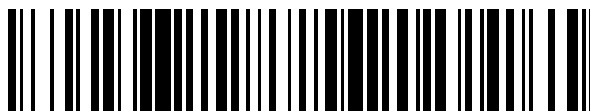


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 202**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2006** **PCT/US2006/012134**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2006** **WO06110352**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2006** **E 06740302 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 1866342**

54 Título: **Separación de contaminantes de polisacárido de Streptococcus pneumoniae por manipulación del pH**

30 Prioridad:

**08.04.2005 US 669546 P**

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

**02.04.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAHLER, BRIAN;**  
**LEE, TSU-SHUN;**  
**LOTVIN, JASON, ARNOLD;**  
**RUPPEN, MARK, EDWARD y**  
**CHARBONNEAU, PAMELA, SUE, FINK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 707 202 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

Separación de contaminantes de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* por manipulación del pH

**Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para eliminar el exceso de proteína soluble de lisados celulares de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) utilizados en la producción de polisacáridos neumocócicos.

El polisacárido capsular para cada serotipo de *S. pneumoniae* utilizado para productos vacunales se produce cultivando el organismo en un medio líquido complejo. La población del organismo a menudo se ajusta desde un vial de siembra a frascos de siembra y se realizan pases a través de uno o más fermentadores de siembra de volumen creciente hasta que se alcanzan los volúmenes de fermentación a una producción a escala. El final del ciclo de cultivo puede determinarse mediante uno de diversos medios, punto en el cual se produce la lisis de las células a través de la adición de un detergente que ayuda a degradar la pared celular y a la liberación de la autolisina que causa la lisis celular cuando las células alcanzan la fase estacionaria. El caldo del lisado se recoge después para su procesamiento aguas abajo (purificación). Esta purificación incluye diversas etapas de cromatografía en columna y diafiltración para recuperar el polisacárido capsular que rodea las células bacterianas. Cuando el polisacárido se conjuga con una proteína de alto peso molecular, tal como CRM<sub>197</sub>, y se formula en una vacuna que contiene conjugados de serotipos múltiples, ayuda a conferir inmunidad (contra *S. pneumoniae*) cuando se inyecta en la población diana, tal como, por ejemplo, bebés y niños pequeños.

Para reducir el riesgo de que se produzcan acontecimientos adversos producidos por la vacuna, se han establecido especificaciones en cuanto al contenido de proteínas en el polisacárido purificado de cada serotipo. Por ejemplo, en la vacuna neumocócica conjugada heptavalente (7vPnC) comercializada actualmente (Prenar®), la especificación para el contenido de proteínas en el polisacárido de serotipo 4 purificado, no supera el 3 %, y para el polisacárido de serotipo 6B purificado no supera el 2 % en peso seco.

En algunos casos, ha resultado difícil retirar la proteína residual que sigue presente después de todo el procesamiento de purificación. Los esfuerzos realizados para abordar este problema a través de cambios en el proceso de purificación del lisado celular solo tuvieron un éxito moderado.

Por lo tanto, se decidió acometer este problema en el lado aguas arriba del procedimiento. Se determinó que las proteínas contaminantes clave eran críticas para el crecimiento y la integridad celular. Por lo tanto, las opciones restantes disponibles para reducir la proteína total consistieron en alterar el crecimiento y/o las condiciones de recogida.

El procedimiento de fermentación es bastante sencillo. Las células (semillas) se expanden en frascos de medios basados en soja, y después se transfieren a través de uno o dos fermentadores de semillas, y finalmente se transfieren a un fermentador de producción a escala. En cada etapa, la temperatura y el pH se controlan de cerca, y el pH se controla mediante la adición de un material base (carbonato de sodio al 20 %). Cuando el crecimiento alcanza un punto determinado, el ciclo finaliza con la introducción de un detergente, tal como desoxicolato (DOC) de sodio, que inicia un proceso de lisis celular. Después de un período de mantenimiento, el pH del caldo del lisado se ajusta a 6,6 para precipitar los complejos de membrana celular y desoxicolato. Este material se mantiene hasta que pueda llevarse a cabo el procesamiento por centrifugación y filtración para retirar los sólidos.

Sin embargo, una gran cantidad de proteínas permanecen solubilizadas en el lisado aclarado, lo que hace que el contenido de proteína residual en el polisacárido purificado supere la especificación. Por lo tanto, existe una necesidad de reducir los niveles de proteína soluble en varios serotipos neumocócicos durante el procedimiento de fermentación o purificación.

El documento EP 0 024 493 A2 desvela un procedimiento para la preparación y la purificación del polisacárido capsular neumocócico.

**Sumario de la invención**

La presente invención satisface esta necesidad proporcionando un procedimiento para reducir el contenido de proteína y preservando el contenido de polisacárido capsular en un caldo de lisado celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de la purificación. Este procedimiento comprende las etapas de:

- (a) expandir en volúmenes crecientes desde un recipiente de partida a un recipiente de producción a escala en un medio basado en soja, un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado, y mantener un pH y una temperatura estables durante el crecimiento celular;
- (b) lisar con un detergente, las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado celular que contiene proteínas solubles, residuos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para garantizar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;

- (d) reducir el pH del lisado celular a menos de 5,5 para precipitar el detergente y la mayoría de las proteínas solubles;
- (e) mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y
- (f) procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, mediante lo cual el polisacárido capsular se preserva en solución y la proteína soluble se reduce de manera eficaz.

Son ejemplos no limitantes de serotipos de *S. pneumoniae*, seleccionados para esta realización de la invención, los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F y 19A. En una realización particular de la invención, y dependiendo del serotipo que se vaya a cultivar en la etapa (a), el pH de la fermentación en la etapa (a) se mantiene mediante un suministro base de hidróxido de sodio, carbonato de sodio o una combinación de los mismos. En otra realización, el pH en la etapa (d) se reduce a un pH de entre 4,5 y menor de 5,5. En otra realización más, el detergente es desoxicolato sódico.

En otra realización adicional, cuando el serotipo es el serotipo 5 o 19A, el medio basado en soja se complementa con bicarbonato sódico.

Esta invención permite retirar del lisado celular, grandes cantidades de exceso de contaminación proteica, dejando así un producto más esterilizado (*Cell Free Broth* o CFB, caldo sin células) para la purificación que generalmente obtendrá una mayor recuperación de polisacáridos y rendimientos totales de polisacáridos de lo que era posible utilizando el procedimiento de fermentación y recuperación anterior.

### **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un gel para electroforesis (PAGE) con SDS que muestra la disminución significativa de la proteína soluble en gramos por litro de lisado a medida que disminuye el pH con ácido acético para *S. pneumoniae* Tipo 4. Los componentes de 39 kDa y 48 kDa son proteínas de la superficie de la pared celular. También se muestra el rendimiento de polisacárido.

La figura 2 es una gráfica de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 6B de ajuste de pH hasta pH 5 que muestra la reducción de proteínas determinada con SDS-PAGE y el rendimiento de polisacárido (Ps) determinado con HPLC-SEC con detector de índice de refracción (IR).

La figura 3 es una gráfica de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 1 de ajuste de pH hasta pH 5 que muestra la reducción de proteínas, determinada con SDS-PAGE, y el rendimiento de polisacárido (Ps), determinado con HPLC-SEC con detector de índice de refracción (IR)

La figura 4 es una gráfica de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 5 de ajuste de pH hasta pH 4,1 que muestra la reducción de proteínas determinada con SDS-PAGE y el rendimiento de polisacárido determinado con HPLC-SEC con detector de IR.

La figura 5 es una gráfica de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 6A de ajuste de pH hasta pH 4,5 de dos ciclos de fermentación diferentes, que muestra la reducción de proteínas, determinada con SDS-PAGE, y el rendimiento de polisacárido, determinado con HPLC-SEC con detector de IR.

La figura 6 es una gráfica de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 7F de ajuste de pH hasta pH 4,8 que muestra la reducción de proteínas, determinada con SDS-PAGE y el rendimiento de polisacárido determinado con HPLC-SEC con detector de IR.

### **Descripción detallada de la invención**

*Streptococcus pneumoniae* es un coco Gram positivo con forma de lanceta, que generalmente se diferencia en pares (diplococos), pero también en cadenas cortas o como células individuales. Crecen fácilmente en placas de agar con sangre con colonias brillantes y muestran hemólisis alfa, a menos que se cultiven en condiciones anaerobias donde muestran hemólisis beta. Son sensibles a las sales biliares que pueden degradar la pared celular con la presencia de la enzima propia de las células, la autolisina. El organismo es un anaerobio aerotolerante y es exigente porque tiene requerimientos nutricionales complejos.

Las células de la mayoría de los serotipos neumocócicos tienen una cápsula que es un recubrimiento de polisacárido que rodea a cada célula. Esta cápsula es un determinante de la virulencia en los seres humanos porque interfiere con la fagocitosis al impedir que los anticuerpos se adhieran a las células bacterianas. Actualmente hay 90 serotipos capsulares identificados, con 23 serotipos responsables de aproximadamente el 90 % de las enfermedades invasivas. El recubrimiento de polisacárido como vacuna puede conferir un grado razonable de inmunidad (a *S. pneumoniae*) en individuos con sistemas inmunitarios desarrollados o no deteriorados, pero una proteína conjugada con polisacárido permite una respuesta inmunitaria en bebés y personas de edad avanzada que también tienen mayor riesgo de infecciones neumocócicas. Es importante poder separar este polisacárido capsular de las bacterias lisadas (destruidas) y eliminar la mayor cantidad de desechos celulares que sea posible. Como se describe en el presente documento, esta eliminación se realizó en una serie de cambios en el proceso de fermentación.

Los tres cambios principales que han mejorado en gran medida el procesamiento aguas abajo son los siguientes: (1) cambiar el suministro base de fermentación de carbonato de sodio a hidróxido de sodio cuando sea posible; (2) mantener la agitación en el fermentador durante el intervalo de espera de desoxicolato; y (3) reducir el pH después de que el lisado de desoxicolato se mantenga a menos de 5,5.

- 5 El descubrimiento inicial fue, que al reducir el pH a menos de 5,5, se podía eliminar del 50 % al 90 % de la proteína soluble no deseable, del lisado celular antes del procesamiento (purificación) aguas abajo. Si bien esta fue una mejora muy importante del proceso, el uso de grandes volúmenes de carbonato de sodio para mantener el pH del punto de ajuste durante los ciclos de fermentación, causó un grave problema de formación de espuma cuando el pH se ajustó a 5,0 con ácido acético. También se descubrió que era difícil mantener un pH estable después del ajuste debido a las múltiples formas de carbonato que existen en solución. Esto llevó a observar suministros de base alternativos que no crearían una acumulación de carbonato en el caldo de fermentación. Se seleccionó hidróxido de sodio porque ya se estaba utilizando para ajustar el pH del medio y de los frascos de siembra antes de la inoculación. Estudios de hasta 100 litros de fermentación indicaron que esta era una alternativa viable con solo una reducción menor en el crecimiento, basado en la densidad óptica (DO). Esta base también resolvió el problema de la formación de espuma. Se pueden utilizar otras bases además del hidróxido de sodio, y se puede utilizar bicarbonato de sodio como un complemento cuando se determina que el organismo requiere alguna forma de carbonato para mantener el crecimiento, tal como, por ejemplo, con los serotipos 5 y 19A. Si se utiliza carbonato de sodio como suministro base primario, como para el serotipo 19A, entonces el ajuste del pH posterior al lisado (a un pH inferior a 5,5) requiere una adición lenta de ácido controlada durante varias horas para impedir la formación de espuma.
- 10
- 15
- 20 Finalmente, según la observación de laboratorio, se determinó que si el mantenimiento de desoxicolato procedía sin agitación (como en un protocolo anterior), en las paredes del fermentador y en la sonda de pH se depositaría un precipitado similar a un gel. Esto creó lecturas de pH *in situ* poco fiables cuando se ajustó el pH. La etapa de agitación impidió que se formara este precipitado y permitió mantener la integridad de la sonda de pH.

- 25 Por lo tanto, en la presente invención reivindicada, los serotipos seleccionados de *Streptococcus pneumoniae* se expanden en volúmenes crecientes a partir de viales de siembra de partida en un medio estéril compuesto, por ejemplo, por un producto a base de soja digerido con enzima, cloruro de sodio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de calcio y un aminoácido seleccionado. La dextrosa con sulfato de magnesio se utiliza como fuente de carbono para sostener el crecimiento en el medio líquido. El medio también puede complementarse con otros aditivos, según lo requiera el serotipo o procedimiento específico. El cultivo comienza en un primer recipiente, tal como frascos de siembra, que, después de un intervalo de crecimiento en una incubadora basada en convección, se utiliza para inocular un segundo recipiente, tal como un fermentador de siembra, que a su vez puede utilizarse para inocular, si se desea, al menos un envase cada vez más grande, tal como un fermentador de producción, hasta que se alcance la producción a escala. En una realización, un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado se expande en volúmenes cada vez mayores, desde viales de siembra de partida a frascos de siembra hasta un fermentador de 20 litros a un fermentador de 200 litros a un fermentador de producción de 2000 litros. Los parámetros de crecimiento se controlan de cerca para determinar la densidad óptica, la temperatura y el pH, a fin de determinar cuándo transferir el cultivo a la siguiente escala de fermentación y también determinar cuándo finalizar el ciclo del lote.
- 30
- 35

- 40 Cuando las bacterias entran en la fase estacionaria, las células que están en el fermentador de producción se someten a lisis mediante la adición de un detergente, tal como un detergente aniónico o catiónico. Los ejemplos representativos de dichos detergentes incluyen desoxicolato sódico, N-lauril sarcosina, ácido quenodesoxicólico sódico y saponinas. Después de agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para garantizar la muerte celular completa, por ejemplo, durante un tiempo de entre 8 y 24 horas y a una temperatura de entre 7 °C y 13 °C, la segunda fase del procedimiento es reducir el pH del lisado celular a un pH menor de 5,5 con una solución ácida, tal como ácido acético al 50 %. La reducción real de pH varía según el serotipo con el propósito de poder estar por debajo de la especificación de la proteína purificada final en una base consistente requerida para un procedimiento de producción contundente.
- 45

- 50 La etapa de reducción de pH provoca una "precipitación por salinización" (precipitación) de proteínas anteriormente solubles. Este es un efecto químico muy conocido en las proteínas a medida que alcanzan sus puntos isoeléctricos. Lo que hace que esta etapa sea única en la presente invención es que se está utilizando como una etapa de purificación en un caldo de lisado celular enormemente complejo. El caldo se define como "complejo" porque contiene componentes, ADN, proteínas, polisacáridos, ARN y otros desechos celulares, en el medio.

- 55 Además del ácido acético, se ha demostrado también que el procedimiento reivindicado funciona con ácidos sulfúrico y fosfórico, y debería funcionar con diversas eficiencias siguiendo la serie de Hofmeister de la que forman parte estos ácidos. La serie de Hofmeister es la clasificación de varios aniones y cationes y su capacidad para precipitar mezclas de proteínas. La concentración final de estos compuestos (en la serie de Hofmeister) en solución determina la solubilidad final de las diversas proteínas.

- 60 Después de un tiempo de espera, sin agitación, que es suficiente para permitir la sedimentación del precipitado y así ayudar al proceso de centrifugación continua, tal como, por ejemplo, entre 12 y 24 horas a una temperatura entre 15 °C y 25 °C, una parte significativa de las proteínas previamente solubles (y probablemente algunos de los otros componentes contaminantes previamente solubles) se eliminan de la solución como un precipitado sólido con poca

pérdida o degradación del producto de polisacárido que queda en solución.

Esta solución con el precipitado se procesa después a través de una centrifuga continua o, como alternativa, mediante centrifugación estándar en frasco. El sobrenadante que contiene el polisacárido se recoge y se hace pasar a través de filtración de partículas y micras antes de transferirlo para la concentración y purificación aguas abajo.

- 5 Los resultados del uso del procedimiento de esta invención se representan en las Figuras. La figura 1 muestra un gel para electroforesis (PAGE) con SDS representativo, de la reducción de proteínas observada utilizando ácido acético para reducir el pH de 6,8 a 5,0 en el caldo de lisado celular para el serotipo 4 de *S. pneumoniae*. El carril de la izquierda es un marcador de peso molecular que se utiliza como referencia para el peso de proteínas. El carril de muestra 1 ("C") es un control que no se ajustó al pH. Los números muestran el valor aproximado (g/l en caldo de lisado) de las dos bandas principales de proteínas contaminantes (48 kDa y 39 kDa) y también la proteína total en todo el carril. También se muestra el rendimiento total de polisacárido contenido en una muestra alícuota enviada para el análisis de HPLC-SEC. Los carriles 2-8 muestran la misma información de las muestras de pH ajustado. Los carriles 9-11 son patrones de BSA (albúmina de suero bovino) utilizados para determinar los rendimientos de proteína mediante análisis de regresión lineal básico. El análisis de Ps no se realizó en la muestra de pH 6,8. En este serotipo particular, hubo alguna pérdida moderada de polisacárido (Ps) pero a una tasa mucho más baja que la pérdida de proteína a través de la reducción del pH.

La figura 2 es una representación gráfica que ilustra la reducción de proteínas en el lisado celular de *S. pneumoniae* serotipo 6B junto con la estabilidad del rendimiento del polisacárido cuando el pH del lisado celular se redujo a 5,0. No se observó pérdida de polisacárido con este serotipo. En cambio, la proteína total se redujo en más de la mitad.

- 20 La figura 3 es una representación gráfica que ilustra la reducción de proteínas en el lisado celular de *S. pneumoniae* serotipo 1, junto con la estabilidad del rendimiento del polisacárido cuando el pH del lisado celular se redujo a 5,0. Apenas se observaron cambios en la concentración de polisacárido. En cambio, la proteína total se redujo en más del 90 %.

- 25 La figura 4 es una representación gráfica que ilustra la reducción de proteínas en el lisado celular de *S. pneumoniae* serotipo 5, junto con la estabilidad del rendimiento del polisacárido cuando el pH del lisado celular se redujo a 4,1. Apenas se observaron cambios en la concentración de polisacárido hasta un pH muy bajo, que se atribuyó a un efecto de dilución debido a la cantidad de ácido añadido. En cambio, la proteína total se redujo en más del 75 % a un pH de 4,5.

- 30 La figura 5 es una representación gráfica de dos ciclos de fermentación diferentes que ilustran la reducción de proteínas en el lisado celular de *S. pneumoniae* serotipo 6A, junto con la estabilidad del rendimiento del polisacárido cuando el pH del lisado celular se redujo a 4,5. Apenas se observaron cambios en la concentración de polisacárido. Esta gráfica también muestra que las concentraciones de polisacárido se mantuvieron mientras que las concentraciones de proteína se redujeron cuando se utilizó NaOH en lugar de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

- 35 La figura 6 es una representación gráfica que ilustra la reducción de proteínas en el lisado celular de *S. pneumoniae* serotipo 7F junto con la estabilidad del rendimiento del polisacárido cuando el pH del lisado celular se redujo a 4,8. Apenas se observaron cambios en la concentración de polisacárido. En cambio, la proteína total se redujo en más del 80 % a un pH de 4,8.

La tabla 1 a continuación es representativa de algunas de las reducciones de proteínas y de las ganancias de polisacáridos de los polisacáridos purificados finales después de utilizar el procedimiento de la presente invención.

- 40 Tabla 1. Concentración de proteínas y rendimiento de polisacáridos de diversos serotipos de *S. pneumoniae*

| Serotipo | Especificación de proteínas | Proceso original   |                    | Proceso de la invención |                    |
|----------|-----------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
|          |                             | Conc. de proteínas | Rendimiento del Ps | Conc. de proteínas      | Rendimiento del Ps |
| 1        | ≤2,0 %                      | 11,7 %             | 11,2 g             | <0,8 %                  | 15~20 g            |
| 5        | ≤7,5 %                      | 10,2 %             | 6,0 g              | <6,5 %*                 | 8-13 g             |
| 7F       | ≤5,0 %                      | 0,2 %              | 19,2 g             | 0,2 %                   | 53 g               |
| 6A       | ≤2,0 %                      | NA                 | NA                 | 0,3 %                   | 21,6 g             |

\* El proceso de fermentación mostró una reducción de proteínas del 80 % del material de lisado DOC, pero la eliminación de proteínas adicional no fue tan eficaz durante el proceso de purificación.

- 45 Los cambios en el proceso de fermentación descritos anteriormente, sirvieron para reducir enormemente el contenido de proteínas del caldo de lisado antes del proceso de purificación. Esto ha permitido que el producto purificado cumpla con la especificación de la proteína sin tener que realizar ninguna modificación significativa del proceso de purificación actual para la recuperación de polisacáridos. Un beneficio inesperado de estos cambios fue una mejora en el rendimiento de purificación total del polisacárido del 25-100 % a pesar de un crecimiento ligeramente menor según determinado por la DO. Esta es una mejora contundente del proceso de fermentación/recuperación que puede potenciar enormemente la producción de polisacáridos neumocócicos.

La descripción anterior describe, en general, la presente invención. Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

## Ejemplos

### 5 Ejemplo 1

#### Reducción de proteínas en el lisado celular de los serotipos 1, 6A Y 7F de *S. pneumoniae*

##### Preparación de bancos de células maestras y de trabajo.

El serotipo 1 de *S. pneumoniae* se obtuvo en la American Type Culture Collection, ATCC, cepa 6301. Los serotipos 6A y 7F de *S. pneumoniae* se obtuvieron gracias al Dr. Gerald Shiffman de la Universidad Estatal de Nueva York. Se crearon varias generaciones de reservas de siembra para expandir la cepa y eliminar los componentes de origen animal (generaciones F1, F2 y F3). Se produjeron dos generaciones más de reservas de siembra. La primera generación adicional se realizó desde un vial F3, y la generación posterior se realizó desde un vial de la primera generación adicional. Los viales de siembra se guardaron congelados ( $<-70^{\circ}\text{C}$ ) con glicerol sintético como crioprotector. Además de viales congelados, se prepararon viales liofilizados para la generación F4. Para la preparación del banco de células, todos los cultivos se cultivaron en un medio basado en soja. Antes de la congelación, las células se concentraron por centrifugación, el medio gastado se retiró, y los sedimentos celulares se resuspendieron en medio reciente que contenía un crioprotector, tal como glicerol sintético.

##### Fermentación y Recuperación

Se utilizaron cultivos del banco de células de trabajo para inocular frascos de siembra que contenían un medio basado en soja (Tabla 2). Los frascos se incubaron a  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sin agitación hasta que se cumplieron los requisitos de crecimiento. Se utilizó un frasco de siembra para inocular un fermentador de siembra que contenía el medio basado en soja. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7 con NaOH 3N. Una vez que se alcanzó la densidad óptica diana, se utilizó el fermentador de siembra para inocular el fermentador de producción que contenía el medio basado en soja. El pH se mantuvo con NaOH 3N. La fermentación finalizó después del cese del crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Se añadió una cantidad apropiada de desoxicolato sódico al 12 % estéril al cultivo para obtener una concentración de 0,12 % - 0,13 % en el caldo, para producir la lisis de las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después del lisado, el contenido del fermentador se agitó durante un intervalo de tiempo entre 8 y 24 horas a una temperatura entre  $7^{\circ}\text{C}$  y  $13^{\circ}\text{C}$ , para garantizar que se había producido la lisis celular completa y la liberación de polisacárido. La agitación durante este período de espera impidió que los sedimentos del lisado se asentaran en las paredes del fermentador y en la sonda de pH, lo que permitió mantener la integridad de la sonda de pH. A continuación, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a un pH de aproximadamente 5,0 con ácido acético al 50 %. Después de un tiempo de espera sin agitación, durante un intervalo de tiempo entre 12 y 24 horas a una temperatura entre  $15^{\circ}\text{C}$  y  $25^{\circ}\text{C}$ , una parte significativa de las proteínas previamente solubles se separó de la solución como un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del polisacárido, que quedó en solución. Después, la solución con el precipitado se aclaró por centrifugación de flujo continuo seguido de filtración profunda y microfiltración a  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ .

En una escala más pequeña, el procedimiento descrito anteriormente también produjo una reducción significativa de proteína total para los serotipos 4 y 6B (Figuras 1 y 2), lo que indica que el procedimiento funcionará para estos dos serotipos a mayor escala. (Los serotipos 4 y 6B de *S. pneumoniae* también se obtuvieron gracias al Dr. Gerald Shiffman de la Universidad Estatal de Nueva York).

Tabla 2. Composición de medio basado en soja

| Componente                          | Concentración inicial | Concentración baja | Concentración alta |
|-------------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| HySoy                               | 28 g/l                | 18 g/l             | 38 g/l             |
| NaCl                                | 3,5 g/l               | 3,5 g/l            | 3,5 g/l            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 0,7 g/l               | 0,7 g/l            | 0,7 g/l            |
| CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O | 0,018 g/l             | 0,018 g/l          | 0,018 g/l          |
| L-Cisteína, HCl                     | 0,21 g/l              | 0,21 g/l           | 0,21 g/l           |

### Ejemplo 2

#### Reducción de Proteínas en el lisado celular del serotipo 5 de *S. pneumoniae*

El serotipo 5 de *S. pneumoniae* se obtuvo gracias al Dr. Gerald Schiffman de la Universidad Estatal de Nueva York, Brooklyn, NY. Para la preparación del sistema de banco de células, véase el Ejemplo 1.

### Fermentación y Recuperación

Los cultivos del banco de células de trabajo se utilizaron para inocular frascos de siembra que contenían el medio basado en soja descrito anteriormente (Tabla 2), cuyo medio se complementó con una solución de  $\text{NaHCO}_3$  estéril a una concentración 10 mM. Los frascos se incubaron a  $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  sin agitación hasta que se cumplieron los requisitos de crecimiento. Se utilizó un frasco de siembra para inocular un fermentador de siembra que contenía el medio basado en soja con una concentración de  $\text{NaHCO}_3$  10 mM en el medio. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con NaOH 3N. Una vez que se alcanzó la densidad óptica diana, se utilizó el fermentador de siembra para inocular el fermentador de producción que contenía el medio basado en soja con una concentración de  $\text{NaHCO}_3$  10 mM en el medio. El pH se mantuvo con NaOH 3N. La fermentación finalizó después del cese del crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Se añadió una cantidad apropiada de desoxicolato sódico al 12 % estéril al cultivo para obtener una concentración de 0,12 % - 0,13 % en el caldo, para producir la lisis de las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después de la lisis, el contenido del fermentador se agitó durante un intervalo de tiempo comprendido entre 8 y 24 horas a una temperatura entre  $7^\circ\text{C}$  y  $13^\circ\text{C}$ , para garantizar que se había producido la lisis celular completa y la liberación de polisacárido. La agitación durante este período de espera impidió que los sedimentos del lisado se asentaran en las paredes del fermentador y en la sonda de pH, lo que permitió mantener la integridad de la sonda de pH. A continuación, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a un pH de aproximadamente 4,8 con ácido acético al 50 %. Después de un tiempo de espera sin agitación, durante un intervalo de tiempo entre 12 y 24 horas a una temperatura entre  $15^\circ\text{C}$  y  $25^\circ\text{C}$ , una parte significativa de las proteínas previamente solubles se separó de la solución como un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del polisacárido, que quedó en solución. Después, la solución con el precipitado se aclaró por centrifugación de flujo continuo seguido de filtración profunda y microfiltración a  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ .

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de reducción del contenido de proteínas y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de lisado celular complejo de *Streptococcus pneumoniae*, antes de la purificación, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 5 (a) expandir en volúmenes crecientes, desde un recipiente de partida a un recipiente de producción a escala, en un medio basado en soja, un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado, y mantener un pH y una temperatura estables durante el crecimiento celular;
- (b) lisar con un detergente, las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado que contiene proteínas solubles, residuos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- 10 (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para garantizar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;
- (d) reducir el pH del lisado celular a menos de 5,5 para precipitar el detergente y la mayoría de las proteínas solubles;
- 15 (e) mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y (f) procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, mediante lo cual el polisacárido capsular se preserva en solución y la proteína soluble se reduce de manera eficaz.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el serotipo seleccionado de *S. pneumoniae* es 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F o 19A.

20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH en la etapa (a) se mantiene mediante un suministro base de hidróxido de sodio, carbonato de sodio o una combinación de los mismos.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 25 (a) expandir en volúmenes crecientes, desde un recipiente de partida a un recipiente de producción a escala, en un medio basado en soja, un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B y 7F y mantener un pH y una temperatura estables durante el crecimiento celular, manteniéndose el pH con hidróxido de sodio;
- (b) lisar con un detergente, las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado que contiene proteínas solubles, residuos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- 30 (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para garantizar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;
- (d) reducir el pH del lisado celular a menos de 5,5 para precipitar el detergente y la mayoría de las proteínas solubles;
- (e) mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y
- 35 (f) procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, mediante lo cual el polisacárido capsular se preserva en solución y la proteína soluble se reduce de manera eficaz.

5. El procedimiento según la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 40 (a) expandir en volúmenes crecientes, desde un recipiente de partida a un recipiente de producción a escala, en un medio basado en soja, complementado con bicarbonato de sodio, un serotipo 5 de *S. pneumoniae*, y mantener un pH y una temperatura estables durante el crecimiento celular, manteniéndose el pH con hidróxido de sodio;
- (b) lisar con un detergente, las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado que contiene proteínas solubles, residuos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- 45 (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para garantizar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;
- (d) reducir el pH del lisado celular a menos de 5,5 para precipitar el detergente y la mayoría de las proteínas solubles;
- (e) mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y
- 50 (f) procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, mediante lo cual el polisacárido capsular se preserva en solución y la proteína soluble se reduce de manera eficaz.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 55 (a) expandir en volúmenes crecientes, desde un recipiente de partida a un recipiente de producción a escala, en un medio basado en soja, complementado con bicarbonato de sodio, un serotipo 19A de *S. pneumoniae*, y mantener un pH y una temperatura estables durante el crecimiento celular; manteniéndose el pH con carbonato de sodio.
- (b) lisar con un detergente, las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado que contiene proteínas solubles, residuos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;

- (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para garantizar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;
  - (d) reducir el pH del lisado celular a menos de 5,5 para precipitar el detergente y la mayoría de las proteínas solubles;
  - 5 (e) mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y (f) procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, mediante lo cual el polisacárido capsular se preserva en solución y la proteína soluble se reduce de manera eficaz.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5, o 6, en el que el detergente es desoxicolato sódico.
- 10 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5, o 6, en el que en la etapa (d) el pH se reduce a entre 4,5 y menos de 5,5.

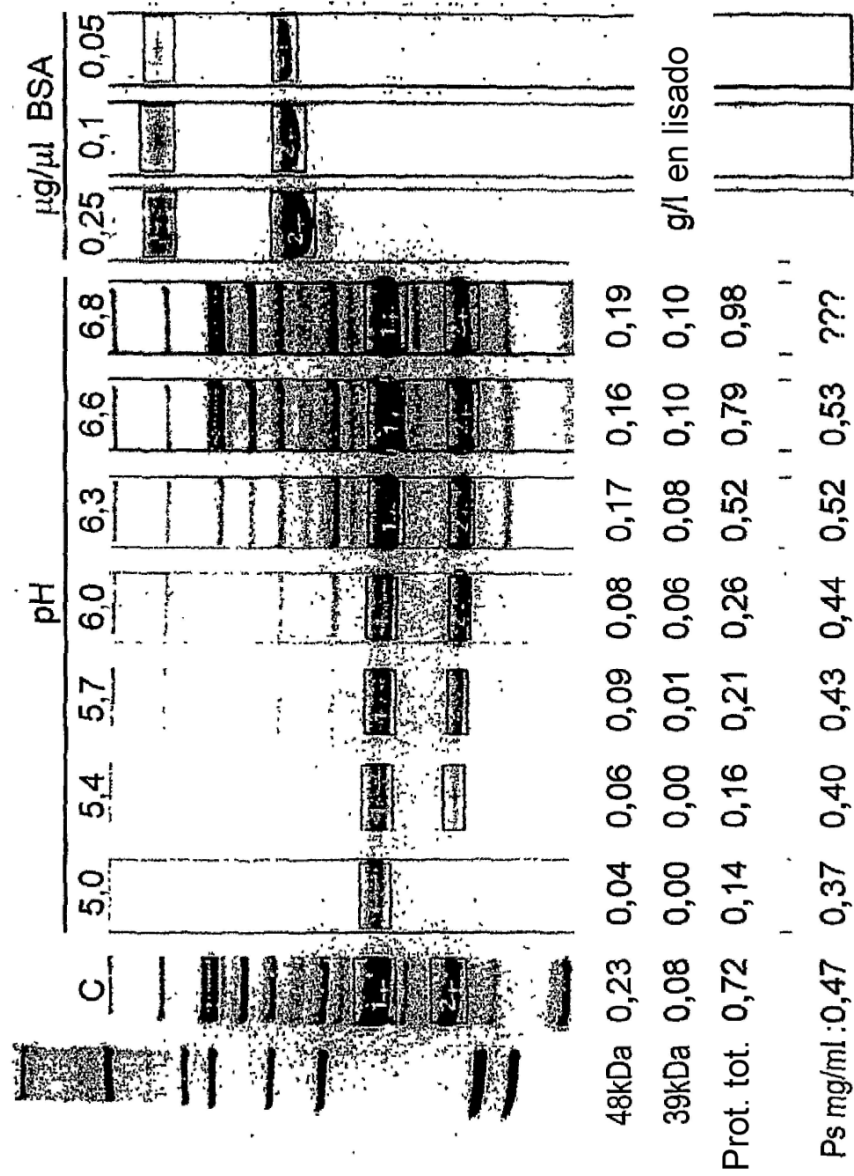


FIG.1

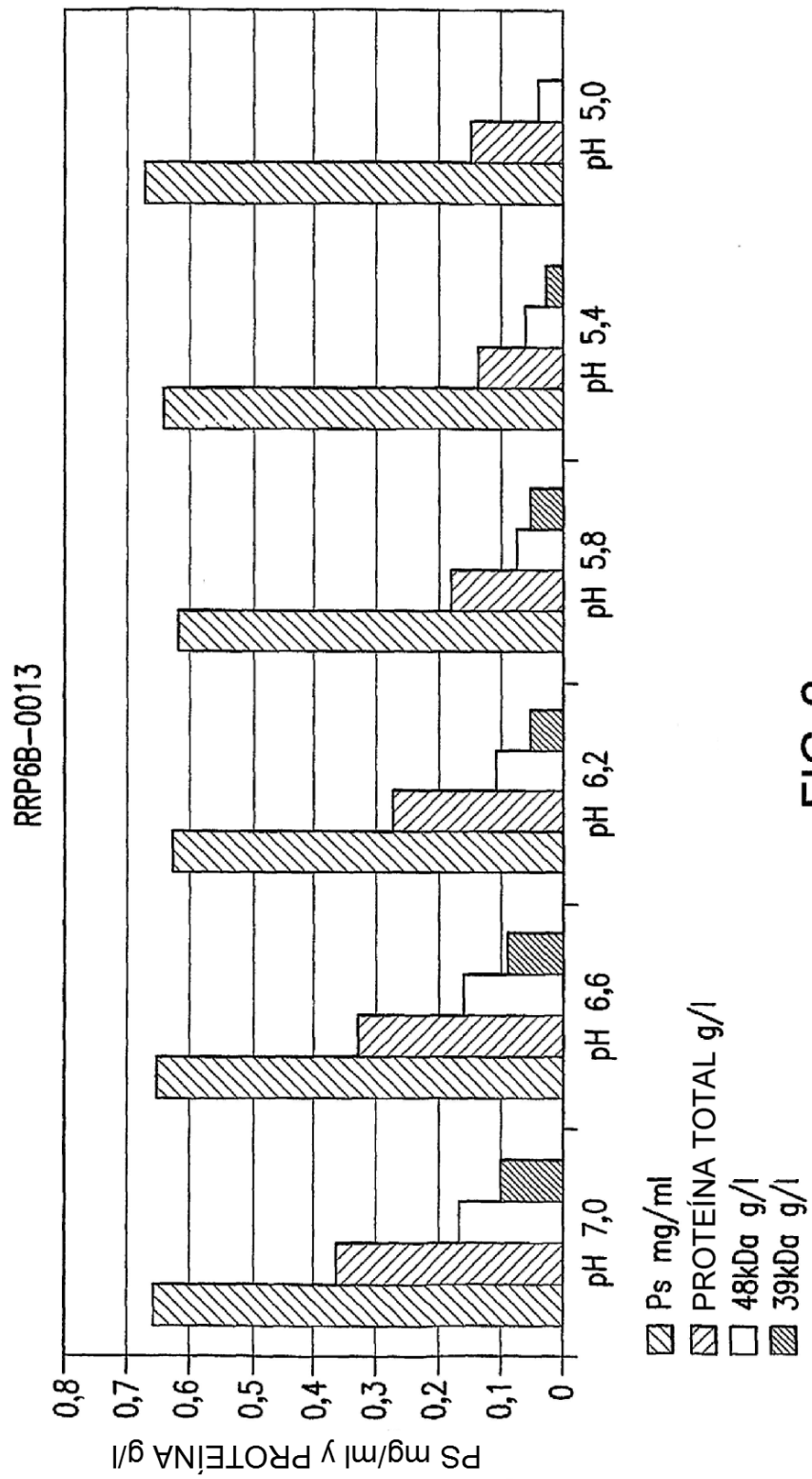


FIG.2

ESTUDIO N.º 1 DE AJUSTE DE pH RRP1-0001

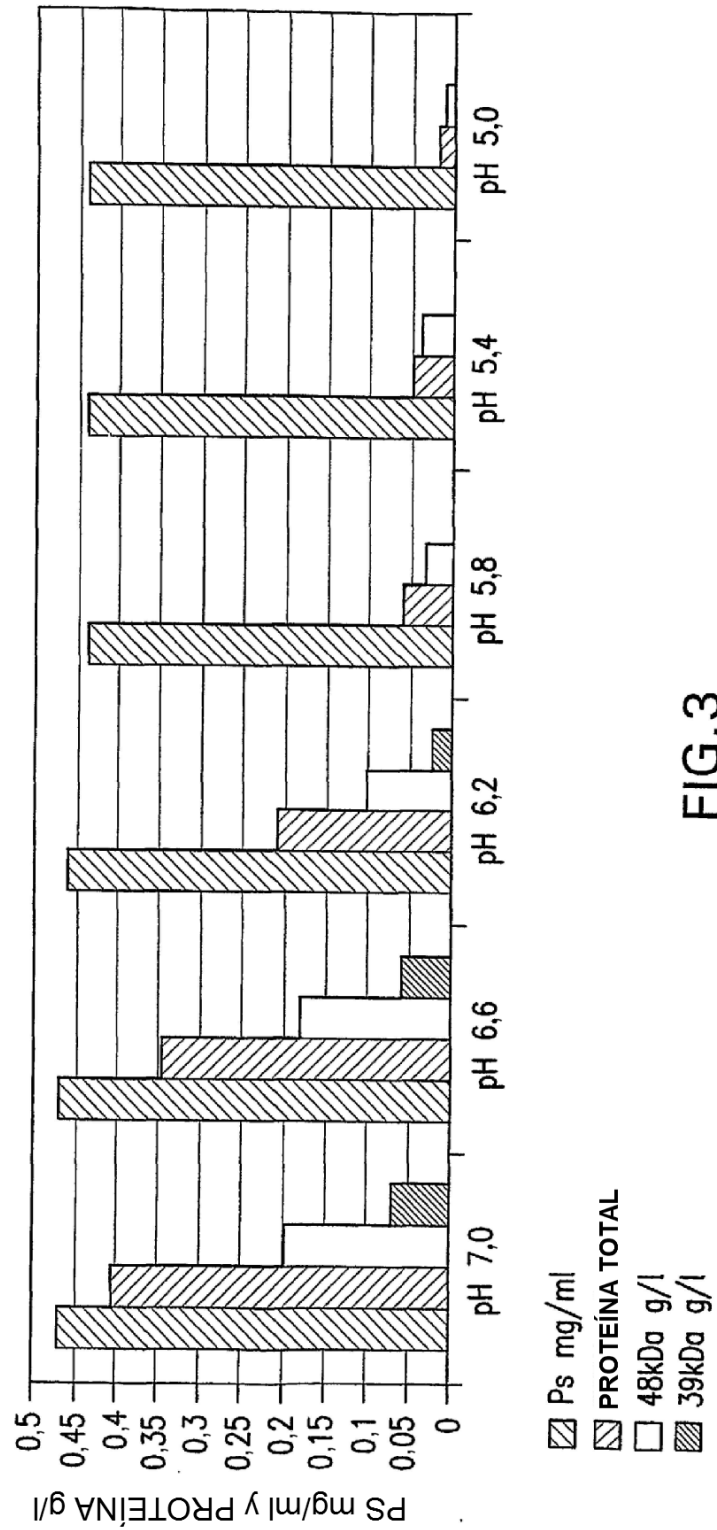


FIG.3

ESTUDIO DE pH RRP5-0005

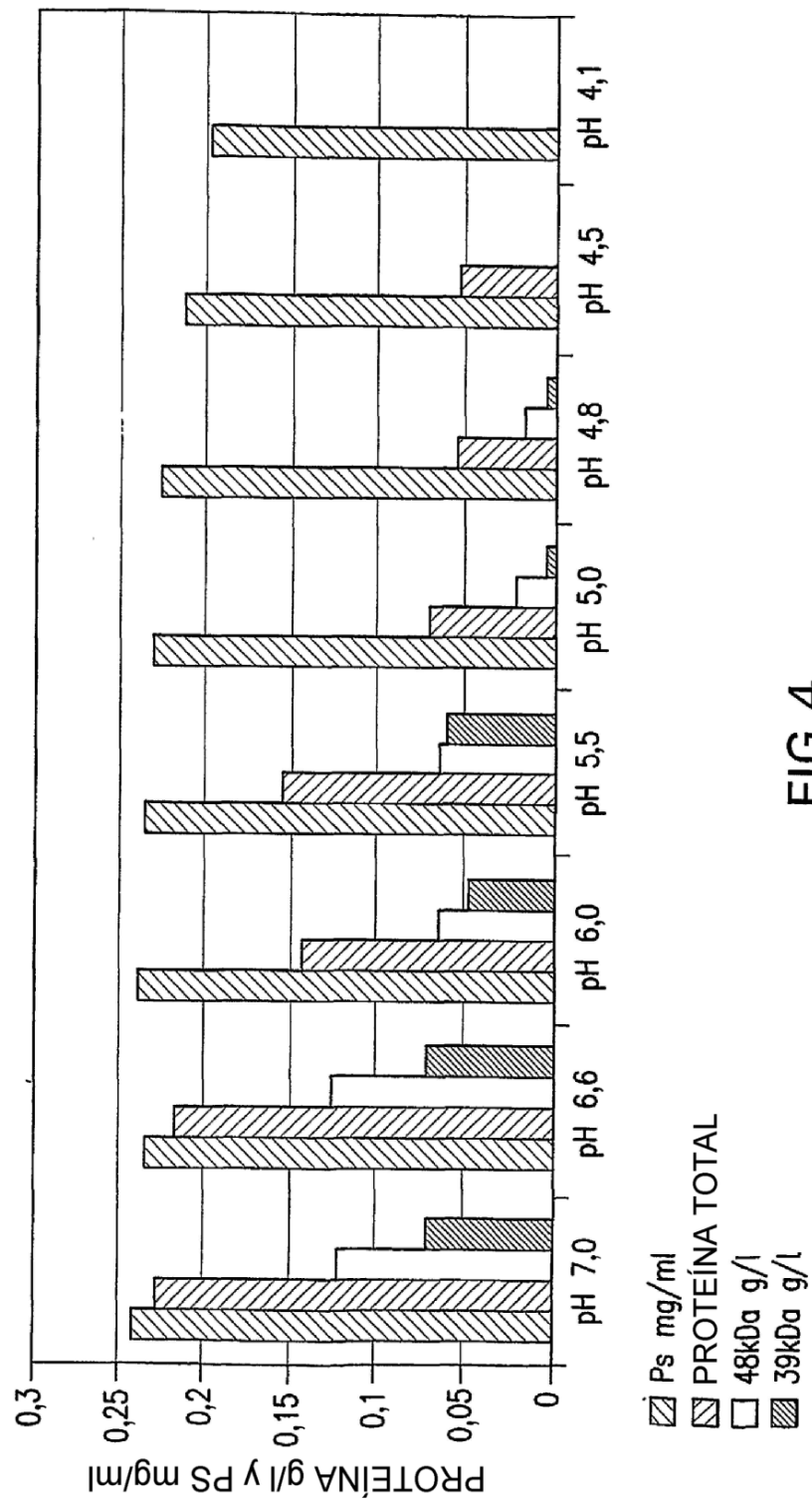


FIG.4

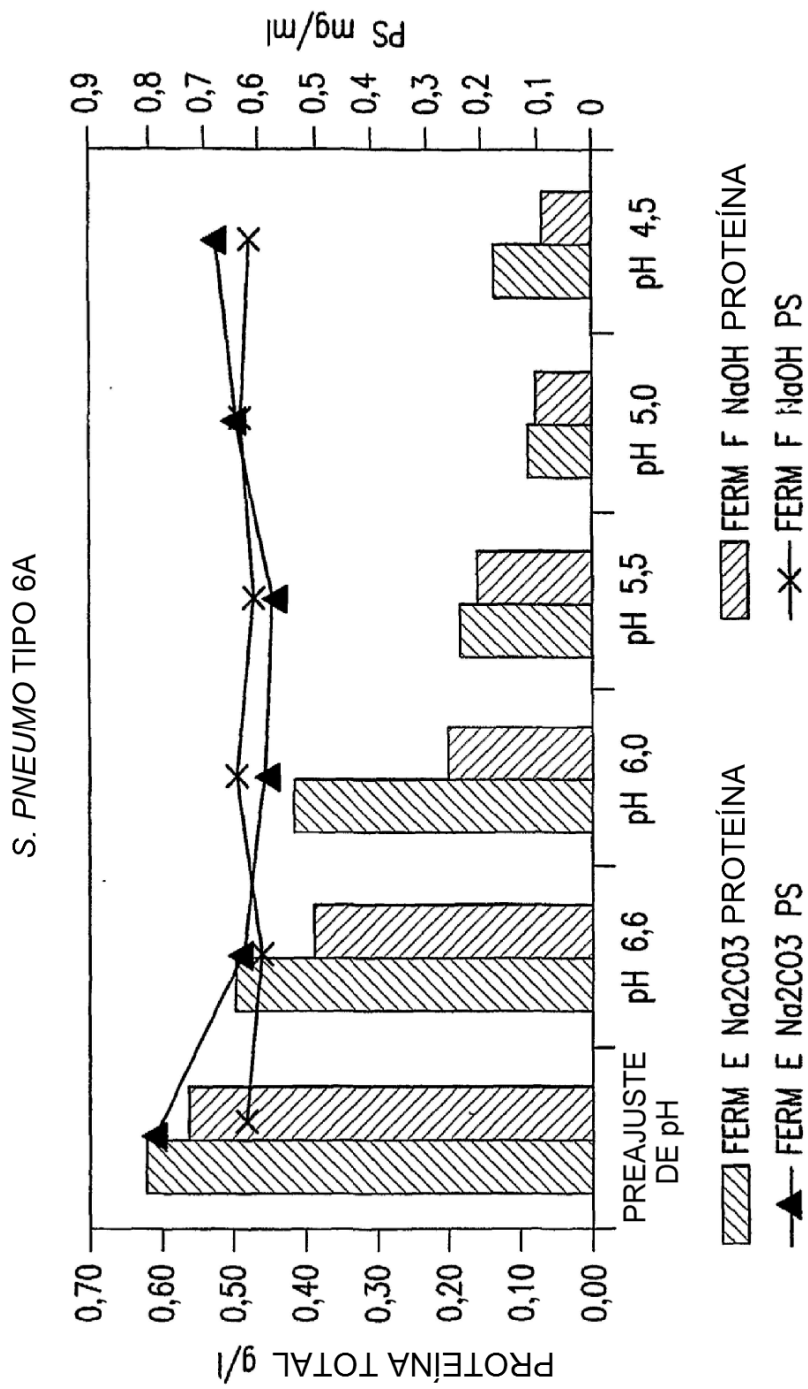


FIG.5

RRP7F-0007 PS Y PROTEÍNA

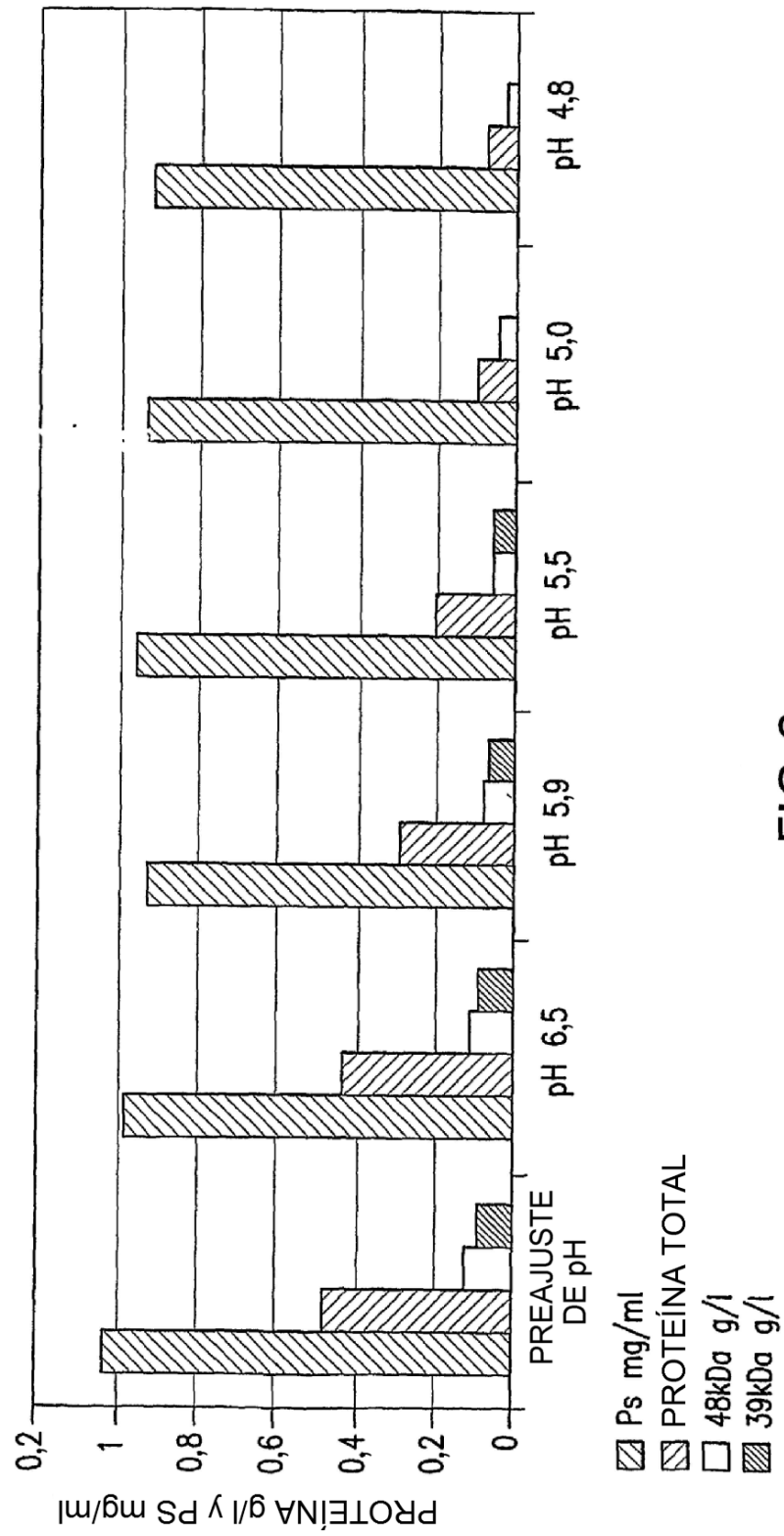


FIG.6