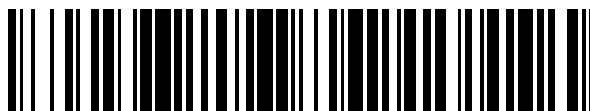


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 353**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2008 E 11194173 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2436700**

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

30 Prioridad:

23.03.2007 US 89661607 P

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

01.08.2018

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 677 353 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento abreviado de purificación para la producción de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

- 25 Para la mayoría de los serotipos para la vacuna 7-valente de conjugado de neumococos (7vPnC) actualmente comercializada (Pneumar®), así como la vacuna 13-valente de conjugado de neumococos (13vPnC) recientemente desarrollada, el procedimiento actual de purificación requiere dieciséis etapas que incluyen muchas operaciones caras, muy laboriosas y exigen mucha tecnología, tal como cromatografía y múltiples separaciones en membrana. Los intentos previos de mejorar los procedimientos de purificación para polisacáridos de *S. pneumoniae* han incluido, por ejemplo, manipulación del pH durante la fermentación y la recuperación (véase la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0228381) y precipitación con disolvente y detergente. Sin embargo, la retirada de impurezas en estos procedimientos aún se extiende sobre muchas etapas muy laboriosas y costosas. El nivel de proteínas es la especificación más problemática de cumplir debido a las propiedades físicas y químicas de las proteínas solubles.

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

Sumario de la invención

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

- 50 (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen un serotipo seleccionado de *Streptococcus pneumoniae*;
 (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
 55 (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) para retirar las impurezas de bajo peso

molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido;

(e) disminuir el pH del retenido de la etapa (d) hasta menos de 4,5 usando un ácido orgánico o uno mineral para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, formando de ese modo una solución acidificada de retenido;

5 (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;

(g) filtrar la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) a través de un filtro de carbono activado;

(h) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (g), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y

10 (i) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (h) usando un filtro estéril;

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

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

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

(a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F;

(b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;

35 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;

(d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a temperatura ambiente a pH neutro en medio sin sal para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido sin sal;

40 (e) disminuir el pH del retenido sin sal de la etapa (d) hasta menos de 4,5 usando un ácido orgánico o uno mineral para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, formando de ese modo una solución acidificada de retenido;

(f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;

45 (g) filtrar la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) a través de un filtro de carbono activado;

(h) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (g), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y

(i) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (h) usando un filtro estéril;

50 mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados que comprenden el serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F en forma de una solución. En una realización particular, el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH hasta aproximadamente 7,4. En otra realización más, la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido sin sal de la etapa (d). En otra realización, la etapa (g) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f). En otra realización, el filtro de carbono activado de la etapa (g) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera. En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es desoxicolato sódico (DOC). En otra realización, el agente lítico de la etapa (b) es un agente lítico de origen no animal. En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es el agente lítico de origen no animal N-lauril sarcosina sódica (NLS).

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

- 5 (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A;
- (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
- 10 (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a aproximadamente 4 °C a un pH de aproximadamente 6 en tampón fosfato sódico para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido;
- (e) disminuir el pH del retenido de la etapa (d) hasta menos de 4,5 usando un ácido orgánico o uno mineral para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, formando de ese modo una solución acidificada de retenido;
- 15 (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a aproximadamente 4 °C para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
- (g) ajustar el pH de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) hasta aproximadamente 6, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido de pH ajustado;
- 20 (h) filtrar la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g) a través de un filtro de carbono activado;
- (i) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (h), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
- (j) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (i) usando un filtro estéril;
- 25 mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados que comprenden el serotipo 19A en forma de una solución. En una realización particular, el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. En otra realización, la diafiltración de la etapa (i) comprende un
- 30 ajuste de pH hasta aproximadamente 7,4. En otra realización más, la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido de la etapa (d). En otra realización, la etapa (h) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g). En otra realización, el filtro de carbono activado de la etapa (h) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera. En otra realización, el tampón fosfato sódico de la etapa (d) es fosfato sódico 25 mM. En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es desoxicolato sódico (DOC). En otra realización, el agente lítico de la etapa (b) es un agente lítico de origen no animal. En otra realización más, el agente lítico de la etapa (b) es el agente lítico de origen no animal N-lauril sarcosina sódica (NLS).

Breve descripción de los dibujos

- 40 La Figura 1 muestra el rendimiento promedio de polisacárido en el procedimiento (PS), la relación proteína/PS y la relación ácido nucleico (NA)/PS para el serotipo 5 usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
- La Figura 2 muestra los espectros de NMR para PS de serotipo 4 del actual procedimiento de purificación (A) en comparación con el PS de serotipo 4 del procedimiento acortado de purificación (B). No se observaron diferencias significativas entre los dos espectros. El segundo pico de la derecha en ambos espectros era
- 45 piruvato, y la altura del pico del grupo piruvato era comparable en ambos espectros.
- La Figura 3 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 4 usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
- 50 La Figura 4 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 19A usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
- La Figura 5 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 7F usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
- 55 La Figura 6 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 6B usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
- La Figura 7 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 6B usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.
- 60 La Figura 8 muestra el rendimiento promedio de PS en el procedimiento, la relación de proteína/PS y la relación de NA/PS para el serotipo 1 usando el procedimiento acortado de purificación de la invención. Los resultados se muestran para cada etapa de purificación.

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

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

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

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

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

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

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

"Ultrafiltrar", "ultrafiltración", "UF" y términos similares se refieren a, por ejemplo, usar membranas semipermeables con propiedades físicas y químicas apropiadas para discriminar entre moléculas en una solución y moléculas de tipo concentrado en un volumen más pequeño de solución.

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

filtrarse.

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

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "lisado que contiene polisacárido capsular sustancialmente purificado" o "solución que contiene polisacáridos capsulares sustancialmente purificados" se refieren a un lisado celular o solución de *Streptococcus pneumoniae* a partir de la cual se han retirado las proteínas de modo que la relación porcentual de proteína a polisacárido (proteína/PS) sea de menos del 10 %, menos del 9 %, menos del 8 %, menos del 7 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 % y la relación porcentual de ácido nucleico a polisacárido (NA/PS) sea menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 %. En realizaciones particulares, las relaciones porcentuales de proteína/PS y NA/PS

para lisados o soluciones que contienen polisacárido capsular sustancialmente purificado que comprenden serotipos específicos son las siguientes: para el serotipo 1 la relación de proteína/PS es de menos del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 4 la relación de proteína/PS es menor del 3 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 5 la relación de proteína/PS es menor o igual al 7,5 % y la relación de NA/PS es menor o igual 2 %, para el serotipo 6A la relación de proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 6B la relación de proteína/PS es menor del 4 % y la relación de NA/PS es menor del 1 %, para el serotipo 7F la relación de proteína/PS es menor del 5 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 9V la relación de proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 1 %, para el serotipo 14 la relación de proteína/PS es menor del 3 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 18C la relación de proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 19A la relación de proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, para el serotipo 19F la relación de proteína/PS es menor del 3 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %, y para el serotipo 23F la relación de proteína/PS es menor del 2 % y la relación de NA/PS es menor del 2 %. Los procedimientos para la cuantificación de concentraciones de proteína, polisacárido y ácido nucleico en el lisado celular o solución son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, análisis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico), HPLC (cromatografía de líquida de alto rendimiento) y SEC (cromatografía por exclusión de tamaño), ensayos de Lowry modificados, espectrofotometría, SEC-MALLS (cromatografía por exclusión de tamaño/dispersión de luz láser de múltiple ángulo), y NMR (resonancia magnética nuclear).

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

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

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

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

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

- (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F;

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

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

30

- (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A;
- (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un detergente, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- 35 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
- (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a aproximadamente 4 °C a un pH de aproximadamente 6 en tampón fosfato sódico, fosfato sódico 25 mM, para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido;
- 40 (e) disminuir el pH del retenido de la etapa (d) hasta menos de 4,5, particularmente aproximadamente 3,5, usando un ácido orgánico o uno mineral para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, formando de ese modo una solución acidificada de retenido;
- (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a aproximadamente 4 °C con o sin agitación para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
- 45 (g) ajustar el pH de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) hasta aproximadamente 6, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido de pH ajustado;
- (h) filtrar la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g) a través de un filtro de carbono activado, particularmente un filtro de carbono activo que comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera;
- 50 (i) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (h), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
- (j) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (i) usando un filtro estéril;
- 55 mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados que comprenden el serotipo 19A en forma de una solución. En una realización particular, la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido sin sal de la etapa (d). En otra realización, la etapa (h) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g). En otra realización, la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5. Para una estabilidad mejorada del polisacárido 19A sustancialmente purificado durante almacenamiento a largo plazo, sin embargo, la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5, y más particularmente hasta aproximadamente 7,4.
- 60

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

Parte experimental

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

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

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

Etapas de purificación

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

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

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

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

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

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

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

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

Procedimientos analíticos

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

Resultados y análisis

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

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

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

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

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

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

Tabla 2. Rendimiento de PS en el procedimiento, relaciones de proteína (SDS-PAGE) y ácido nucleico del tipo 5.

ETAPA	RENDIMIENTO DE PS (%)			PROTEÍNA/PS (%)		
	L29276-27	L29276-32	L29276-52	L29276-27	L29276-32	L29276-52
Caldo	100,0	100,0	100,0	384,40	1026,60	193,26
Centrifugación	99,9	95,6	94,6	274,60	642,00	209,78
UF/DF 30/50K	71,1	82,8	93,9	152,10	561,00	204,76
Acidificación	56,1	65,9	58,6	9,00	7,50	0,20
Carbono	57,7	55,7	58,7	0,20	1,90	0,50
UF/DF 30K	54,5	54,6	60,3	0,10	1,00	0,09

ETAPA	ÁCIDO NUCLEICO/PS (%)		
	L29276-27	L29276-32	L29276-52
Caldo	825,80	579,83	344,70
Centrifugación	505,10	484,30	311,90
UF/DF 30/50K	107,30	139,90	137,60
Acidificación	9,44	16,40	7,38
Carbono	0,22	0,30	0,74
UF/DF 30K	0,11	0,12	0,19

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

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

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

- El rendimiento de PS de tipo 4 también estaba entre el 50-60 %. La relación de proteína/PS y la relación de ácido nucleico/PS estaban dentro de sus especificaciones. La relación de C-PS también estaba dentro de la especificación. El peso molecular de los tres lotes estaba cercano a ~ 300 kg/mol. El PS de serotipo 4 purificado por el actual procedimiento de purificación usando el caldo similar de fermentación también dio un peso molecular inferior de 285 kg/mol. La comparación de los cromatogramas de HPLC del PS del caldo de fermentación y la solución purificada final mostró que no había diferencias en el tiempo de retención de PS. Esto sugirió que la diferencia en el peso molecular no estaba causada por el cambio del procedimiento, sino en su lugar se debía a la naturaleza intrínseca del procedimiento de fermentación.
- El PS de tipo 4 contiene un grupo piruvato en la molécula modificada, y este piruvato era importante para la conjugación para su uso en una vacuna de conjugado de neumococos. Para asegurar que la cantidad de piruvato no estaba afectada de forma adversa por el tratamiento ácido, se realizó análisis de RMN. La Figura 2 muestra los espectros de RMN para PS de tipo 4 convencional y los del lote L29276-47. No se observaron diferencias significativas entre los dos espectros. El segundo pico desde la derecha en ambos espectros era piruvato, y la altura del pico del grupo piruvato era comparable en ambos espectros. Las relaciones de piruvato para los tres lotes del procedimiento acortado fueron de 0,8 mol/mol, y cumplían la especificación de > 0,7 mol/mol.

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

5

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

ETAPA	NA/PS (%)		
	L29276-47	L29276-55	L29276-148
Caldo	312,84	282,50	302,71
Centrifugación	301,40	261,82	243,28
UF/DF 50/100K	80,99	67,67	92,00
Acidificación	4,24	5,01	1,17
Carbono	0,08	0,92	0,38
UF/DF 30K	0,05	0,06	0,07

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

10

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

15

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

20

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

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

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

25

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

30

El rendimiento de PS, la reducción de proteína y NA en cada una de las etapas de purificación se muestra en la Tabla 6 y en la Figura 4. Los resultados mostraron la pérdida de PS en cada una de las etapas de purificación

excepto en la primera etapa de centrifugación. Como los serotipos 5 y 4, la retirada de proteínas y NA tuvo lugar principalmente en las tres primeras etapas, y había apenas proteína y NA detectables después de la acidificación. Aunque la etapa de adsorción en carbono activado no retiraba una cantidad significativa de proteínas y NA, posiblemente debido a la muy baja concentración de proteínas y NA después de la acidificación, la etapa aún era necesaria para la eliminación del color.

5

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

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

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

10

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

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

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

15

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

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

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

Hubo alguna pérdida de PS de tipo 7F en cada etapa de purificación. Globalmente, la pérdida de PS fue menor que la de los serotipos 5 y 4. La reducción de la relación de proteína y de NA fue principalmente por las etapas de primera centrifugación, de UF/DF 100 K y de acidificación. Similar a otros serotipos, la UF/DF 100 K fue más eficaz en retirar NA que en proteínas. Aunque la etapa de adsorción en carbono activado no retiró una cantidad significativa de proteína y de NA debido a niveles muy bajos de impurezas después de la acidificación, la etapa aún era necesaria para la eliminación del color.

20

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

25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

Tabla 14. Rendimiento de PS en el procedimiento promedio, relación de proteína y de NA de tipo 1.

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

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

Tabla 15. Sumario de lotes de purificación acortada de tipo 14.

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

- 20 Similar al serotipo 7F, el serotipo 14 es un polisacárido no iónico, y su procedimiento actual de purificación es ligeramente diferente de los otros serotipos. Sin embargo, el procedimiento acortado de purificación de la presente invención se aplicó satisfactoriamente al serotipo 14 sin la necesidad de dichas etapas adicionales. Los rendimientos de PS de los dos lotes del procedimiento acortado de purificación fueron del 50-60 %, y las relaciones de proteína y de NA estuvieron dentro de sus especificaciones. Los pesos moleculares del PS purificado también cumplían la especificación.

- 25 El rendimiento de PS en el procedimiento, las relaciones de proteínas y de NA se resumen en la Tabla 16 y en la Figura 9. Se observaron tendencias similares de pérdida de PS, retirada de proteínas y de NA que para los otros serotipos ensayados descritos anteriormente.

Tabla 16. Rendimiento de PS en el procedimiento promedio, relación de proteína y de NA de tipo 14.

ETAPA	RENDIMIENTO DE PS (%)		PROTEÍNA/PS (%)	
	L32874-155	L232874-163	L32874-155	L232874-163
Caldo	100,00	100,00	109,73	286,56
Centrifugación	91,40	90,80	110,88	201,48
UF/DF 50/100K	82,40	68,70	45,52	165,69
Acidificación	65,40	93,90	0,65	0,47
Carbono	59,40	74,60	0,60	0,10
UF/DF 30K	53,10	57,60	0,57	0,41

Tabla 16, continuación.		
ETAPA	NA/PS (%)	
	L32874-155	L232874-163
Caldo	192,80	272,50
Centrifugación	135,50	201,82
UF/DF 50/100K	47,10	64,54
Acidificación	0,89	1,08
Carbono	0,17	0,21
UF/DF 30K	0,13	0,25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusiones para los Ejemplos 1-3

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

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

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

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

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

Procedimientos

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

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

Aislamiento de PS usado para estudios analíticos comparativos: Se hicieron crecer cultivos en medio Hy-Soy en biorreactores de 10 l. El pH se controló a aproximadamente 7,0 usando NaOH o Na_2CO_3 . Al final del cultivo (indicado por ausencia de aumento adicional en la densidad óptica), los cultivos se trataron con DOC al 0,12 % o con NLS al 0,1 %. Los cultivos se incubaron durante 12-16 horas. La eficacia de eliminación celular se confirmó sembrando una muestra de caldo tratado en placas de agar con sangre-TSA. El polisacárido se purificó del lisado aclarado usando procedimientos convencionales (como se describe anteriormente). El polisacárido purificado se examinó usando una diversidad de técnicas analíticas convencionales apropiadas para determinar la pureza e identidad del material.

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

55

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

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

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

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

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

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

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

Compuesto	Cambio en la DO ₆₀₀			
	R6X	R6X $\Delta lytA$	D39	D39 $\Delta lytA$
Blanco				
Sin adición				
Agua	-8 %	-8 %	3 %	-8 %
Ácido desoxicólico, 0,1 %	103 %	20 %	101 %	41 %
SDS, 0,1 %	102 %	-13 %	100 %	16 %
N-lauril sarcosina, 0,1 %	102 %	-40 %	101 %	14 %
Triton® X-100, 0,1 %	101 %	-19 %	100 %	4 %
Tween 20, 0,1 %	6 %	-17 %	-5 %	-3 %
Ácido octanosulfónico, 0,1 %	13 %	3 %	18 %	-3 %

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

20 Comparación de PS lisado con DOC a PS lisado con NLS

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

- 25 Se midieron el rendimiento de PS, las relaciones de proteína/PS, las relaciones de NA/PS y el peso molecular de PS como se describe anteriormente, y los resultados se resumen en la Tabla 19. Estos resultados mostraron que el uso

de NLS como agente lítico en los procedimientos de purificación de la invención producía rendimientos relativamente altos de PS con niveles relativamente bajos de proteínas y de ácido nucleicos. De hecho, para la mayoría de los serotipos ensayados, el uso de NLS como agente lítico producía mayores rendimientos de PS en comparación con el uso de DOC.

5

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

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

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

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

Las realizaciones particulares de la invención se exponen en los siguientes párrafos numerados:

1. Un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares sustancialmente purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae*, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

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

mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados en forma de una solución.

2. El procedimiento del párrafo 1, en el que el serotipo seleccionado de *Streptococcus pneumoniae* se selecciona del grupo que consiste en 1, 4,5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

35 3. El procedimiento del párrafo 1 o 2, en el que el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5.

4. El procedimiento del párrafo 1, 2 o 3, en el que la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5.

5. El procedimiento del párrafo 1, 2 o 3, en el que la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5.

40 6. El procedimiento del párrafo 1, 2 o 3, en el que la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH hasta

aproximadamente 7,4.

7. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1 a 6, en el que la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido de la etapa (d).
- 5 8. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1 a 7, en el que la etapa (g) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f).
9. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1 a 8, en el que el filtro de carbono activado de la etapa (g) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera.
10. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1 a 9, en el que la etapa (f) comprende mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas.
- 10 11. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1 a 10, en el que el agente lítico de la etapa (b) es desoxicolato sódico.
12. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1 a 10, en el que el agente lítico de la etapa (b) es un agente lítico de origen no animal.
- 15 13. El procedimiento del párrafo 12, en el que dicho agente lítico de origen no animal se selecciona del grupo que consiste en: ácido decanosulfónico, terc-octilfenoxi poli(oxietileno)etanolos; condensados de octilfenol y óxido etileno, N-lauril sarcosina sódica (NLS), iminodipropionato de laurilo, dodecil sulfato sódico, quenodesoxicolato, hiodesoxicolato, glicodesoxicolato, taurodesoxicolato, tauroquenodesoxicolato y colato.
14. El procedimiento del párrafo 12, en el que dicho agente lítico de origen no animal es N-lauril sarcosina sódica.
- 20 15. Un procedimiento para producir polisacáridos capsulares sustancialmente purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* que comprenden el serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F;
- 25 (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
- (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a temperatura ambiente a pH neutro en medio sin sal para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido,
- 30 (e) disminuir el pH del retenido sin sal de la etapa (d) hasta menos de 4,5 usando un ácido orgánico o uno mineral para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, formando de ese modo una solución acidificada de retenido;
- (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
- 35 (g) filtrar la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) a través de un filtro de carbono activado;
- (h) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (g), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
- 40 (i) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (h) usando un filtro estéril;
- mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados que comprenden el serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F en forma de una solución.
16. El procedimiento del párrafo 15, en el que el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5.
- 45 17. El procedimiento del párrafo 15 o 16, en el que la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5.
18. El procedimiento del párrafo 15 o 16, en el que la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5.
19. El procedimiento del párrafo 15 o 16, en el que la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH hasta aproximadamente 7,4.
- 50 20. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 15 a 19, en el que la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido sin sal de la etapa (d).
21. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 15 a 20, en el que la etapa (g) retira al menos el 90 % de las

proteínas de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f).

22. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 15 a 21, en el que el filtro de carbono activado de la etapa (g) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera.

5 23. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 15 a 22, en el que el agente lítico de la etapa (b) es desoxicolato sódico.

24. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 15 a 22, en el que el agente lítico de la etapa (b) es un agente lítico de origen no animal.

10 25. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho agente lítico de origen no animal se selecciona del grupo que consiste en: ácido decanosulfónico, terc-octilfenoxi poli(oxietileno)etanolos; condensados de octilfenol y óxido etileno, N-lauril sarcosina sódica (NLS), iminodipropionato de laurilo, dodecil sulfato sódico, quenodesoxicolato, hiodesoxicolato, glicodesoxicolato, taurodesoxicolato, tauroquenodesoxicolato y colato.

26. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho agente lítico de origen no animal es N-lauril sarcosina sódica.

27. Un procedimiento para producir polisacáridos capsulares sustancialmente purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* que comprenden el serotipo 19A, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

15 (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A;

(b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;

20 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;

(d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a aproximadamente 4 °C a un pH de aproximadamente 6 en tampón fosfato sódico para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido;

25 (e) disminuir el pH del retenido de la etapa (d) hasta menos de 4,5 usando un ácido orgánico o uno mineral para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, formando de ese modo una solución acidificada de retenido;

(f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a aproximadamente 4 °C para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;

30 (g) ajustar el pH de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) hasta aproximadamente 6, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido de pH ajustado;

(h) filtrar la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g) a través de un filtro de carbono activado;

35 (i) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (h), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y

(j) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (i) usando un filtro estéril;

mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares sustancialmente purificados que comprenden el serotipo 19A en forma de una solución.

28. El procedimiento del párrafo 27, en el que el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5.

40 29. El procedimiento del párrafo 27 o 28, en el que la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5.

30. El procedimiento del párrafo 27 o 28, en el que la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5.

31. El procedimiento del párrafo 27 o 28, en el que la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH hasta aproximadamente 7,4.

45 32. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 27 a 31, en el que la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido de la etapa (d).

33. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 27 a 32, en el que la etapa (h) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g).

50 34. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 27 a 33, en el que el filtro de carbono activado de la etapa (h) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera.

35. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 27 a 34, en el que el tampón fosfato sódico de la etapa (d) es fosfato sódico 25 mM.

36. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 27 a 35, en el que el agente lítico de la etapa (b) es desoxicolato sódico.
37. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 27 a 35, en el que el agente lítico de la etapa (b) es un agente lítico de origen no animal.
- 5 38. El procedimiento del párrafo 37, en el que dicho agente lítico de origen no animal se selecciona del grupo que consiste en: ácido decanosulfónico, terc-octilfenoxi poli(oxietilen)etanoles; condensados de octilfenol y óxido etileno, N-lauril sarcosina sódica (NLS), iminodipropionato de laurilo, dodecil sulfato sódico, quenodesoxicolato, hiodesoxicolato, glicodesoxicolato, taurodesoxicolato, tauroquenodesoxicolato y colato.
39. El procedimiento del párrafo 37, en el que dicho agente lítico de origen no animal es N-lauril sarcosina sódica.
- 10 40. Un procedimiento de fabricación de una vacuna de neumococos, que comprende producir polisacáridos capsulares sustancialmente purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* por un procedimiento como se describe en uno cualquiera de los párrafos 1 a 39 y usando dichos polisacáridos capsulares purificados en la fabricación de una vacuna de neumococos.
- 15 41. El procedimiento como se describe en la reivindicación 40 en el que la vacuna de neumococos contiene polisacárido conjugado con un vehículo proteico.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae*, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

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

mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares purificados en forma de una solución.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el serotipo seleccionado de *Streptococcus pneumoniae* se selecciona del grupo que consiste en 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende las etapas de:

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

45 mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares purificados que comprenden el serotipo 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F en forma de una solución.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, 2, 3 o 4 en el que la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5, preferentemente en el que la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5, incluso más preferentemente en el que la diafiltración de la etapa (h) comprende un ajuste de pH hasta aproximadamente 7,4.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido de la etapa (d).

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa (g) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f).

55

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el filtro de carbono activado de la etapa (g) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa (f) comprende mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas.
- 5 10. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende células bacterianas que producen *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A;
 - (b) lisar las células bacterianas en la etapa (a) con un agente lítico, produciendo de ese modo un lisado celular que comprende desechos celulares, proteínas solubles, ácidos nucleicos y polisacáridos;
 - 10 (c) aclarar el lisado celular de la etapa (b) usando centrifugación o filtración para retirar los desechos celulares, produciendo de ese modo un lisado celular aclarado;
 - (d) ultrafiltrar y diafiltrar el lisado celular aclarado de la etapa (c) a aproximadamente 4 °C a un pH de aproximadamente 6 en tampón fosfato sódico para retirar las impurezas de bajo peso molecular y aumentar la concentración de polisacárido, produciendo de ese modo un retenido;
 - 15 (e) disminuir el pH del retenido de la etapa (d) hasta menos de 4,5 usando un ácido orgánico o uno mineral para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos, formando de ese modo una solución acidificada de retenido;
 - (f) mantener la solución acidificada de retenido formada en la etapa (e) durante al menos 2 horas a aproximadamente 4 °C para permitir la sedimentación del precipitado, seguido por filtración o centrifugación de la solución acidificada de retenido, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido;
 - 20 (g) ajustar el pH de la solución aclarada de polisacárido de la etapa (f) hasta aproximadamente 6, produciendo de ese modo una solución aclarada de polisacárido de pH ajustado;
 - (h) filtrar la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g) a través de un filtro de carbono activado;
 - 25 (i) ultrafiltrar y diafiltrar la solución filtrada producida por la etapa (h), produciendo de ese modo una solución concentrada de polisacárido purificado; y
 - (j) filtrar la solución concentrada de polisacárido purificado producida por la etapa (i) usando un filtro estéril;
- mediante lo cual se producen polisacáridos capsulares purificados que comprenden el serotipo 19A en forma de una solución.
- 30 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el pH de la etapa (e) se disminuye hasta aproximadamente 3,5.
12. El procedimiento de la reivindicación 10 u 11, en el que la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5, preferentemente en el que la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH entre aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5, incluso más preferentemente en el que la diafiltración de la etapa (i) comprende un ajuste de pH hasta aproximadamente 7,4.
- 35 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la etapa (e) retira al menos el 98 % de las proteínas del retenido de la etapa (d).
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que la etapa (h) retira al menos el 90 % de las proteínas de la solución aclarada de polisacárido de pH ajustado de la etapa (g).
- 40 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el filtro de carbono activado de la etapa (h) comprende carbono activado con ácido fosfórico basado en madera.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que el tampón fosfato sódico de la etapa (d) es fosfato sódico 25 mM.
17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el agente lítico de la etapa (b) es desoxicolato sódico.
- 45 18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el agente lítico de la etapa (b) es un agente lítico de origen no animal, preferentemente en el que dicho agente lítico de origen no animal se selecciona del grupo que consiste en: ácido decanosulfónico, terc-octilfenoxi poli(oxi-etileno)etanolos; condensados de octilfenol y óxido etileno, N-lauril sarcosina sódica (NLS), iminodipropionato de laurilo, dodecil sulfato sódico, quenodesoxicolato, hiodesoxicolato, glicodesoxicolato, taurodesoxicolato, tauroquenodesoxicolato, y colato, incluso más preferentemente en el que dicho agente lítico de origen no animal es N-lauril sarcosina sódica.
- 50 19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicho ácido mineral se selecciona del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido sulfúrico.
20. Un procedimiento de fabricación de una vacuna de neumococos, que comprende producir polisacáridos capsulares purificados a partir de un lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* por un procedimiento reivindicado

en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y usando dichos polisacáridos capsulares purificados en la fabricación de una vacuna de neumococos.

21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la vacuna de neumococos contiene polisacárido conjugado con un vehículo proteico.

Figura 1

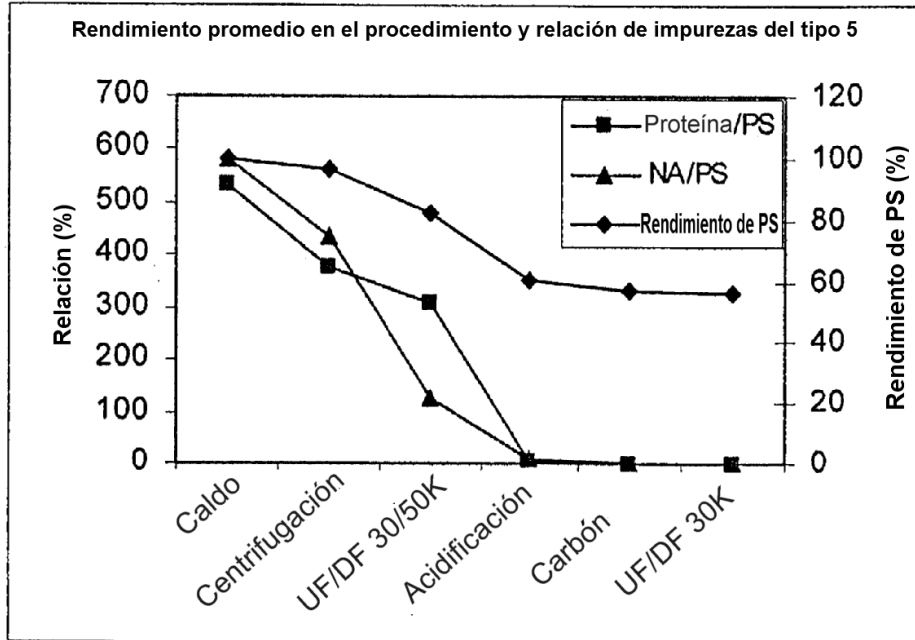
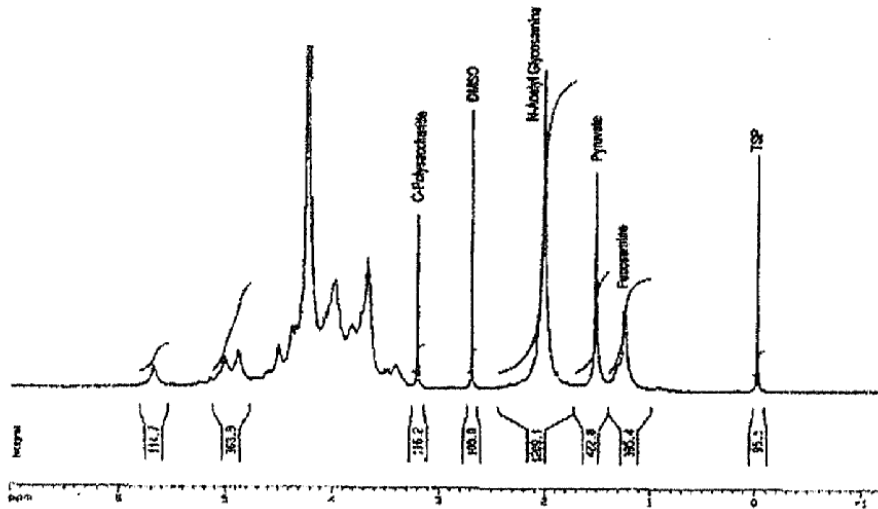


Figura 2

A.

Polisacárido de Pneumocóxico Serotipo 4



B.

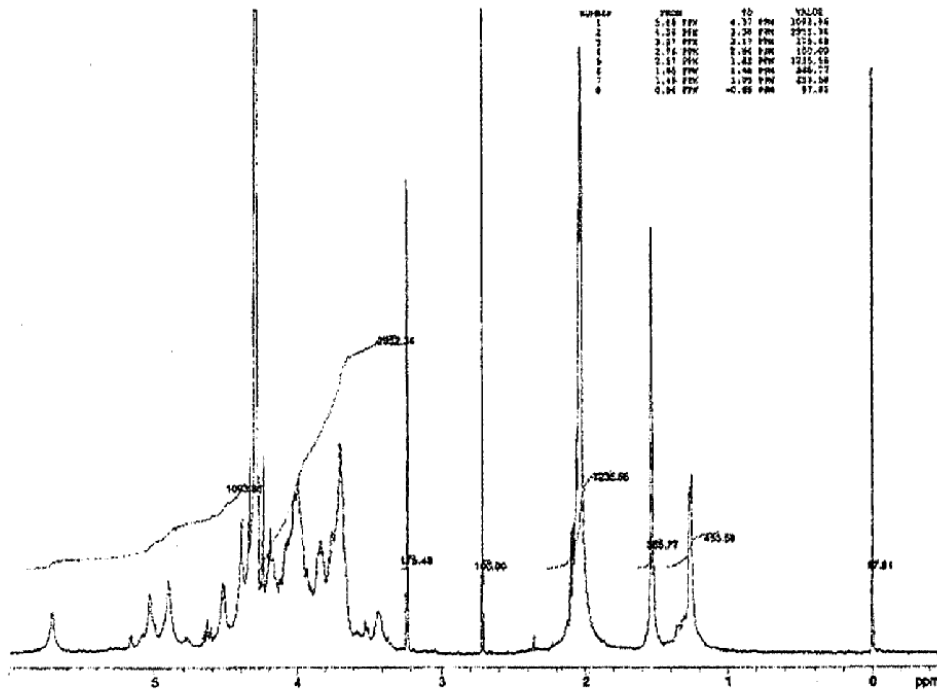


Figura 3

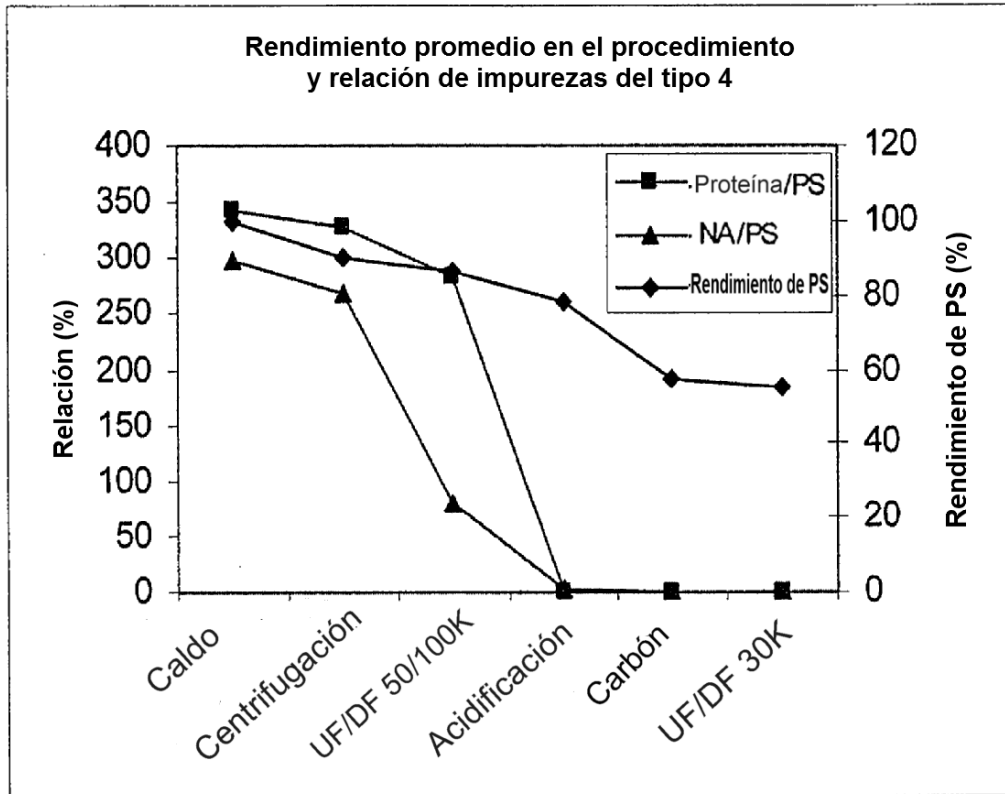


Figura 4

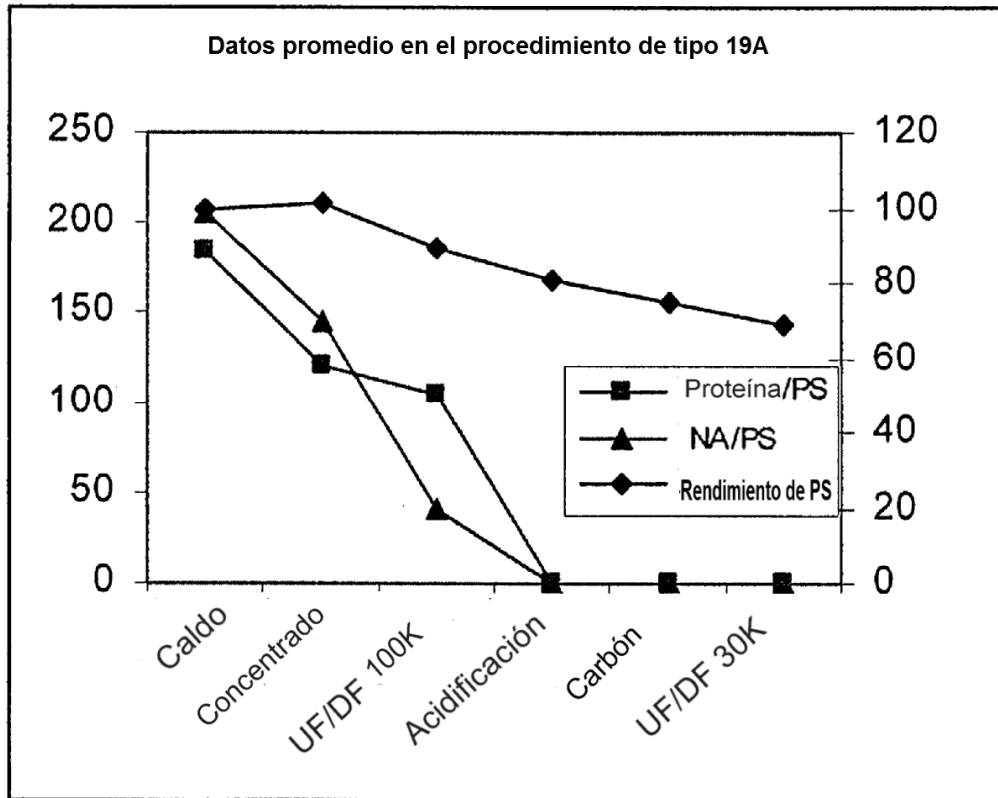


Figura 5

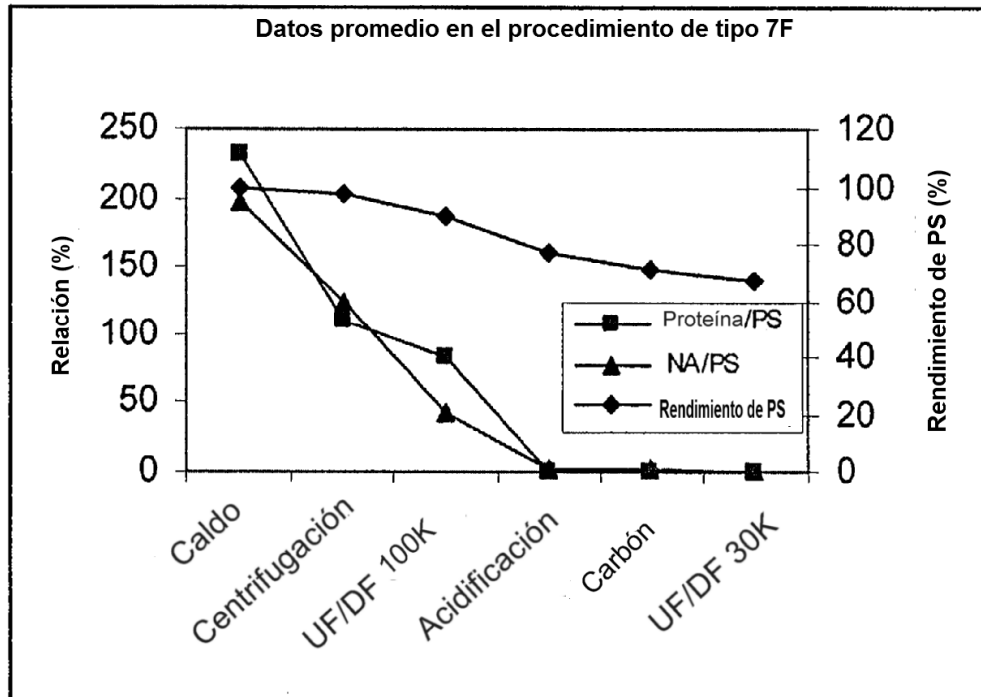


Figura 6

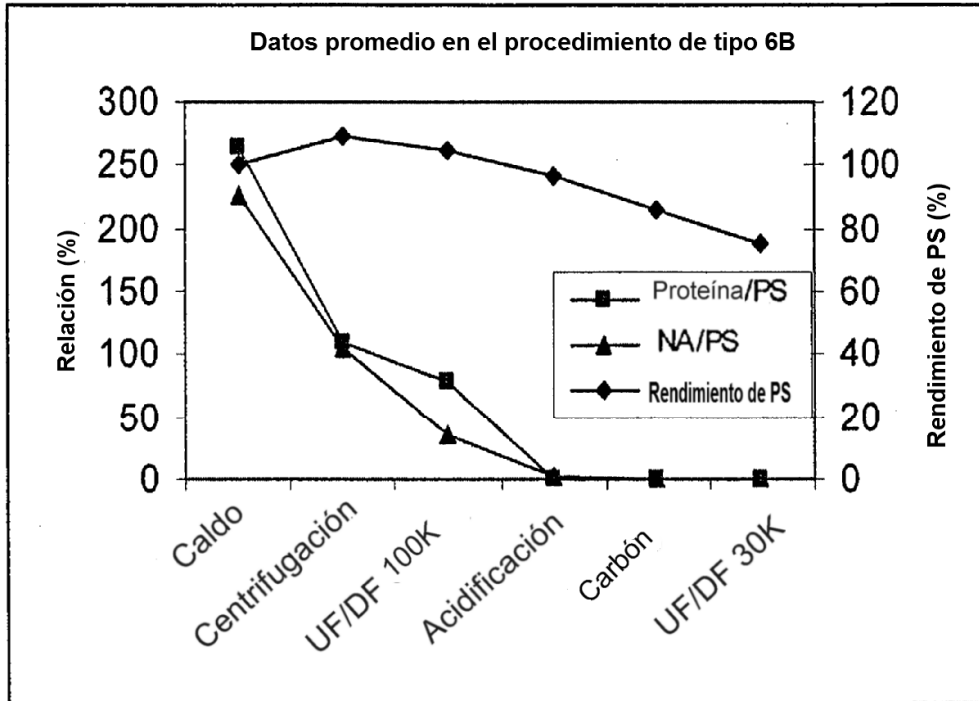


Figura 7

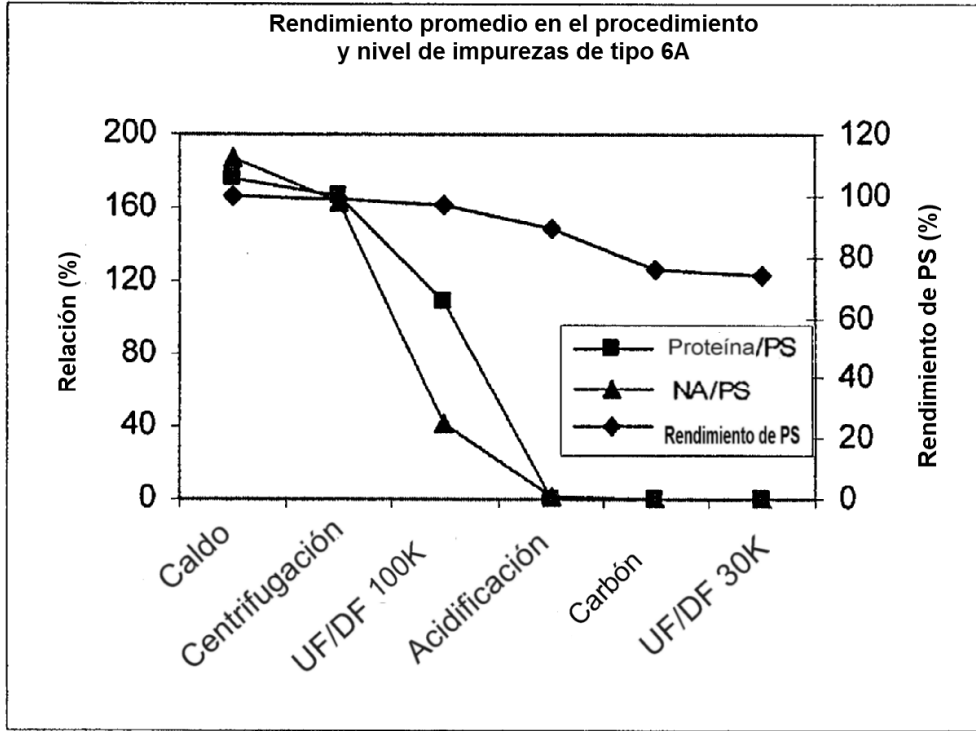


Figura 8

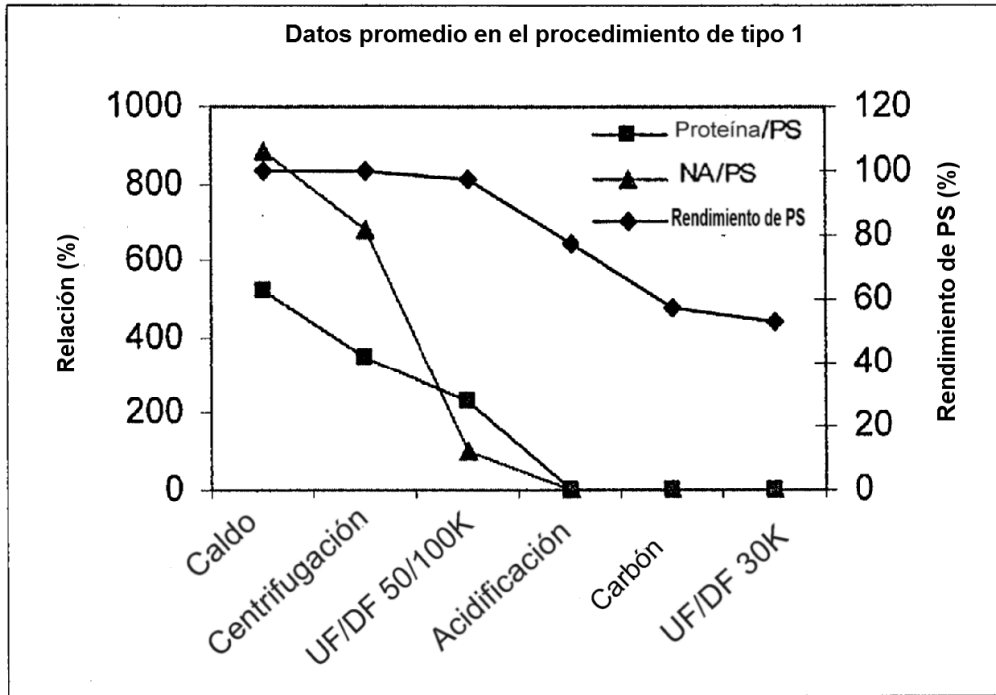


Figura 9

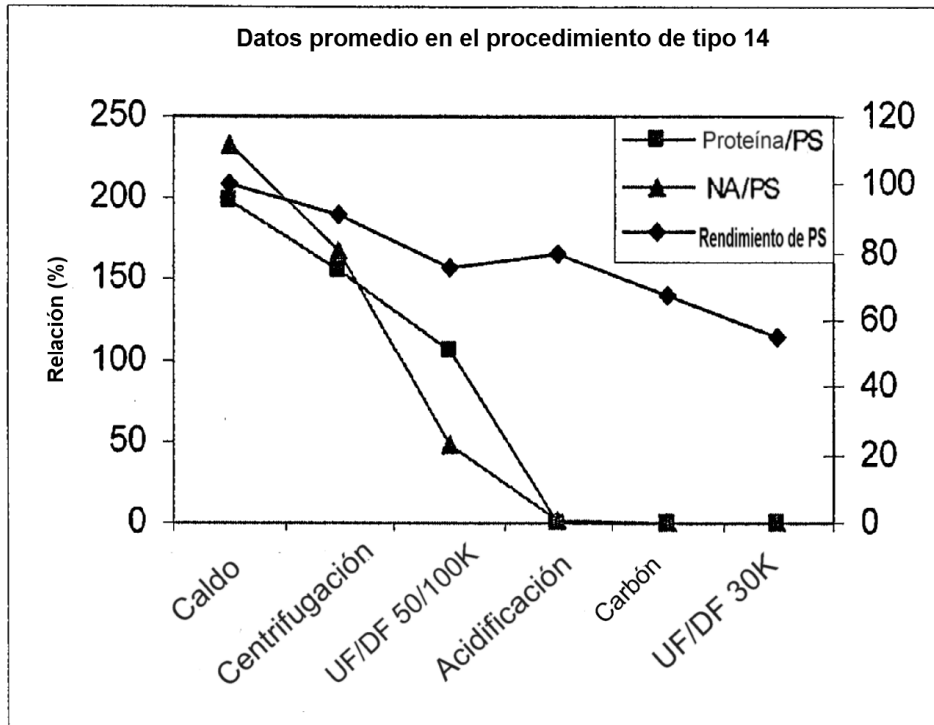


Figura 10

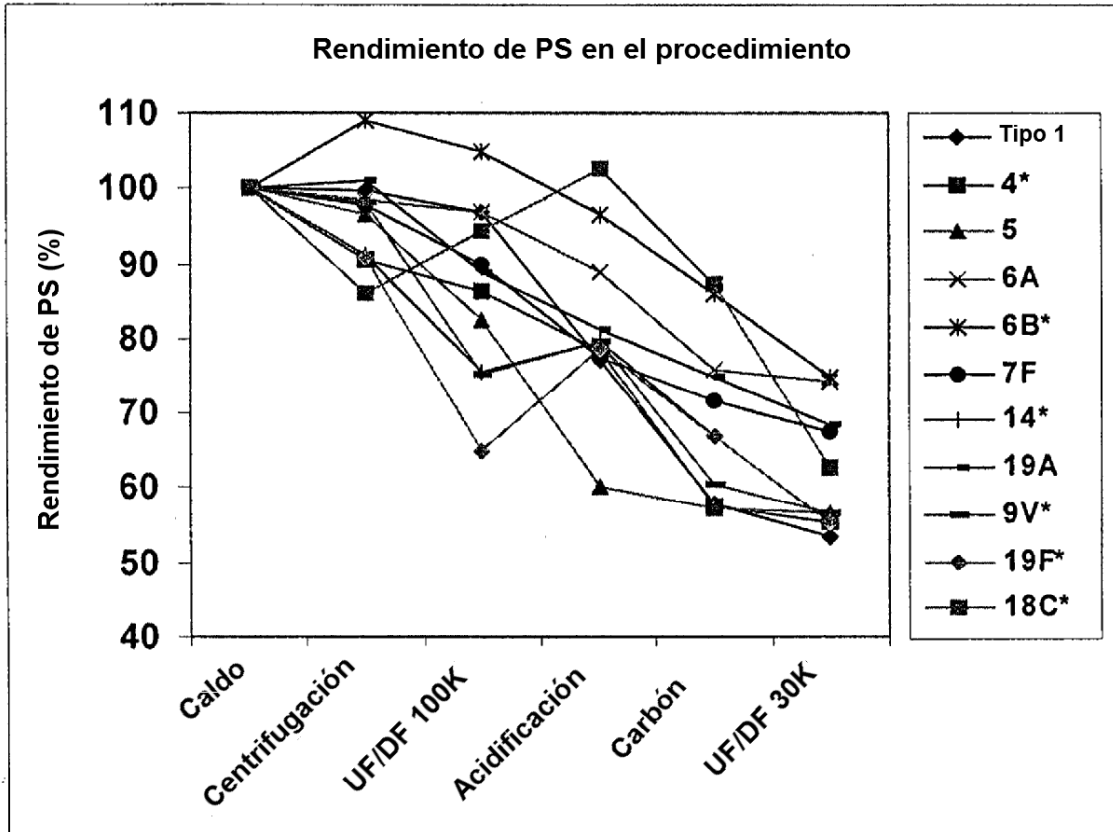


Figura 11

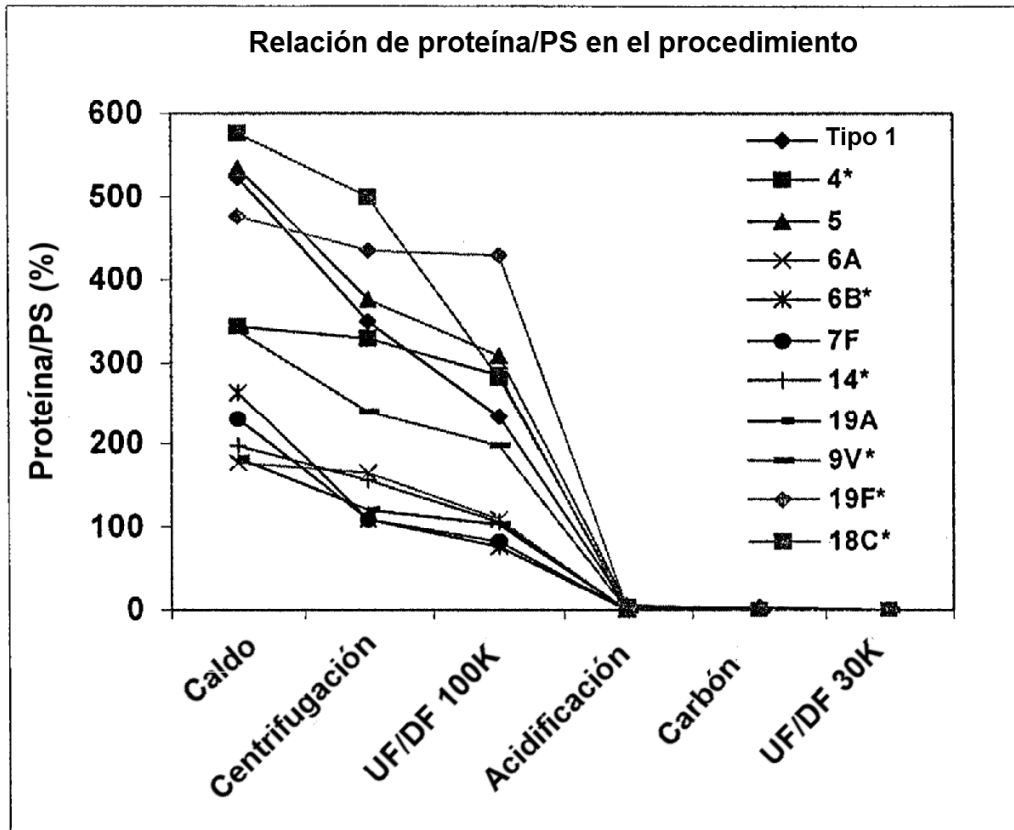


Figura 12

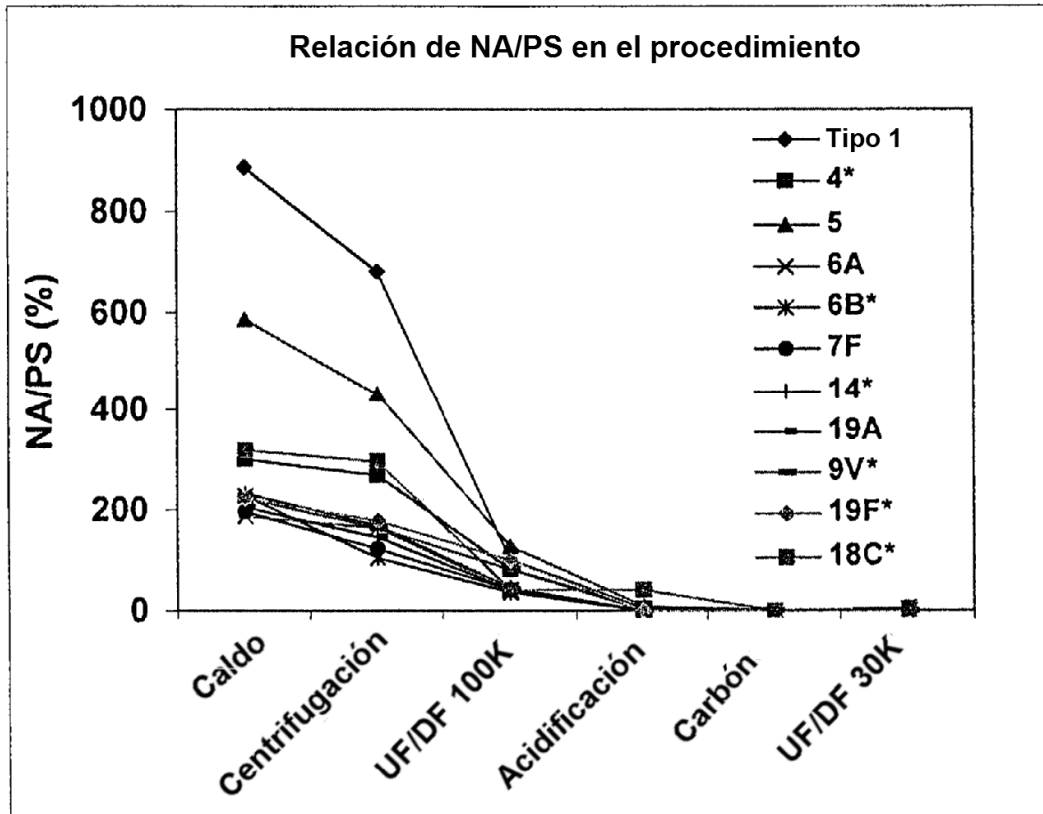


Figura 13

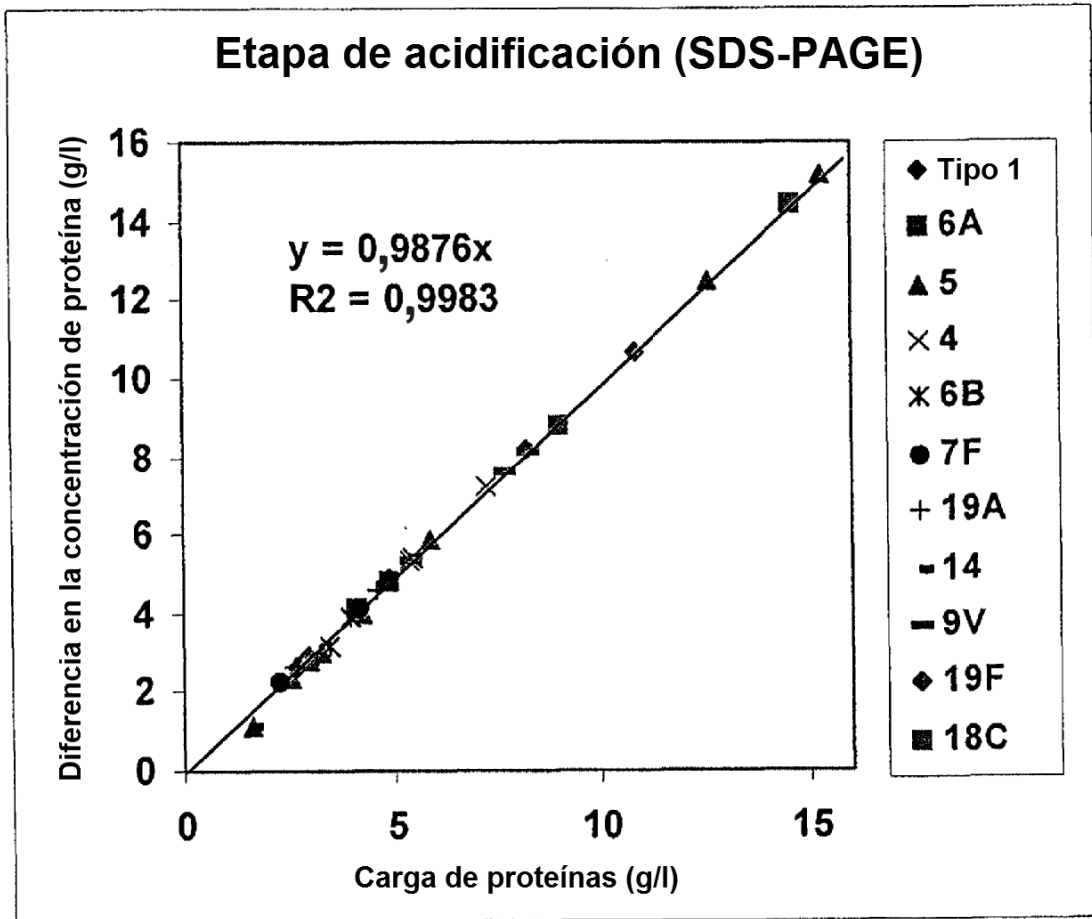


Figura 14

