

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 698**

51 Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2009 PCT/US2009/068429**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10080486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09795862 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2379734**

54 Título: **Procedimiento de control del peso molecular del polisacárido del serotipo 19A de Streptococcus pneumoniae**

30 Prioridad:

18.12.2008 US 138563 P

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

07.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CRINEAN, JEAN HEATHER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 666 698 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de control del peso molecular del polisacárido del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*

Campo de la invención

5 La invención se refiere a procedimientos para aumentar el peso molecular de polisacáridos capsulares aislados del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* controlando el momento de recolección.

Antecedentes

10 En la preparación de vacunas neumocócicas conjugadas multivalentes dirigidas a la prevención de enfermedades invasivas producidas por el organismo *Streptococcus pneumoniae* (también conocido como neumococo), se cultivan serotipos de *Streptococcus pneumoniae* para suministrar polisacáridos necesarios para producir la vacuna. Las células se cultivan en fermentadores con lisis inducida al final de la fermentación por adición de desoxicolato sódico o un agente de lisis alternativo. El caldo de lisado se colecta entonces para purificación corriente abajo y la recuperación del polisacárido capsular que rodea las células bacterianas. Después de la conjugación con un vehículo proteico, el polisacárido se incluye en el producto vacunal final y confiere inmunidad en la población diana de la vacuna para los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados.

15 El tamaño del polisacárido es un atributo de calidad que se ensaya en cada lote de preparación y debe controlarse apropiadamente. Con respecto a los polisacáridos del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*, el tamaño del polisacárido puede estar afectado por parámetros tales como la fermentación, pH, temperatura de fermentación, y temperaturas de mantenimiento. Además, se produce una degradación térmica de los polisacáridos 19A a lo largo de los procedimientos de fermentación/recuperación y purificación, que proporciona un desafío adicional para
20 afrontar y controlar satisfactoriamente distintos parámetros cuando se aumenta la escala de los procedimientos de producción para la fabricación a gran escala de polisacáridos 19A.

En consecuencia, se necesitan procedimientos mejorados para la recuperación de polisacáridos capsulares del serotipo 19A de alto peso molecular de los lisados de *Streptococcus pneumoniae*.

25 El documento WO2006110352 desvela un procedimiento para la reducción del contenido proteico y la conservación del contenido en polisacárido capsular en un complejo de caldo de lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* antes de la purificación.

El documento WO2008118752 desvela un procedimiento abreviado para la producción de una solución que contiene sustancialmente polisacáridos capsulares purificados a partir de un caldo de lisado celular de *Streptococcus pneumoniae*.

Breve resumen de la invención

30 Se proporcionan procedimientos mejorados para la recuperación de polisacáridos capsulares del serotipo 19A de alto peso molecular a partir de lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae*. En un procedimiento, se fermenta durante menos de 6 horas un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen polisacáridos capsulares del serotipo 19A, antes de que las células bacterianas se lisen y se recolecten los
35 polisacáridos capsulares. En consecuencia, en una realización de la invención, el procedimiento incluye las etapas de: 1) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen polisacáridos capsulares del serotipo 19A; 2) fermentar el cultivo de fermentación durante menos de 6 horas; 3) lisar las células bacterianas del cultivo de fermentación; y 4) aislar los polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* a partir del cultivo de fermentación; de esta manera se produce una solución que
40 contiene polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* aislados de alto peso molecular, en el que el peso molecular del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* aislado es al menos de 480 kDa. En una realización particular, el cultivo de fermentación se fermenta durante menos de 5 horas. En una realización adicional, el cultivo de fermentación se fermenta durante menos de 4 horas. En otra realización, el cultivo de fermentación se fermenta durante entre 3 horas y 6 horas.

45 En otra realización de la presente invención, el procedimiento también implica el suministro de CO₂ a un cultivo de fermentación de células bacterianas que producen polisacáridos del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*. En consecuencia, en una realización el procedimiento de la presente invención incluye las etapas de: 1) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen polisacáridos capsulares del serotipo 19A; 2) suministrar CO₂ al cultivo de fermentación; 3) fermentar el cultivo de fermentación durante
50 menos de 6 horas; 4) lisar las células bacterianas del cultivo de fermentación; y 5) aislar los polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* a partir del cultivo de fermentación; de manera que se produce una solución que contiene polisacáridos capsulares aislados del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* de alto peso molecular, el peso molecular del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* aislado tiene al menos 480 kDa. En una realización particular, el suministro de CO₂ al cultivo de fermentación incluye la adición de un ion de bicarbonato (HCO₃⁻) al cultivo de fermentación, por ejemplo, añadiendo NaHCO₃ (bicarbonato sódico) al cultivo de
55 fermentación. En una realización adicional, el suplemento de CO₂ al cultivo de fermentación incluye la adición de un ion carbonato (CO₃²⁻) al cultivo de fermentación, por ejemplo, añadiendo Na₂CO₃ (carbonato sódico) al cultivo de fermentación. En otra realización, el suministro de CO₂ al cultivo de fermentación incluye una primera adición de

NaHCO₃ y una segunda adición de Na₂CO₃. En otra realización más, el suministro de CO₂ al cultivo de fermentación incluye el depósito de CO₂ sobre el cultivo de fermentación.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a una solución que contiene polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* de alto peso molecular, en la que la solución se produce por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la densidad óptica (DO), niveles de bases y glucosa durante la fase de fermentación con Na₂CO₃ como base de titulación de estudios de laboratorio a escala 3 l. La base en gramos se divide entre 10 con fines de representación.

La Figura 2 muestra la densidad óptica (DO), niveles de bases y glucosa durante la fase de fermentación con NaOH como base de titulación de estudios de laboratorio a escala 3 l. La base en gramos se divide entre 10 con fines de representación.

La Figura 3 muestra los resultados de proteína y polisacárido totales a diferentes ajustes de pH para alimentaciones de bases alternas de Na₂CO₃ o NaOH.

La Figura 4 muestra el peso en función del momento de recolección de la fermentación en la producción de polisacáridos 19A.

La Figura 5 muestra el consumo de bases específicas por tiempo por densidad óptica (DO) en función del momento de recolección en la producción de polisacáridos 19A. La base en gramos se divide entre 10 con fines de representación.

La Figura 6 muestra el peso molecular en función de la utilización de una base específica en la producción de polisacáridos 19A.

Descripción detallada de la invención

Los *Streptococcus pneumoniae* son cocos Grampositivos, con forma de lanceta que se ven habitualmente en parejas (diplococos), pero también en cadenas cortas o en células únicas. Crecen rápidamente en placas de agar sangre con colonias brillantes y presentan alfa hemólisis a menos de que se cultiven anaeróbicamente donde presentan beta hemólisis. Las células de la mayoría de los serotipos neumocócicos tienen una cápsula que es un polisacárido que reviste rodeando cada célula. Esta cápsula es un determinante de virulencia en seres humanos, ya que interfiere la fagocitosis impidiendo que los anticuerpos se adhieran a las células bacterianas. Actualmente se han identificado más de 90 serotipos capsulares neumocócicos, contando los 23 serotipos más comunes en aproximadamente el 90 % de las enfermedades invasivas en todo el mundo.

Como vacuna, el revestimiento de polisacárido neumocócico puede conferir un grado razonable de inmunidad contra *Streptococcus pneumoniae* en individuos con sistemas inmunitarios desarrollados o no deficientes, pero una proteína conjugada con el polisacárido permite una respuesta inmunitaria en niños y ancianos que también son los que tienen más riesgo de infecciones neumocócicas. Las células neumocócicas se cultivan en fermentadores con lisis inducida al final de la fermentación. El caldo de lisado se recolecta entonces para la purificación corriente abajo y la recuperación de polisacáridos capsulares.

El tamaño del polisacárido es un atributo de calidad que se ensaya en cada lote de preparación y se debe controlar apropiadamente. El peso molecular para los polisacáridos capsulares del serotipo 19A está afectado por parámetros del proceso de fermentación. Los procedimientos de la presente invención permiten recuperar polisacáridos capsulares del serotipo 19A de alto peso molecular a partir de lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae*.

En el desarrollo de los presentes procedimientos, la concentración de HySoy y la elección de la base de titulación se modificaron en un intento de modificar los rendimientos de polisacáridos finales y los pesos moleculares. Se ensayaron cuatro esquemas de fermentación. El primero utilizaba un procedimiento basal de NaOH con 28 g/l de HySoy. El segundo utiliza un 20 % de carbonato sódico como base de titulación y 20 g/l de HySoy. El tercero combina las ventajas de las dos primeras estrategias introduciendo carbonato mediante alimentación discontinua de bicarbonato sódico y utilizando una titulación de base mixta de NaOH/carbonato. La cuarta estrategia utilizaba carbonato como base de titulación con adición de 10 mM de bicarbonato para reforzar el crecimiento.

El uso de NaOH como base de titulación durante la fermentación tenía la ventaja de ser capaz de disminuir el desoxicolato del lisado a pH 5,0 sin formar espuma para retirar la proteína y mejora la filtración, pero daba como resultado un polisacárido de menor peso molecular (< 450 kDa). El Na₂CO₃ proporcionaba mayor peso molecular, pero tenía el inconveniente de formación de espuma si el pH del lisado con desoxicolato disminuía. A un pH más alto en la etapa de mantenimiento de 6,6, las fermentaciones que utilizaban Na₂CO₃ formaban un material tipo gel, con los problemas posteriores de filtración. La minimización de la cantidad de Na₂CO₃ utilizando una mezcla de NaOH y Na₂CO₃ como titulantes del pH proporcionaba los beneficios en el tamaño del peso molecular del Na₂CO₃ mientras que se eliminaba la formación de espuma y los problemas de filtración debido a la liberación repentina de grandes cantidades de CO₂. El uso de un 20 % de Na₂CO₃ (p/v) como la base titulante con la adición de 10 mM de NaHCO₃ al cultivo de refuerzo (cuarta estrategia) producía polisacáridos de alto peso molecular, consistentemente con altos rendimientos.

Además de la concentración de HySoy y la base titulante, también se estudió el efecto del momento de recolección sobre el peso molecular del polisacárido capsular del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*. Se descubrió que permitiendo que el cultivo de fermentación fermentara durante menos de 6 horas antes de la lisis de las células bacterianas producía polisacáridos capsulares del serotipo 19A de alto peso molecular a partir de lisados de *Streptococcus pneumoniae*.

Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos mejorados para la recuperación de polisacáridos capsulares del serotipo 19A de alto peso molecular a partir de lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae*. En un procedimiento, se proporciona un procedimiento para la producción de una solución que contienen polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* aislados con alto peso molecular, que incluye las etapas de: 1) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen polisacáridos capsulares del serotipo 19A; 2) fermentar el cultivo de fermentación durante menos de 6 horas; 3) lisar las células bacterianas en el cultivo de fermentación; y 4) aislar los polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*. A partir del cultivo de fermentación; de esta manera se produce una solución que contienen polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* aislados con alto peso molecular, en el que dicho polisacárido capsular del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* aislado de alto peso molecular tiene un peso molecular de al menos 480 kDa. En ciertas realizaciones, el cultivo de fermentación se fermenta durante menos de aproximadamente 6 horas, menos de aproximadamente 5,5 horas, menos de aproximadamente 5 horas, menos de aproximadamente 4,5 horas, menos de aproximadamente 4 horas, o menos de aproximadamente 3,5 horas. En otra realización, el cultivo de fermentación se fermenta durante entre 3 horas y 7 horas, durante entre 3 horas y 6,5 horas, durante entre 3 horas y 6 horas, durante entre 3 horas y 5,5 horas, durante entre 3 horas y 5 horas, durante entre 3 horas y 4,5 horas, durante entre 3 horas y 4 horas, o durante entre 3 horas y 3,5 horas. En otra realización, la presente divulgación se refiere a una solución que contiene polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* de alto peso molecular, en el que la solución se produce por el procedimiento descritos anteriormente.

En otra realización, el procedimiento de la presente invención también implica el suministro de CO₂ a un cultivo de fermentación de células bacterianas que producen polisacáridos del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*, que incluye las etapas de: 1) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen polisacáridos capsulares del serotipo 19A; 2) suministrar CO₂ al cultivo de fermentación; 3) fermentar el cultivo de fermentación durante menos de 6 horas; 4) lisis de las células bacterianas del cultivo de fermentación; y 5) aislar los polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* del cultivo de fermentación; de esta manera se produce una solución que contiene polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* aislados de alto peso molecular, en la que dicho polisacárido capsular del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*. Aislado de alto peso molecular tiene un peso molecular de al menos 480 kDa. En otra realización, la presente divulgación se refiere a una solución que contienen polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* de alto peso molecular, en el que la solución se produce por el procedimiento descrito anteriormente.

Los procedimientos de la invención producen polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* de alto peso molecular. Como se utiliza en el presente documento, "alto peso molecular" se refiere a los pesos moleculares que tienen al menos aproximadamente 480 kDa, aproximadamente 490 kDa, aproximadamente 500 kDa, aproximadamente 510 kDa, aproximadamente 520 kDa, aproximadamente 525 kDa, aproximadamente 550 kDa, aproximadamente 575 kDa, aproximadamente 600 kDa, aproximadamente 625 kDa, aproximadamente 650 kDa, aproximadamente 675 kDa, aproximadamente 700 kDa, aproximadamente 725 kDa, aproximadamente 750 kDa, aproximadamente 775 kDa, aproximadamente 800 kDa, aproximadamente 825 kDa, aproximadamente 850 kDa, aproximadamente 875 kDa, aproximadamente 900 kDa, aproximadamente 925 kDa, aproximadamente 950 kDa, aproximadamente 975 kDa, o aproximadamente 1000 kDa.

En ciertos procedimientos, el suministro de CO₂ al cultivo de fermentación incluye la adición de ion bicarbonato (HCO₃⁻) al cultivo de fermentación, por ejemplo, añadiendo NaHCO₃ al cultivo de fermentación. Las adiciones de NaHCO₃ de 5-50 mM se pueden utilizar, tales como 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, o 50 mM. En otros procedimientos, el suministro de CO₂ al cultivo de fermentación incluye la adición de un ion carbonato (CO₃²⁻) al cultivo de fermentación, por ejemplo, añadiendo Na₂CO₃ al cultivo de fermentación. Las adiciones de Na₂CO₃ de 0,1 M-2,0 M se pueden utilizar, tal como 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,6 M, 0,7 M, 0,9 M, 1,0 M, 1,5 M, 1,8 M, o 2,0 M. También se puede utilizar un equivalente peso/volumen (p/v), tal como un 5 % (p/v) de Na₂CO₃, un 10 % (p/v) de Na₂CO₃ o un 20 % (p/v) de Na₂CO₃. En otros procedimientos, el suministro de CO₂ al cultivo de fermentación incluye una primera adición de NaHCO₃ y una segunda adición de Na₂CO₃ al cultivo de fermentación. En procedimientos adicionales, el suministro de CO₂ al cultivo de fermentación incluye la deposición por encima del cultivo de fermentación de CO₂. Se pueden utilizar depósitos de CO₂ del 5 %-100 %, por ejemplo, un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 %.

En los procedimientos de la presente invención, las células bacterianas se pueden lisar utilizando cualquier agente lítico. Un "agente lítico" es cualquier agente que ayuda a la rotura de la pared celular y la liberación de autolisinas que produce la lisis celular que incluye, por ejemplo, detergentes. Como se utiliza en el presente documento, el término "detergente" se refiere a cualquier detergente aniónico o catiónico capaz de inducir la lisis de las células

bacterianas. Ejemplos representativos de dichos detergentes para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen el desoxicolato sódico (DOC), N-lauril sarcosina (NLS), ácido quenodesoxicólico sodio, y saponinas.

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

10 Aunque no hay pruebas de que el uso de DOC durante la purificación del polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* suponga un riesgo para la salud, el uso de dichos reactivos derivados biológicamente podría originar potenciales problemas reguladores. En consecuencia, en una realización de la presente invención, el agente lítico que se utiliza para la lisis de las células bacterianas es un agente lítico no derivado de animales. Los agentes líticos no derivados de animales para su uso con los procedimientos de la presente invención incluyen agentes de fuentes no animales con modos de acción similares a los del DOC (es decir, que afecten a la función de LytA y den como resultado la lisis de las células de *Streptococcus pneumoniae*). Dichos agentes líticos no derivados de animales incluyen, pero no se limitan a, análogos del DOC, tensioactivos, detergentes, y análogos estructurales de la colina, y se pueden determinar utilizando los procedimientos descritos en la sección Experimental posteriormente en el presente documento. En una realización, el agente lítico no derivado de animales se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido decanosulfónico, tert-octilfenoxi poli(oxi-etileno) etanoles (por ejemplo, Igepal® CA-630, CAS n°: 9002-93-1, disponible en Sigma Aldrich, St. Louis, MO), N-lauril sarcosina sódica (NLS), lauril iminodiopropionato, dodecil sulfato sódico, quenodesoxicolato, hiodesoxicolato, glicodesoxicolato, taurodesoxicolato, tauroquenodesoxicolato, y colato. En otra realización, el agente lítico no derivado de animales es NLS.

25 En los procedimientos de la presente invención, los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* se aíslan utilizando las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, después de la fermentación de las células bacterianas que producen polisacáridos capsulares del serotipo 19A del *Streptococcus pneumoniae*, las células bacterianas se lisan para producir un lisado celular. Los polisacáridos capsulares se pueden aislar entonces a partir del lisado celular utilizando técnicas de purificación conocidas en la técnica, incluyendo el uso de centrifugación, precipitación, ultrafiltración, y cromatografía en columna (véase, por ejemplo, las Pub. de Solic. de Patente de EE. UU. N° 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340, y 20080102498).

30 Los cambios en el procedimiento descrito anteriormente permiten la recuperación de polisacáridos capsulares del serotipo 19A de alto peso molecular a partir de lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae*. Esto es una mejora robusta del procedimiento de fermentación/recuperación que puede aumentar enormemente la producción de polisacáridos neumocócicos.

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

Ejemplos

Las células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen el serotipo 19A se cultivan para suministrar los polisacáridos necesarios para la producción de vacunas para la inmunización contra la enfermedad invasiva producida por el *Streptococcus pneumoniae* debido a los serotipos capsulares incluidos en la vacuna. Las células se cultivaron en fermentadores con la lisis inducida al final de la fermentación. El caldo de lisado se recolectó entonces para la purificación corriente abajo y la recuperación de los polisacáridos capsulares. Debido a que el tamaño del polisacárido es un atributo de calidad que se ensaya en cada lote de preparación, el tamaño del polisacárido debe controlarse apropiadamente. Se descubrió que el peso molecular de los polisacáridos capsulares del serotipo 19A estaba afectado por parámetros del proceso de fermentación. El siguiente ejemplo describe los estudios relacionados con el momento de la recolección y el suministro de CO₂ durante la fermentación del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*.

Ejemplo 1: Efecto del suministro de dióxido de carbono en la fermentación sobre el peso molecular del polisacárido

50 Las ejecuciones del laboratorio se llevaron a cabo en fermentadores de 3 l Braun Biostat B (B. Braun Biotech, Allentown, PA). Se llenaron con 1,8 l de medio HYS (20 g/l HySoy, 2,5 g/l de NaCl, 0,5 g/l de KH₂PO₄, 0,013 g/l de CaCl₂·2H₂O, 0,15 g/l de L-cisteína HCl). Los fermentadores se esterilizaron en autoclave durante 60 minutos a 121 °C. Después de enfriarlos, se añaden a cada unidad 40 o 60 ml/l de una solución de un 50 % de glucosa + un 1 % de sulfato magnésico (p/v) (DMS). Si es necesario se añadía bicarbonato sódico antes de la inoculación.

55 Se inoculó una botella de siembra de 2 l que contenía 1 l de medio HYS con materias primas de siembra congeladas del tipo 19A y se incubó a 36 °C sin agitado durante aproximadamente 6-8 horas. La inoculación de los fermentadores se lleva a cabo con un volumen de 100 ml (~ 5,2 % v/v) de alícuotas de una botella con una DO₆₀₀ entre 0,3-0,9 y un pH entre 4,75- 5,60. La temperatura de fermentación y el pH se controlaban en los ajustes

deseados. Se utilizaron las condiciones convencionales de 36 °C, carga de aire de 1 l/min, pH controlado a 7 y agitado de 75 rpm. Se colocaron dos propulsores en las posiciones inferior y media del cuerpo del agitador. Una botella que contenía la base titulante apropiada (NaOH 3 N, NaOH 3 N mezclada con distintas concentraciones de NaHCO₃, NaOH 3 N mezclada con distintas concentraciones de Na₂CO₃ y NaHCO₃, y un 20 % de Na₂CO₃) se conectaron para el control automático del pH. Se tomaban muestras de los fermentadores en distintos momentos para el pH externo, DO600, glucosa, polisacárido y proteína. Las ejecuciones terminaban cuando la concentración de glucosa estaba casi agotada, o no se notaba un aumento de la DO con el tiempo.

Medición de la densidad óptica (DO₆₀₀)

La densidad celular del caldo de fermentación se determinó leyendo la absorbancia de las muestras a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu (Columbia, MD) UV-1601 (2 nm de ancho de banda) o Spectronics (Westbury, NY) Genesys 5 (5 nm de ancho de banda). La unidad se blanqueó con el medio HYS diluido con agua desionizada (DI) hasta coincidir con la dilución necesaria de la muestra. La muestra se diluía para mantener la absorbancia por debajo de una lectura de 0,4, que está bien en el intervalo lineal del espectrómetro.

Concentración de glucosa

Los niveles de glucosa se determinaron centrifugando las células y utilizando el sobrenadante directo o diluido 3x con agua DI. Las muestras se analizaron en un Nova Biomedical (Waltham, MA) BioProfile 400.

Análisis de polisacáridos

Las muestras se tomaron al final de la fermentación, se leyeron y se trataron con un 12 % de desoxicolato sódico (DOC) hasta una concentración del 0,13 % (p/v) y se agitó suavemente. Se mantuvieron entre 8-24 horas a 5 °C y entonces el pH se ajustó a 5,0 con ácido acético al 0 % para precipitar la mayoría del DOC y la proteína, después de otro intervalo de espera de 12-24 horas a 5 °C, las muestras se centrifugaron (14000 rpm, Sorvall (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) SS34 rotor, 10 min a 15 °C). El pH del sobrenadante se ajustó a 6,0. El sobrenadante se filtró entonces mediante filtros de membrana en jeringa (0,45 µm) Pall (East Hills, NY) HT Tuffryn (unión baja a proteínas). El producto filtrado se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño de altas prestaciones (HPLC-SEC) utilizando una metodología convencional bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Aquilar, M. "HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols" Totowa, NJ: Humana Press (2004)).

Análisis proteico

Los niveles de proteína se analizaron por electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico poliacrilamida (SDS-PAGE) procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Walker, J.M. "The Protein Protocols Handbook" Totowa, NJ: Humana Press (2002)). El lisado celular filtrado (sobrenadante) como se preparó anteriormente se dividió en alícuotas en tubos de microcentrífuga a 65 µl/tubo. Se hicieron adiciones de agente reductor (10 µl de ditiotreitól (DTT) y NuPAGE® (Invitrogen, Carlsbad, CA) tampón de muestra 4x de dodecil sulfato de litio (LDS) (25 µl) para cada muestra. Las muestras se removieron y calentaron durante 10 minutos antes de cargar 10 µl/calle en geles de 12 pocillos 4-12 % Bis-Tris 4-12 %. Los geles se ejecutaron en tampón NuPAGE® MES-SDS a 150 V limitante durante aproximadamente 60 minutos y posteriormente se tiñó utilizando el protocolo de tinción Zoion (Zoion Biotech, Worcester, MA). El análisis de muestra se llevó a cabo utilizando un creador de imágenes UVP (UVP Inc., Upland, CA) con el software LabWorks™ (UVP Inc.) V.3 para obtener las concentraciones aproximadas de bandas de proteína específica de interés. Se utilizó la Fracción V de seroalbúmina bovina (BSA) para desarrollar una curva proteica de referencia para calcular los valores proteicos aproximados de las muestras (en el caldo de lisis celular).

Análisis del peso molecular

Las muestras de fermentación de 1-2 litros con DOC sódico al 12 % hasta una concentración del 0,13 % (p/v) con agitado a 200 rpm. Las muestras se mantuvieron entre 8-24 horas a 5 °C o 20 °C. Las muestras se ajustaron entonces a 5,0 o 6,6 con ácido acético al 50 % para precipitar la mayoría del DOC y las proteínas. Después de otro intervalo de espera de 12-24 horas a 5 °C, las muestras se centrifugaron (1100 rpm, Sorvall (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) SLA-3000 rotor, 15 min a 10 °C). En las muestras de sobrenadante se ajustó entonces el pH a 6,0 con NaOH 3 N, y se filtraron utilizando filtros Millipore MP60 de 0,45 µm (Billerica, MA). Las muestras se sometieron entonces a un procedimiento de purificación modificado que consistía en una diafiltración con un corte de peso molecular de 100K (MWCO) (5x de concentración seguido por 7,5x de diafiltración con agua DI), precipitación con un 0,1 % de HB, y filtración en carbón. El material purificado se sometió entonces a análisis de dispersión de luz láser multi angular (MALLS).

Estudio del proceso de fermentación

Basándose en estudios previos, el proceso de fermentación se optimizó cambiando de Na₂CO₃ a NaOH como la base titulante. El uso de NaOH permitía que el pH de recuperación bajara a 5,0 dando como resultado una precipitación proteica significativa. El Na₂CO₃ liberará CO₂ a pH bajo (< 6,6) creando la formación de espuma. Se examinó el impacto de la base titulante en el polisacárido de Tipo 19A y niveles de proteína. os de los fermentadores

de 3 l se dispusieron con un fermentador que servía como control del proceso original, utilizando una solución con Na₂CO₃ al 20 % (p/v) como base de alimentación. El otro fermentador utilizaba NaOH 3 N como base de alimentación.

5 Durante la fase de recuperación, las células se lisaron en el fermentador con DOC (a una concentración final de 0,13 % (p/v)) manteniendo el fermentador a 36 °C durante 30 minutos. Siguiendo a esta etapa, el lisado se mantuvo durante una noche con agitado a temperatura ambiente (22 °C). Después de mantener el lisado, se tituló el pH del lisado mediante un intervalo desde no ajustado a 4,5 llevando las muestras a distintos puntos de ajuste de pH. Estas muestras se mantuvieron durante una noche a temperatura ambiente antes de procesarse y analizarse en cuanto a las concentraciones de polisacáridos y proteínas. Los niveles de DO, base y glucosa durante la fase de fermentación se muestran en la Figura 1 y la Figura 2. La mayor diferencia era una DO final más alta para la ejecución con carbonato.

15 También se examinó el efecto del ajuste del pH en el lisado después del DOC sobre los niveles totales de proteínas, y se muestra en la Figura 3. Los niveles de pH más bajos reducían la carga proteica en el caldo libre de células para la ejecución de NaOH y la ejecución con Na₂CO₃. El pH menor (< 6,6) no tenía un impacto negativo en el rendimiento de polisacárido. Los resultados del análisis de fermentación servían como una indicación de que la alimentación con la base NaOH era una alternativa aceptable al procedimiento que utiliza la base de alimentación Na₂CO₃ durante la fermentación, pero produce rendimientos menores que los que se obtiene con la alimentación con Na₂CO₃.

Efecto de la base titulante sobre el peso molecular de 19A

20 Se llevaron a cabo un conjunto de fermentaciones a escala de 3 l para determinar si la base titulante, la concentración de HySoy y la etapa de mantenimiento del pH afectaban el peso molecular de 19A. Se llevó a cabo la determinación del peso molecular utilizando el ensayo MALLS siguiendo el procedimiento modificado de purificación. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Impacto de la base titulante sobre el peso molecular de 19A (L29331-94)

Ejecución N°	pH/Temp	HySoy	Mant. pH	Base	MALLS (kDa)
D	7,0/36 °C	28 g/L	5,0	3 N NaOH	340
E	7,0/36 °C	20 g/L	5,0	3 N NaOH	350
F	7,0/36 °C	20 g/L	5,0	20 % Na ₂ CO ₃	713
H	7,0/36 °C	20 g/L	6,6	20 % Na ₂ CO ₃	713

25 *Efecto del bicarbonato y mezcla de bases titulantes del pH*

En el primer estudio (Ejecuciones L29331-122 y -139), se utilizaron niveles variables de bicarbonato sódico inicial y mezclas de bases de hidróxido sódico y carbonato sódico en conjunción con una etapa de mantenimiento de pH a 5,0 después de la etapa de mantenimiento con DOC. Las adiciones de bicarbonato iniciales variaban desde 10-50 mM y el carbonato sódico añadido al hidróxido sódico 3 N para la base titulante variaba desde 0,2-1,8 M. Una ejecución contenía 50 mM de bicarbonato inicial y se utilizaba NaOH como base titulante. los niveles de carbonato al final de estas fermentaciones variaban de 14-111 mM. Los pesos moleculares del serotipo 19A variaban desde 520 a 713 kDa. Los parámetros de ejecución y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Na₂CO₃ vs. mezclas de bases como titulantes de pH

Ejecución N°		NaHCO ₃ (mM)	Base		MALLS (kDa)	Rendimiento de PS (mg/ml)
			Na ₂ CO ₃	NaOH		
L29 331- 122 20	E	0	20 %	0	759	0,836
	F	10	0,2 M	3 N	520	0,308
Parte II L29331-139 28 g/l de HySoy	G	10	0,4 M	3 N	648	0,538
	H	10	0,9 M	3 N	563	0,334
	C	20	0,9 M	3 N	662	1,027
	D	20	1,8 M	3 N	611	0,903
	G	50	0,9 M	3 N	713	0,924
	H	50	0 M	3 N	713	1,051

Un segundo estudio (L29331-159 y -158) utilizaba adiciones de bicarbonato iniciales de 15-30 mM y las mezclas de bases utilizaban 0,4-1,0 de Na₂CO₃. los niveles de carbonato al final de la fermentación variaban de 24-62 mM. Los pesos moleculares del serotipo 19A variaba desde 502 a 763 kDa. Los parámetros de ejecución y los resultados se muestran en la Tabla 3.

5

Tabla 3. NaHCO₃ con bases mezcladas como titulantes del pH

Ejecución N°	HySoy/ DMS	NaHCO ₃ (mM)	Na ₂ CO ₃ /NaOH	MALLS (kDa)	Rendimiento de PS (mg/ml)
G2	28 g/l/ 60 ml/l	15	1,0 M/ 3 N	657	0,853
H2	28 g/l/ 60 ml/l	15	0,4 M/ 3 N	605	0,755
C	20 g/l/ 60 ml/l	20	0,4 M/ 3 N	571	0,386
E	20 g/l/ 60 ml/l	20	1,0 M/ 3 N	763	0,439
F	20 g/l/ 60 ml/l	25	0,7 M/ 3 N	462	0,382
G	20 g/l/ 60 ml/l	30	0,4 M/ 3 N	502	0,355
H	20 g/l/ 60 ml/l	30	1,0 M/ 3 N	594	0,415

Comparación de los procedimientos de fermentación con base de titulación de carbonato puro o mezclado

Se llevó a cabo un experimento para comparar el procedimiento de mezcla de bases (0,7 M de Na₂CO₃/ 3 N NaOH al procedimiento de carbonato titulante (una solución de Na₂CO₃ al 20 %, p/v) Los resultados (Tabla 4) confirmaban que el peso molecular del procedimiento de carbonato titulante era mayor y más constante (778, 781 kDa) que el peso molecular del procedimiento de mezcla de bases (561-671 kDa). El rendimiento de polisacárido era también mayor con el procedimiento con el Na₂CO₃.

10

Tabla 4. Ejecución L29399-1 Na₂CO₃ vs. mezcla de bases

Ejecución N.º	NaHCO ₃ (mM)	Base		PM (kDa)	Rendimiento de PS (mg/ml)
		Na ₂ CO ₃	NaOH		
C	25	0,7 M	3 N	565	1,106
D	25	0,7 M	3 N	561	0,908
E	25	0,7 M	3 N	612	0,894
G	25	0,7 M	3 N	671	0,873
F	0	20%	0	778	1,282
H	0	20%	0	781	1,249

Ejecuciones a escala piloto

Se llevaron a cabo varias ejecuciones a escala piloto del serotipo 19A (100 l) con distintas bases titulantes. La determinación del peso molecular se llevó a cabo utilizando el ensayo MALLS siguiendo un procedimiento de purificación completo y se informó a partir del lote purificado final. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

15

Tabla 5. Impacto de la base titulante sobre el peso molecular de 19A a escala piloto

Lote de fermentación	Base de titulación	Lote de purificación	FBC MALLS (kDa)
RRP19A-0008	3 N NaOH	L26563-10	390
RRP19A-0009	3 N NaOH	L26563-11	380
IPPPN19A-005	3 N NaOH/0,6 M Na ₂ CO ₃	L26260-37	492
IPPPN 19A-006	3 N NaOH/0,6 M Na ₂ CO ₃	L26260-38	480
IPPPN 19A-007	3 N NaOH/0,6 M Na ₂ CO ₃	L26260-39	490
IPPPN19A-014	20 % Na ₂ CO ₃	L26260-49	580
IPPPN19A-016	20 % Na ₂ CO ₃	L26260-50	559
IPPPN19A-017	20 % Na ₂ CO ₃	L26260-51	599

Efecto de la base titulante y el depósito sobre el peso molecular de 19A

Se llevaron a cabo un conjunto de fermentaciones en la escala de 3 l para determinar si la base titulante y el depósito atmosférico afectaba el peso molecular. La determinación del peso molecular se llevó a cabo utilizando el ensayo MALLS siguiendo el procedimiento de purificación modificado. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

5 Tabla 6. Impacto de la base titulante y el depósito sobre el peso molecular de 19A

Ejecución N. ^a	Base	Depósito	MALLS (kDa)
Control	3 N NaOH	Aire	350
C	0,7 M Na ₂ CO ₃	Aire	855
D	1,5 M Na ₂ CO ₃ / 1,5 N NaOH	Aire	710
E	3 N NaOH	100 % CO ₂	634
F	3 N NaOH	50 % CO ₂	646
G	3 N NaOH	20 % CO ₂	567
H	3 N NaOH	10 % CO ₂	547

Efecto del momento de recolección sobre el peso molecular de 19A

También se estudió el impacto del momento de recolección sobre el peso molecular de los polisacáridos del serotipo 19A. La Tabla 7 resume los datos de una ejecución que muestra una disminución del PM en función de la DO de la fermentación y el momento de recolección.

10 Tabla 7. PM en función de la DO de fermentación y el momento de recolección

DO (Tiempo)	MALLS
2,2 (3 h)	1065
4,2 (4 h)	845
5,5 (5,5 h)	756
5,9 (6,6 h)	653

Estudios adicionales con varias ejecuciones experimentales también mostraban una disminución del PM en función de la DO de la fermentación y el momento de recolección. La Figura 4 muestra el peso molecular en función de la densidad óptica (DO) de fermentación y el momento de la recolección en la producción de polisacáridos de 19 A. La Figura 5 muestra el consumo de base específica por tiempo por densidad óptica (DO) en función del momento de recolección en la producción de polisacáridos 19A. La Figura 6 muestra el peso molecular en función de la utilización de base específica en la producción de polisacáridos 19A.

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una solución que contiene polisacáridos capsulares aislados del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 a) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen polisacáridos capsulares del serotipo 19A;
 - b) fermentar dicho cultivo de fermentación durante menos de 6 horas;
 - c) lisar las células bacterianas en dicho cultivo de fermentación; y
 - d) aislar los polisacáridos capsulares del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* de dicho cultivo de fermentación,
- 10 en el que dicho polisacárido capsular aislado del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*, de alto peso molecular, tiene un peso molecular de al menos 480 kD.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente el suministro de CO₂ a dicho cultivo de fermentación.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el suministro de CO₂ a dicho cultivo de fermentación comprende la adición de ion bicarbonato (HCO₃⁻) al cultivo de fermentación.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la adición de HCO₃⁻ al cultivo de fermentación comprende la adición de NaHCO₃.
5. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el suministro de CO₂ a dicho cultivo de fermentación comprende la adición de ion carbonato (CO₃²⁻) al cultivo de fermentación.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la adición de CO₃²⁻ al cultivo de fermentación comprende la adición de Na₂CO₃.
7. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el suministro de CO₂ a dicho cultivo de fermentación comprende una primera adición de NaHCO₃ y una segunda adición de Na₂CO₃.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el suministro de CO₂ a dicho cultivo de fermentación comprende el depósito por encima del cultivo de fermentación con CO₂.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el cultivo de fermentación se fermenta durante menos de 5 horas.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el cultivo de fermentación se fermenta durante menos de 4 horas.
- 30 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el cultivo de fermentación se fermenta durante entre 3 horas y menos de 6 horas.

Figura 1

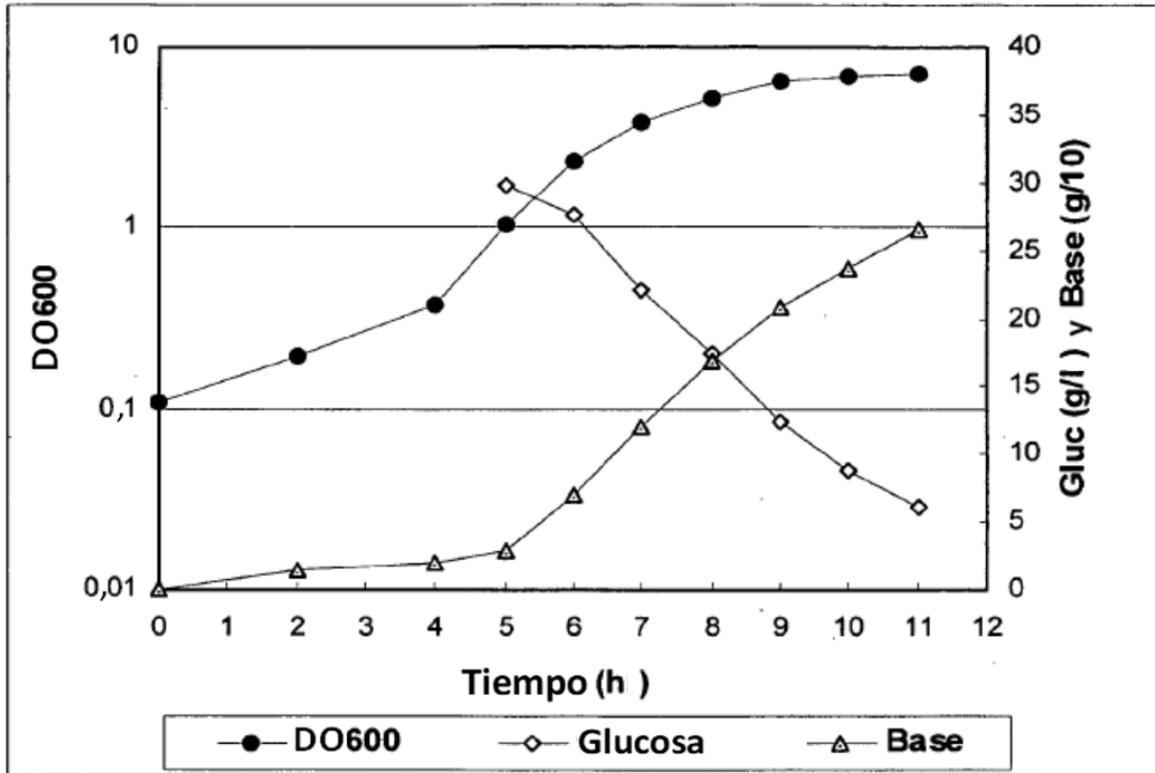


Figura 2

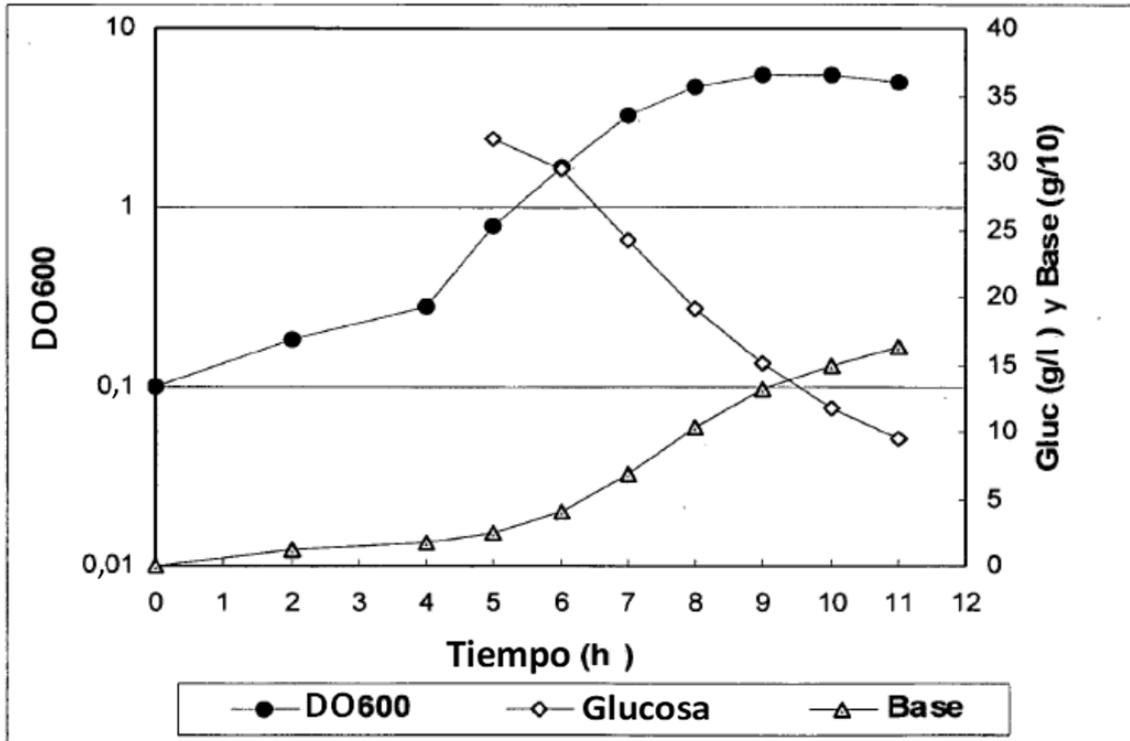


Figura 3

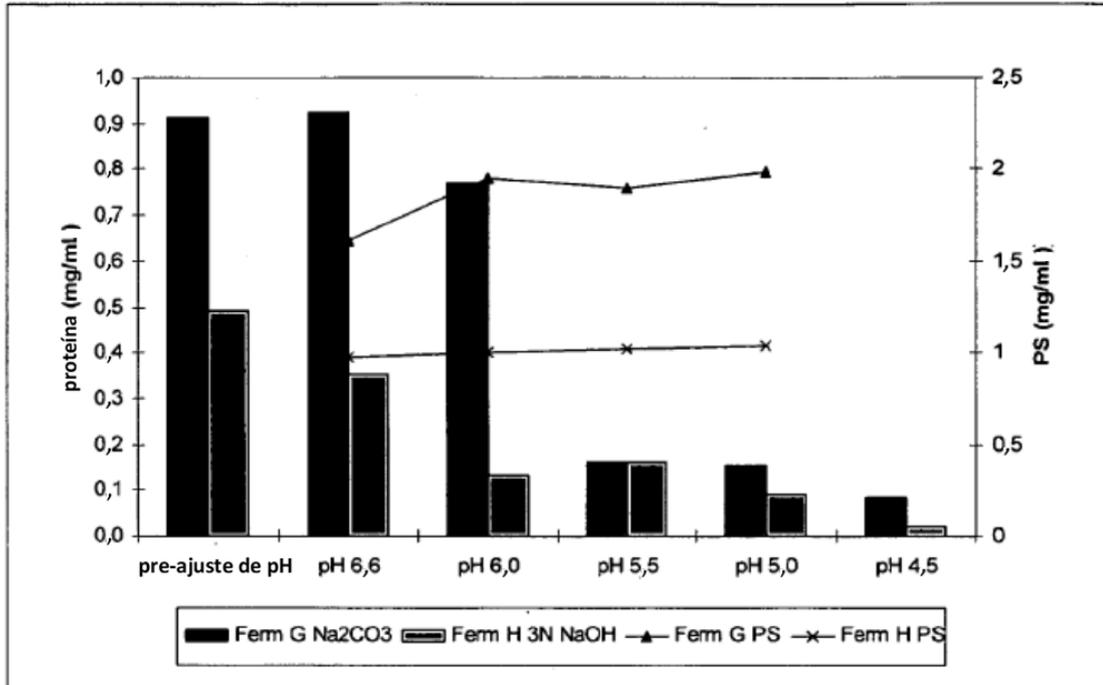


Figura 4

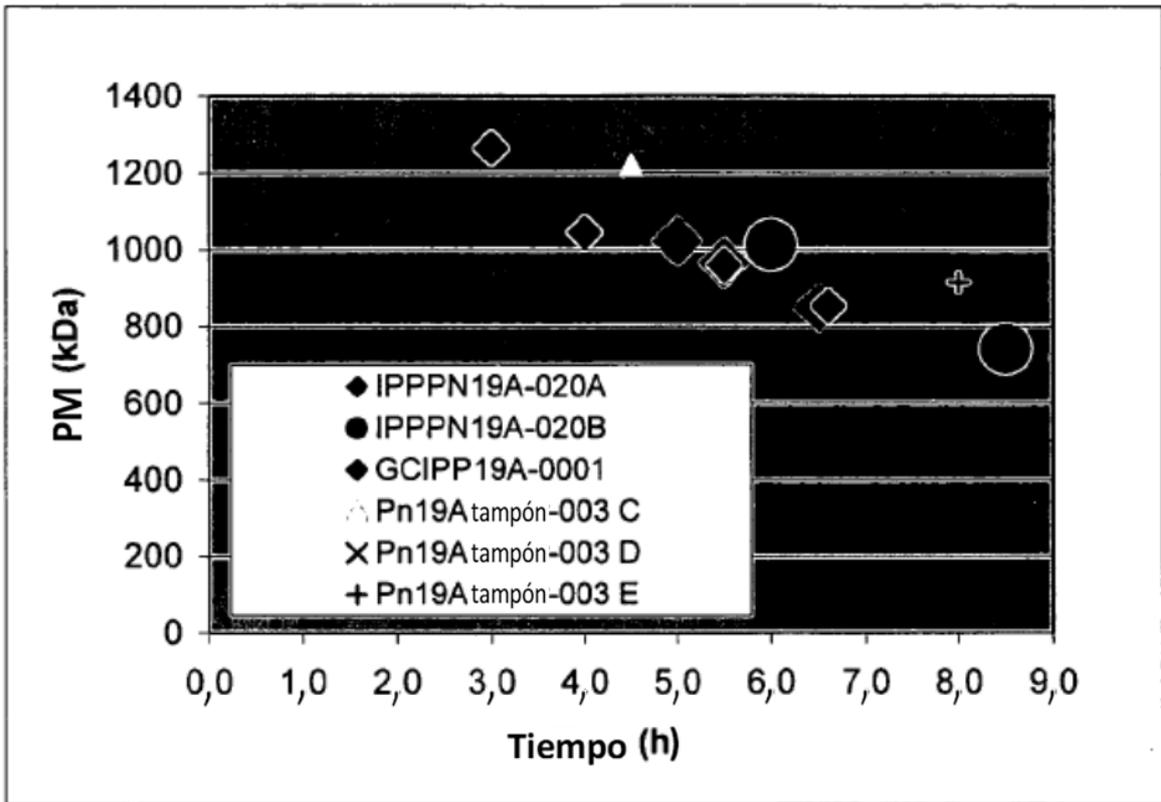


Figura 5

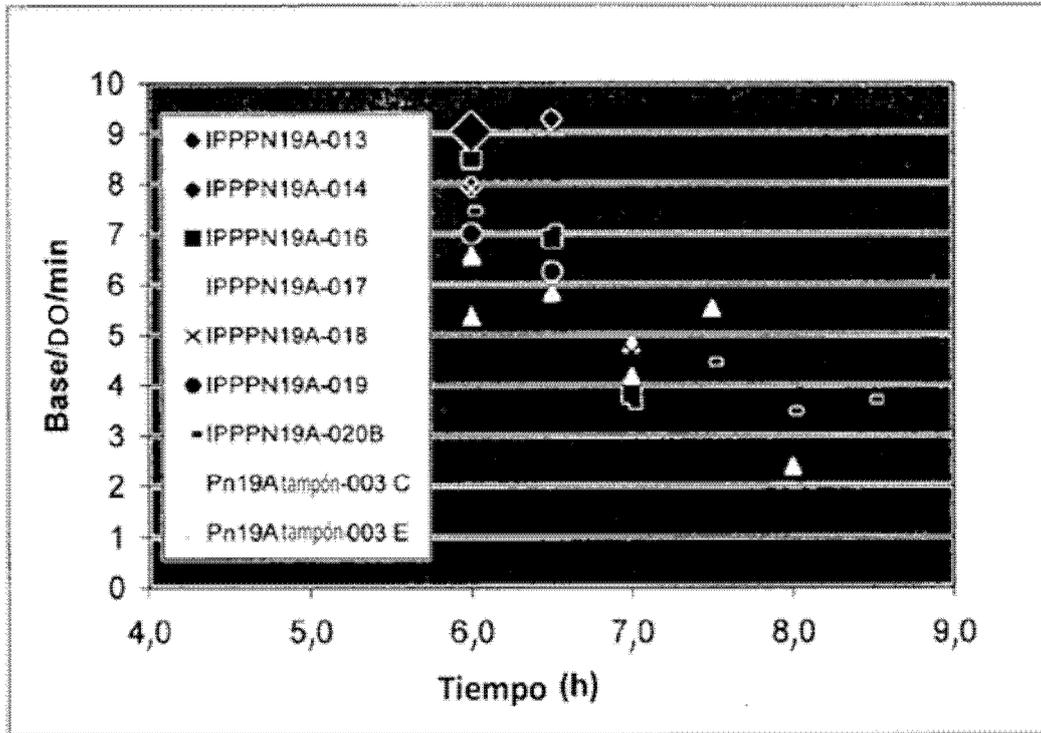


Figura 6

