína total (mg)	Relación de contenido de proteína a polisacárido (%)	Contenido de ácido nucleico (mg)	Relación de contenido de ácido nucleico a polisacárido (%)	Contenido de polisacárido total (mg)	Rendimiento de purificación (%)
Filtro de profundidad	1667780,00	1437,74	5740,00	4,95	116000,00	100,00
Concentración/ultrafiltración 100 kDa	17798,00	17,28	442,90	0,43	103000,00	88,79
CTAB/NaI	7678,00	9,23	299,00	0,36	83200,00	71,72
Carbón activado	ND*	ND*	137,20	0,18	77600,00	66,90

Contenido de proteína, contenido de ácido nucleico y recuperación de polisacárido capsular del serotipo 19A						
	Contenido de proteína total (mg)	Relación de contenido de proteína a polisacárido (%)	Contenido de ácido nucleico (mg)	Relación de contenido de ácido nucleico a polisacárido (%)	Contenido de polisacárido total (mg)	Rendimiento de purificación (%)
Concentración/ultrafiltración 30 kDa	ND*	ND*	5,605	0,01	55860,00	64,53
ND*. No detectado						

5 Los resultados de la Tabla 10 demostraron que el polisacárido capsular serotipo 23F obtenido mediante el método de producción de acuerdo con la presente invención satisfizo un patrón para el contenido de proteína residual sin el empleo de un proceso de acidificación adicional, y la tasa de recuperación del polisacárido capsular también fue del 60 % o más. Por tanto, el método de producción de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para producir eficazmente polisacáridos capsulares mediante el proceso simplificado.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un polisacárido capsular que tiene un serotipo neumocócico, comprendiendo el método:
- 5 (a) cultivar células bacterianas que producen un serotipo neumocócico mientras se mantiene el pH de un caldo de cultivo en el intervalo de 7,0 a 9,4;
- (b) finalizar el cultivo de la etapa (a) en un momento entre cuando la absorbancia del caldo de cultivo permanece constante y cuando la absorbancia comienza a disminuir;
- 10 (c) realizar un cultivo adicional del caldo de cultivo de la etapa (b) sin ajuste de pH hasta que el pH del caldo de cultivo alcanza un pH de 5,5 o inferior;
- (d) añadir un agente de lisis al caldo de cultivo obtenido de la etapa (c) para lisar las células, precipitar las proteínas y retirar las proteínas precipitadas y los residuos celulares para obtener un lisado celular aclarado; y
- 15 (e) aislar y purificar el polisacárido capsular del lisado obtenido de la etapa (d), donde no se utiliza un ajustador de pH para la precipitación de proteínas.
2. El método de la reivindicación 1, donde el serotipo neumocócico es 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, donde el cultivo de la etapa (a) se realiza a 34-38 °C con agitación a 50-150 rpm.
4. El método de la reivindicación 1, donde la etapa (b) se realiza mediante la finalización del cultivo de la etapa (a) a las 1 a 3 horas desde el momento en el que la absorbancia del caldo de cultivo permanece constante.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, donde el cultivo adicional de la etapa (c) se realiza a 34-38 °C con agitación a 50-150 rpm sin ajuste del pH.
6. El método de la reivindicación 1, donde el agente de lisis utilizado en la etapa (d) es desoxicolato de sodio.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, donde la etapa (d) se realiza mediante la adición del agente de lisis al caldo de cultivo obtenido de la etapa (c) para lisar las células, incubando después el lisado celular resultante a 10-20 °C durante 3-24 horas sin agitación para precipitar las proteínas y retirando las proteínas precipitadas y los restos celulares por centrifugación.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, donde el aislamiento y la purificación de la etapa (e) comprenden:
- (i) filtrar el lisado obtenido de la etapa (d) utilizando un filtro de profundidad;
- (ii) concentrar un filtrado obtenido de la etapa (i), seguido de ultrafiltración y centrifugación;
- 40 (iii) hacer reaccionar un sobrenadante obtenido de la etapa (ii) con un tensioactivo catiónico y, después, centrifugar la solución resultante para obtener un sedimento o sobrenadante que contiene polisacáridos capsulares;
- (iv) hacer reaccionar los polisacáridos capsulares obtenidos de la etapa (iii) con yoduro de sodio, seguido de centrifugación, obteniendo de este modo un sobrenadante;
- 45 (v) añadir carbón activado a la solución obtenida de la etapa (iv), seguido de filtración; y
- (vi) concentrar un filtrado obtenido de la etapa (v), seguido de ultrafiltración y centrifugación, obteniendo de este modo polisacáridos capsulares.
9. El método de la reivindicación 8, donde la concentración de la etapa (ii) se realiza utilizando una membrana de 100 kDa.
- 50 10. El método de la reivindicación 8, donde la concentración de la etapa (vi) se realiza utilizando una membrana de 30 kDa.
11. El método de la reivindicación 8, donde el tensioactivo catiónico utilizado en la etapa (iii) es bromuro de cetiltrimetilamonio.
- 55 12. El método de la reivindicación 11, donde el bromuro de cetiltrimetilamonio se utiliza a una concentración del 0,5~3,0 %.
- 60 13. El método de la reivindicación 8, donde el carbón activado en la etapa (v) se utiliza a una concentración del 1-5 % (p/v).

FIG. 1

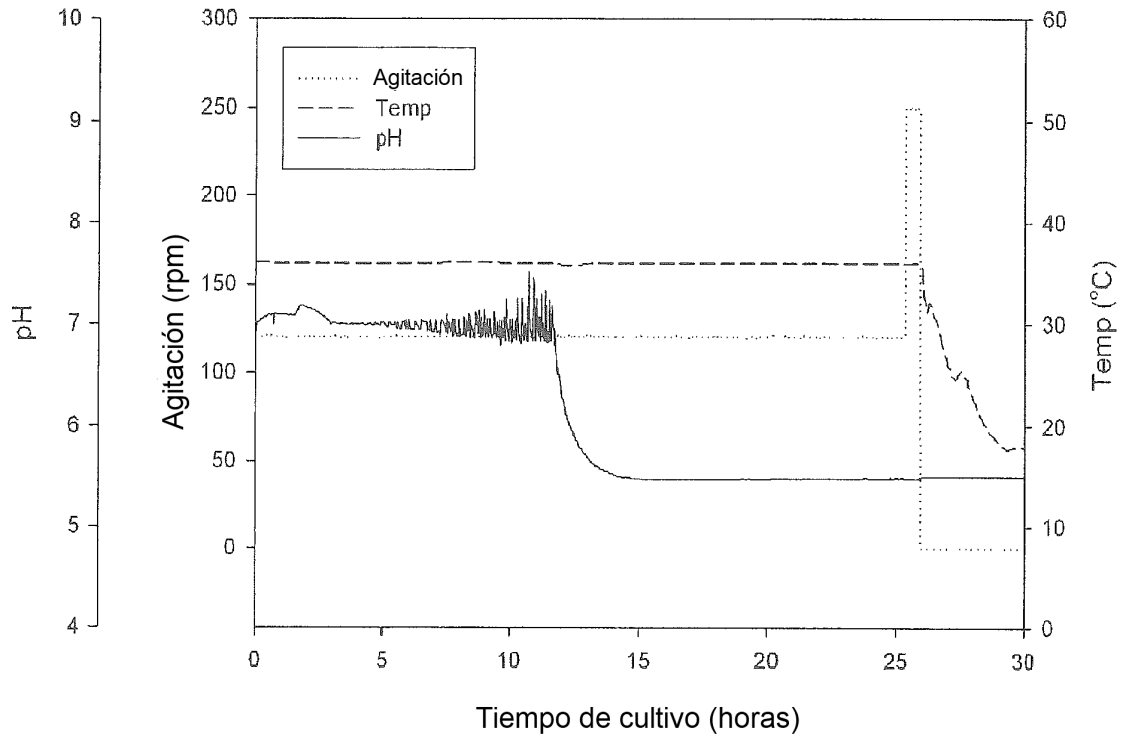


FIG. 2

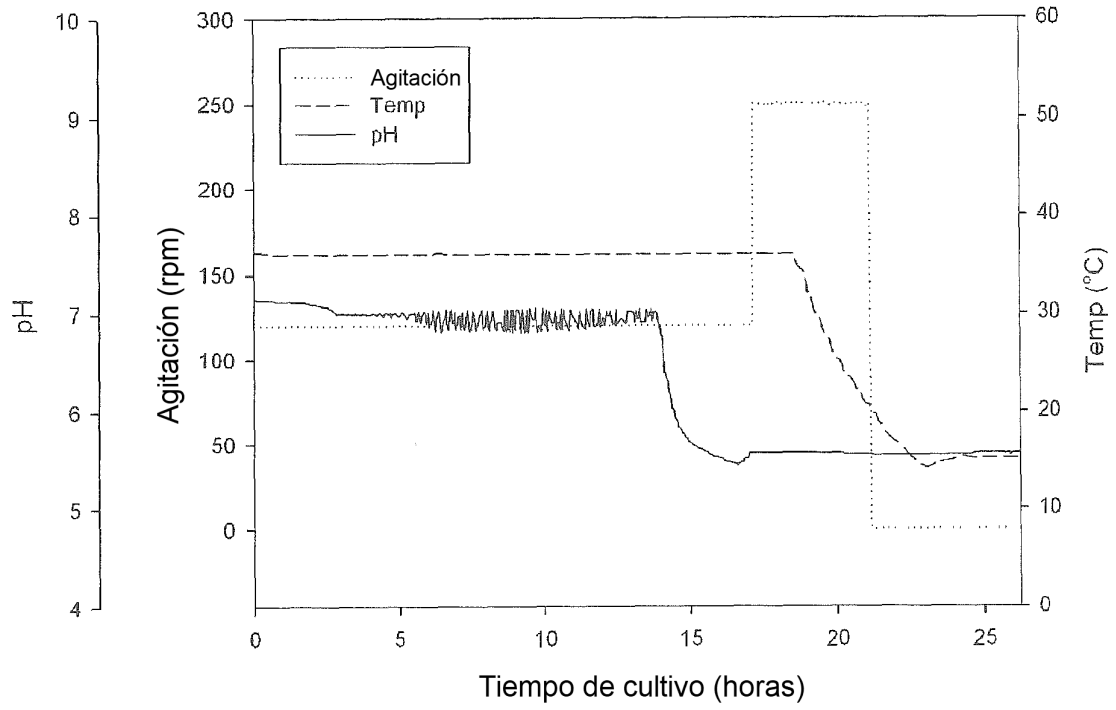


FIG. 3

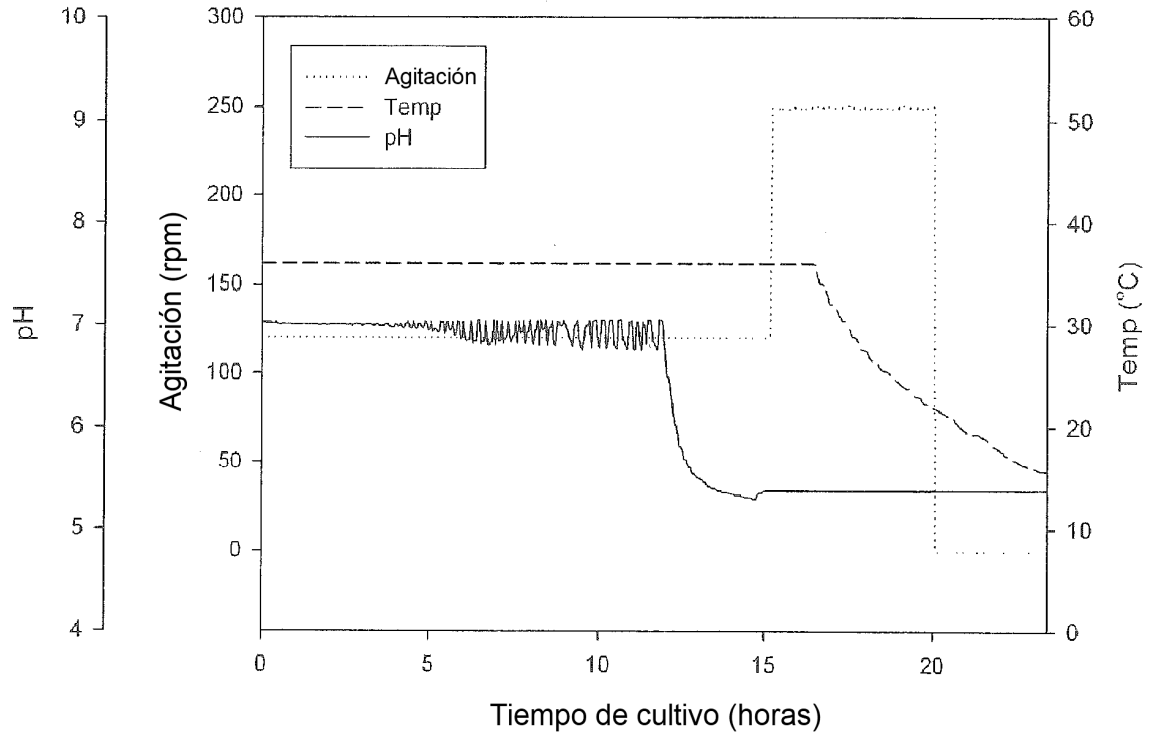


FIG. 4

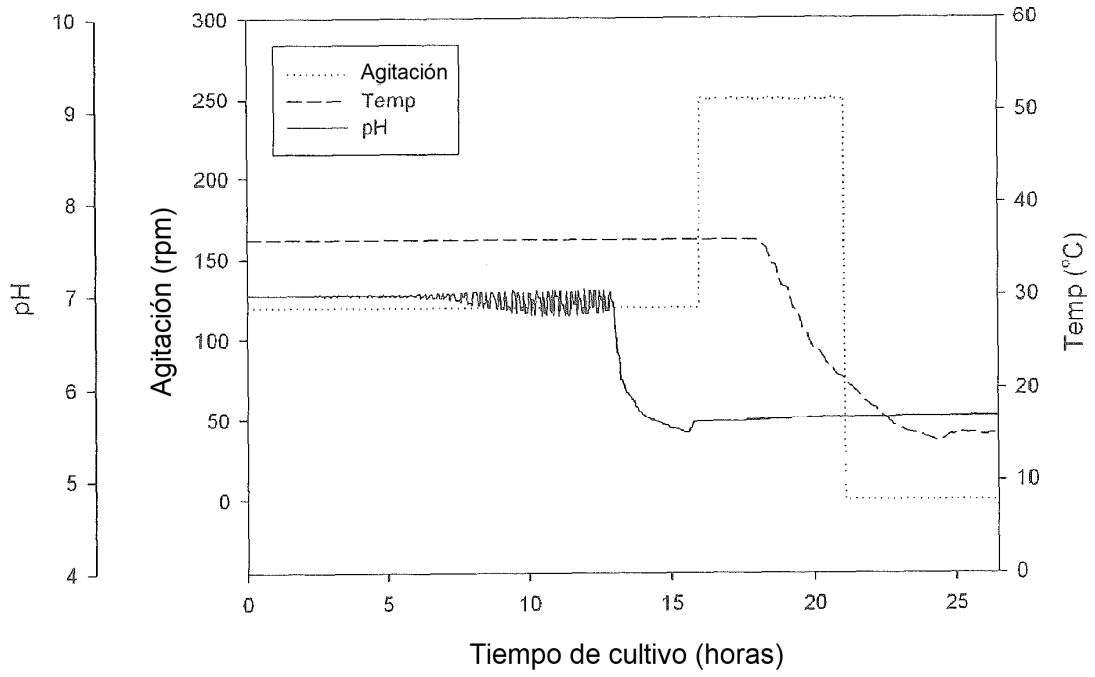


FIG. 5

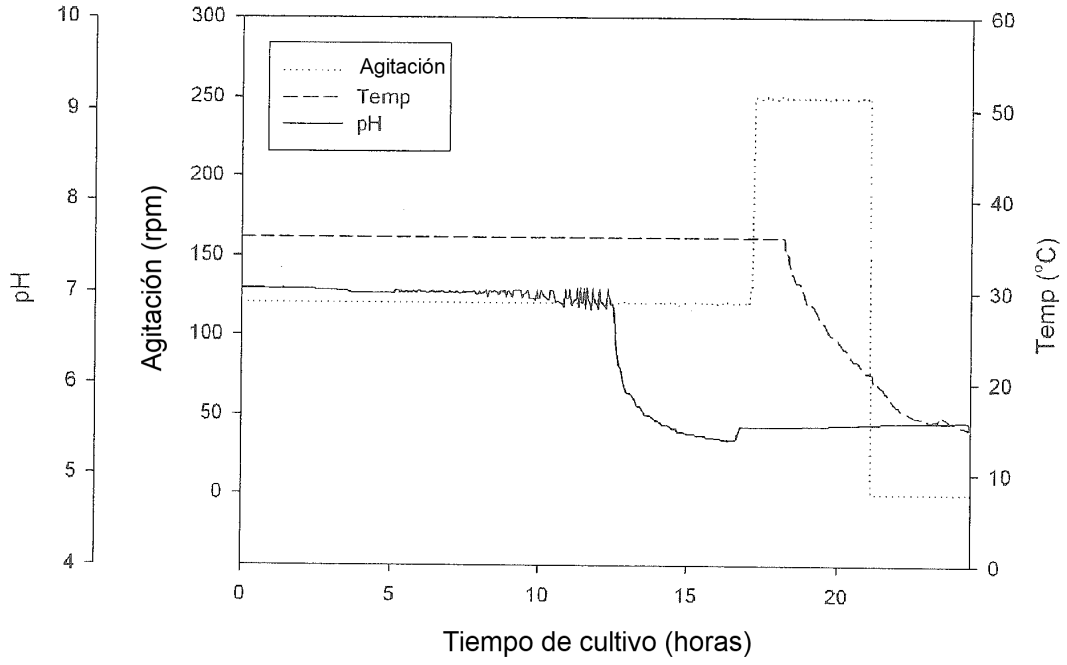


FIG. 6

