

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 952**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12P 19/04** (2006.01)

**C08L 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2009 PCT/US2009/068424**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10080484**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09804098 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2385981**

54 Título: **Procedimiento de control del peso molecular de polisacáridos de Streptococcus pneumoniae usando carbono**

30 Prioridad:

**18.12.2008 US 138570 P**

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

**24.03.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CRINEAN, JEAN, HEATHER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 749 952 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de control del peso molecular de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* usando carbono

**Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere a procedimientos para aumentar el peso molecular de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados que tienen un enlace fosfodiéster entre las unidades de repetición de sacáridos.

**Antecedentes**

- 10 En la preparación de vacunas neumocócicas conjugadas multivalentes dirigidas a la prevención de enfermedades invasivas causadas por el organismo *Streptococcus pneumoniae* (también conocido como neumococo), serotipos de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados se cultivan para suministrar polisacáridos necesitan para producir la vacuna. Las células se cultivan en fermentadores con lisis induce al final de la fermentación por adición de desoxicolato de sodio o un agente de lisis alternativo. El caldo de lisado se recolecta luego para purificación corriente abajo y la recuperación de los polisacáridos capsulares que rodean las células bacterianas. Después de la conjugación con una proteína transportadora, los polisacáridos se incluyen en el producto de vacuna final y confiere
- 15 inmunidad a la población diana de la vacuna con respecto a los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados.

- 20 El tamaño de polisacáridos constituye un atributo de calidad analizado en cada lote de preparación y debe controlarse de manera apropiada. El procesamiento tradicional ha incluido el uso de NaOH (hidróxido de sodio) como un valorador básico durante fermentación. Al usar NaOH se tiene la ventaja de ser capaz de reducir el pH del lisado de desoxicolato sin formación de espuma para retirar proteína y mejorar la filtración. Este material se somete a centrifugación continuando con filtración para retirar la mayoría de los sólidos por debajo de un tamaño nominal de 0,45 µm. Sin embargo, dichos procedimientos de procesamiento tradicional dan como resultado polisacáridos de menor peso molecular (< 450 kDa) para serotipos que tienen un enlace fosfodiéster entre unidades de repetición de sacáridos (por ejemplo, 6A, 6B, 19A, y 19F).

- 25 De acuerdo con esto, se necesitan procedimientos mejorados para la recuperación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular a partir de lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae*, en particular lisados que contienen serotipos 6A, 6B, 19A, o 19F de *Streptococcus pneumoniae*.

- 30 El documento WO0168903 divulga procedimientos para modular la producción de polisacáridos capsulares en *Streptococcus pneumoniae*. En particular, un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares a partir de *Streptococcus pneumoniae* mediante el mantenimiento de un gas que tiene una concentración de oxígeno subatmosférica en contacto con el medio de cultivo.

- 35 El documento US2007184071 divulga una composición inmunogénica que tiene 13 conjugados proteicos polisacáridos diferentes y, de manera opcional, un adyuvante basado en aluminio. Cada conjugado contiene un polisacárido capsular preparado a partir de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F) conjugado con una proteína transportadora. Se proporcionan además procedimientos para preparar un conjugado inmunogénico que comprende polisacáridos de serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* en los que los polisacáridos de serotipo 19A se coliofilizan con una proteína transportadora y la conjugación se lleva a cabo en dimetilsulfóxido (DMSO) mediante un mecanismo de aminación reductora.

- 40 El documento EP0497524 divulga unas preparaciones de polisacáridos capsulares de tipo específico a partir de *Streptococcus pneumoniae* que tienen una media inferior a aproximadamente 1000 unidades de repetición de oligosacáridos por molécula, polidispersidades de entre 1,0 y 1,4, viscosidades intrínsecas de entre 0,6 y 3,0 dl/g, y contaminación inferior al 3 % de polisacáridos de tipo específico por polisacáridos C específicos de grupo, producidos mediante un procedimiento.

- 45 El documento US2006228381 divulga un procedimiento para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacáridos capsulares en un caldo de lisado celular de *Streptococcus pneumoniae* complejo con anterioridad a que la purificación se describa. El uso de reducción de pH después de lisis celular ha dado como resultado un polisacárido purificado que cumple de manera consistente con la especificación de proteína, rinde mayores recuperaciones de polisacáridos durante el procedimiento de purificación.

- 50 El documento WO2008118752 divulga un procedimiento reducido para producir una solución que contiene polisacáridos capsulares sustancialmente purificados a partir de un caldo de lisado celular de *Streptococcus pneumoniae*. La ultrafiltración y diafiltración de un lisado de *S. pneumoniae* clarificado continuando con ajuste de pH a menos de 4,5, preferiblemente, aproximadamente 3,5, precipitó al menos el 98 % de la proteína en la solución sin afectar seriamente el rendimiento de polisacáridos.

- 55 **Breve resumen de la invención**

Se proporcionan procedimientos mejorados para la recuperación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular a partir de lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos que tienen un enlace fosfodiéster entre unidades de repetición de sacáridos. En un procedimiento, se suministra CO<sub>2</sub> a un cultivo de fermentación de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* que contiene un enlace fosfodiéster entre unidades de repetición de sacáridos. De acuerdo con esto, en una realización de la invención, el procedimiento incluye las etapas de: 1) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen polisacáridos capsulares que comprenden un enlace fosfodiéster entre unidades de repetición; 2) suministrar CO<sub>2</sub> al cultivo de fermentación, en el que el suministro de CO<sub>2</sub> a dicho cultivo de fermentación comprende una primera adición de NaHCO<sub>3</sub> al cultivo de fermentación a 10-50 mM y una segunda adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 3) lisar las células bacterianas en el cultivo de fermentación; y 4) aislar polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* a partir del cultivo de fermentación, en el que el peso molecular de dichos polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislado es de al menos 480 kDa, y en el que dichos polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* son serotipo 19A.

El suministro de CO<sub>2</sub> al cultivo de fermentación incluye una primera adición de NaHCO<sub>3</sub> y una segunda adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. En una realización, el peso molecular de los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados es de al menos 700 kDa. Se divulga además en la presente memoria una solución que contiene polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados de alto peso molecular en la proporcionan los polisacáridos que comprenden enlaces fosfodiéster entre unidades de repetición, donde la solución se produce mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Se proporciona un procedimiento de producción de una solución que contiene polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A aislados de alto peso molecular. El procedimiento incluye las etapas de: 1) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen polisacáridos capsulares serotipo 19A; 2) suministrar CO<sub>2</sub> al cultivo de fermentación, en el que el suministro de CO<sub>2</sub> a dicho cultivo de fermentación comprende una primera adición de NaHCO<sub>3</sub> al cultivo de fermentación a 10-50 mM y una segunda adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 3) lisar las células bacterianas en el cultivo de fermentación; y 4) aislar polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A a partir del cultivo de fermentación, según el cual se produce una solución que contiene polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A aislados de alto peso molecular, en el que el peso molecular de dichos polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados es de al menos 480 kDa. Se divulga además la provisión de una solución que contiene polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A aislados de alto peso molecular, donde la solución se produce mediante el procedimiento descrito anteriormente.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los niveles de densidad óptica (OD), base y glucosa durante la fase de fermentación con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base de valoración a partir de estudios de laboratorio en escala de 3 l. La base en gramos se divide por 10 con el fin de representación.

La Figura 2 muestra los niveles de densidad óptica (OD), base y glucosa durante la fase de fermentación con NaOH como base de valoración a partir de estudios de laboratorio en escala de 3 l. La base en gramos se divide por 10 con el fin de representación.

La Figura 3 muestra los resultados de proteína y polisacáridos totales para diferentes ajustes de pH para alimentaciones básicas alternativas de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o NaOH.

#### Descripción detallada de la invención

*Streptococcus pneumoniae* son cocos Gram positivos de forma de lanceta que se encuentran generalmente de a pares (diplococos) pero también en cadenas cortas o como células únicas. Estos se cultivan fácilmente en placas de agar sangre con colonias brillantes y muestran hemólisis alfa a menos que se cultiven de manera anaeróbica, cuando muestran hemólisis beta. Las células de la mayoría de los serotipos neumocócicos tienen una cápsula que es un recubrimiento de polisacárido que rodea cada célula. Esta cápsula es un determinante de virulencia en humanos, ya que interfiere con fagocitosis al impedir que los anticuerpos ataquen a las células bacterianas. Actualmente, existen más de 90 serotipos neumocócicos capsulares conocidos identificados, dando cuenta los 23 serotipos más comunes de aproximadamente el 90 % de las enfermedades invasivas a nivel mundial.

Como una vacuna, el recubrimiento de polisacáridos neumocócicos puede conferir un grado razonable de inmunidad a *Streptococcus pneumoniae* en individuos con sistemas inmunológicos desarrollados o intactos, pero una proteína conjugada con polisacárido permite una respuesta inmunitaria en niños y ancianos quienes presentan mayor riesgo de contraer infecciones neumocócicas. Las células neumocócicas se cultivan en fermentadores con lisis inducida al final de la fermentación. El caldo de lisado se recolecta luego para purificación corriente abajo y la recuperación de los polisacáridos capsulares.

El tamaño de polisacáridos constituye un atributo de calidad ensayado en cada lote de preparación y debe controlarse apropiadamente. El peso molecular para serotipos que tienen un enlace fosfodiéster entre unidades de repetición de sacáridos (por ejemplo, 6A, 6B, 19A, y 19F) se ve afectado por parámetros del procedimiento de

fermentación. Los procedimientos de la presente invención permiten la recuperación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular a partir de lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipo 19A.

5 En el desarrollo de los presentes procedimientos, la concentración de HySoy y elección de valorador básico se modificaron en un intento de modificar los rendimientos de polisacáridos y pesos moleculares finales. Cuatro esquemas de fermentación se sometieron a prueba. El primero usó un procedimiento de NaOH como línea básica con 28 g/l de HySoy. El segundo usó carbonato de sodio al 20 % como el valorador básico y 20 g/l de HySoy. El tercero combinó ventajas de los dos primeros enfoques mediante la introducción de carbonato a través de la preparación de lotes de bicarbonato de sodio y el uso de un valorador básico mixto de NaOH/carbonato. El cuarto enfoque usó carbonato como el valorador básico con una adición de 10 mM de bicarbonato para reforzar el cultivo

10 El uso de NaOH como el valorador básico durante fermentación tuvo la ventaja de permitir reducir el lisado de desoxicolato a pH 5,0 sin formación de espuma para retirar proteína y mejorar la filtración, pero dio como resultado un polisacárido de menor peso molecular (< 450 kDa). Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> proporcionó mayor peso molecular pero presentaba problemas de formación de espuma si el pH del lisado del desoxicolato se reducía. En una etapa de retención de pH más alto de 6,6, al usar Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> las fermentaciones formaron un material de tipo gel con problemas de filtración posteriores. Al minimizar la cantidad de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mediante el uso de una mezcla de NaOH y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como un valorador de pH que se proporcionaron los beneficios de tamaño de peso molecular del Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, mientras que se eliminaron los problemas de formación de espuma y filtración debido a la liberación repentina de grandes cantidades de CO<sub>2</sub>. El uso de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % (p/v) como el valorador básico con una adición de 10 mM de NaHCO<sub>3</sub> para reforzar el cultivo (cuarto enfoque) produjo polisacáridos consistentes, de alto peso molecular de alto rendimiento.

15 La presente invención proporciona, de este modo, procedimientos mejorados para la recuperación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular a partir de lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipo 19A. El CO<sub>2</sub> se suministra a un cultivo de fermentación de un serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae*. De acuerdo con esto, en una realización de la invención, se proporciona un procedimiento de producción de una solución que contiene polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados de alto peso molecular que comprenden enlaces fosfodiéster entre unidades de repetición, que incluye las etapas de: 1) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que produce polisacáridos capsulares que comprenden un enlace fosfodiéster entre unidades de repetición; 2) suministrar CO<sub>2</sub> al cultivo de fermentación, en el que el suministro de CO<sub>2</sub> a dicho cultivo de fermentación comprende una primera adición de NaHCO<sub>3</sub> al cultivo de fermentación a 10-50 mM y una segunda adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 3) lisar las células bacterianas en el cultivo de fermentación; y 4) aislar polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* a partir del cultivo de fermentación; según el cual se produce una solución que contiene polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados de alto peso molecular con enlaces fosfodiéster entre unidades de repetición, en el que el peso molecular de dichos polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados es de al menos 480 kDa, y en el que dichos polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* son serotipo 19A. Se divulga además en la presente memoria una solución que contiene polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados de alto peso molecular con enlaces fosfodiéster entre unidades de repetición, donde la solución se produce mediante el procedimiento descrito anteriormente.

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

25 El suministro de CO<sub>2</sub> al cultivo de fermentación incluye la adición de NaHCO<sub>3</sub> al cultivo de fermentación. Se usan adiciones de NaHCO<sub>3</sub> de 10-50 mM, tales como de 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, o 50 mM. El suministro de CO<sub>2</sub> al cultivo de fermentación incluye además la adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al cultivo de fermentación. Pueden usarse adiciones de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 0,1 M-2,0 M, tales como de 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,6 M, 0,7 M, 0,9 M, 1,0 M, 1,5 M, 1,8 M, o 2,0 M. Un equivalente de peso/volumen (p/v) puede usarse también, tal como Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5 % (p/v), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (p/v), o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % (p/v). El suministro de CO<sub>2</sub> al cultivo de fermentación incluye una primera adición de NaHCO<sub>3</sub> y una segunda adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al cultivo de fermentación.

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

En una realización de la presente invención, el agente lítico usado para lisar células bacterianas es DOC. DOC es la sal sódica del ácido biliar ácido desoxicólico, que deriva comúnmente a partir de fuentes biológicas tales como vacas o bueyes. DOC activa la proteína LytA, que es una autolisina que está involucrada 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 porción C-terminal, y se conoce que mutaciones del gen *lytA* producen mutantes LytA que son resistentes a lisis con DOC.

A pesar de que no existe evidencia con respecto a que el uso de DOC durante purificación de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* representa un riesgo para la salud, el uso de dichos reactivos que derivan de manera biológica podría generar cuestiones regulatorias potenciales. De acuerdo con esto, en una realización de la presente invención, el agente lítico usado para lisar células bacterianas es un agente lítico de origen no animal. Los agentes líticos de origen no animal para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen agentes de fuentes no animales con modos de acción similares a los de DOC (a saber, que afectan la función LytA y dan como resultado lisis de células de *Streptococcus pneumoniae*). Dichos agentes líticos de origen no animal, incluyen, pero sin limitación, análogos de DOC, tensioactivos, detergentes, y análogos estructurales de colina, y pueden determinarse usando procedimientos según se describen en la sección experimental de la presente memoria que sigue a continuación. En una realización, el agente lítico de origen no animal se selecciona a partir del grupo que consiste en ácido decanesulfónico, tert-octilfenoxi poli(oxietileno) etanoles (por ejemplo, Igepal® CA-630, CAS #: 9002-93-1, disponible de Sigma Aldrich, St. Louis, MO), condensados de octilfenol y óxido de etileno (por ejemplo, Triton® X-100, disponible de Sigma Aldrich, St. Louis, MO), N-lauril sarcosina de sodio (NLS), lauril iminodipropionato, dodecil sulfato de sodio, quenosodesoxicolato, hidodesoxicolato, glicodesoxicolato, taurodesoxicolato, tauroquenosodesoxicolato y colato. En otra realización, el agente lítico de origen no animal es NLS.

En los procedimientos de la presente invención, los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* se aíslan usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, a continuación de la fermentación de células bacterianas que produce polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, las células bacterianas se lisan para producir un lisado celular. Los polisacáridos capsulares pueden aislarse luego a partir del lisado celular usando técnicas de purificación conocidas en la técnica, incluyendo el uso de centrifugación, precipitación, ultrafiltración, y cromatografía en columna (véanse, por ejemplo, las publ. de sol. de patentes de EE.UU. nros. 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340, y 20080102498).

Los cambios de procedimiento descritos anteriormente permiten la recuperación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular a partir de lisados celulares de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipo 19A. Esto constituye una mejora sólida del procedimiento de fermentación/recuperación que puede mejorar mucho la producción de polisacáridos neumocócicos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración.

### Ejemplos

Los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados se cultivaron para suministrar polisacáridos necesarios para producir vacunas para inmunización activa contra enfermedades invasivas causadas por *Streptococcus pneumoniae* debido a serotipos capsulares incluidos en la vacuna. Las células se cultivaron en fermentadores con lisis inducida al final de la fermentación. El caldo de lisado se recolectó luego para purificación corriente abajo y la recuperación de los polisacáridos capsulares. Debido a que el tamaño de polisacáridos constituye un atributo de calidad ensayado en cada lote de preparación, el tamaño de polisacáridos debe controlarse de manera apropiada. Se encontró que el peso molecular para serotipos que tienen un enlace fosfodiéster entre unidades de repetición de sacáridos (por ejemplo, 6A, 6B, 19A, y 19F) se ve afectado por parámetros del procedimiento de fermentación. El siguiente ejemplo describe estudios que se refieren al suministro de CO<sub>2</sub> durante fermentación de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que tienen un enlace fosfodiéster entre unidades de repetición para mejorar el peso molecular de polisacáridos.

#### Ejemplo 1: Efecto del suministro de dióxido de carbono en el peso molecular de polisacáridos

##### Fermentación

Los análisis de laboratorio se llevaron a cabo en fermentadores Braun Biostat B de 3 l (B. Braun Biotech, Allentown, PA). Se cargaron con 1,8 l de medio HYS (20 g/l de HySoy, 2,5 g/l de NaCl, 0,5 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,013 g/l de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,15 g/l de L-Cisteína HCl). Los fermentadores se autoclavaron luego durante 60 minutos a 121 °C. Después de enfriamiento, ya sea 40 o 60 ml/L de una solución de glucosa al 50 % + sulfato de magnesio al 1 % (p/v) (DMS) se agregó a cada unidad. En caso de ser necesario, se agregó bicarbonato de sodio antes de inoculación.

Dos botellas de siembra de 2 l que contienen 1 l de medio HYS se inocularon con soluciones madre de siembra congeladas tipo 19A o tipo 6A y se incubaron a 36 °C sin agitación durante aproximadamente 6-8 horas. La inoculación de los fermentadores se llevó a cabo con un volumen de 100 ml (~5,2 % v/v) repartió en alcuotas a partir de una botella con una OD<sub>600</sub> de entre 0,3-0,9 y pH de entre 4,75-5,60. La temperatura de fermentación y pH se controlaron en valores de referencia convenientes. Se usaron las condiciones convencionales de 36 °C, superposición de aire de 1 l/min, pH controlado a 7 y agitación de 75 rpm. Dos impulsores se colocaron en las

posiciones inferior y media en el eje del agitador. Una botella que contiene el valorador básico apropiado (NaOH 3N, NaOH 3 N mezclado con diversas concentraciones de  $\text{NaHCO}_3$ , NaOH 3N mezclado con diversas concentraciones de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y  $\text{NaHCO}_3$ , y  $\text{NaCO}_3$  al 20 %) se conectó para control automático de pH. Los fermentadores se muestrearon en diversos momentos específicos para pH externo,  $\text{OD}_{600}$ , glucosa, polisacárido, y proteína. Los análisis se terminaron cuando la concentración de glucosa se aproximó al agotamiento, o no se observó aumento de OD en el tiempo.

#### Medición de Densidad óptica ( $\text{OD}_{600}$ )

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

#### Concentración de glucosa

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

#### Análisis de polisacáridos

Las muestras se tomaron en la lectura de fermentación final y se trataron con desoxicolato de sodio al 12 % (DOC) a una concentración del 0,13 % (p/v) y se agitaron suavemente. Se retuvieron durante 8-24 horas a 5 °C y se ajustó el pH luego a 5,0 con ácido acético al 50 % para precipitar la mayoría del DOC y la proteína. Después de otro intervalo de retención de 12-24 horas a 5 °C, las muestras se centrifugaron (14000 rpm, Sorvall (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) rotor SS34, 10 min a 15 °C). El pH del sobrenadante se ajustó a 6,0. El sobrenadante se filtró luego a través de filtros de jeringa con membrana HT Tuffryn de 0,45  $\mu\text{m}$  de Pall (East Hills, NY) (baja afinidad por proteínas). El producto filtrado se analizó mediante cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (HPLC-SEC) usando metodología convencional que se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Aquilar, M. "HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols" Totowa, NJ: Humana Press (2004)).

#### Análisis de proteínas

Los niveles de proteínas se analizaron mediante procedimientos de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) que se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Walker, J.M. "The Protein Protocols Handbook" Totowa, NJ: Humana Press (2002)). El lisado celular filtrado (sobrenadante) según se preparó anteriormente se repartió en alícuotas en tubos de microcentrifuga a razón de 65  $\mu\text{l}$ /tubo. Las adiciones de agente reductor (10  $\mu\text{l}$  de ditioneitol (DTT) y tampón de muestra de dodecilsulfato de litio (LDS) 4x NuPAGE® (Invitrogen, Carlsbad, CA) (25  $\mu\text{l}$ ) se prepararon para cada muestra. Las muestras se agitaron en vórtice y se calentaron durante 10 minutos antes de la carga de 10  $\mu\text{l}$ /carril en geles de 4-12 % de Bis-Tris NuPAGE® de 12 pocillos. Los geles se analizaron en tampón de MES-SDS NuPAGE® a 150 V limitándose durante aproximadamente 60 minutos y se tiñeron posteriormente usando el protocolo de tinción de Zoion (Zoion Biotech, Worcester, MA). Los análisis de muestra se llevaron a cabo usando un generador de imágenes UVP (UVP Inc., Upland, CA) con software V.3 de LabWorks™ (UVP Inc.) para obtener concentraciones aproximadas de bandas específicas de proteínas de interés. Albúmina de suero bovino (BSA) Fracción V se usaron para desarrollar una curva estándar de proteína para calcular los valores de proteínas aproximados de las muestras (en caldo de células lisadas).

#### Análisis de peso molecular

Las muestras de fermentación de 1-2 litros se trataron con DOC de sodio al 12 % a una concentración del 0,13 % (p/v) con agitación a 200 rpm. Las muestras se retuvieron entre 8-24 horas a ya sea 5 °C o 20 °C. Las muestras se sometieron luego a ajuste de pH a 5,5 o 6,6 con ácido acético al 50 % para precipitar la mayoría del DOC y la proteína. Después de otro intervalo de retención de 12-24 horas a 5 °C, las muestras se centrifugaron (11000 rpm, Sorvall (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) rotor SLA-3000, 15 min a 10 °C). Las muestras de sobrenadante se sometieron luego a ajuste de pH a 6,0 con NaOH 3 N, y se filtraron usando filtros Millipore (Billerica, MA) MP60 de 0,45  $\mu\text{m}$ . Las muestras se sometieron luego a un procedimiento de purificación modificado que consiste en diafiltración de corte de peso molecular de 100K (MWCO) (concentración 5x que continúa con diafiltración 7,5x con agua DI), precipitación de HB al 0,1 %, y filtración de carbono. El material purificado se sometió luego a análisis de dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS).

#### Estudio de procedimiento de fermentación

En base a estudios anteriores, el procedimiento de fermentación se optimizó al cambiar de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a NaOH como el valorador básico. El uso de NaOH permitió que la recuperación de pH se redujera a 5,0 dando como resultado precipitación de proteína significativa. El  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  liberará  $\text{CO}_2$  a pH bajo (< 6,6) creando formación de espuma. Se examinó el impacto del valorador básico en niveles de polisacáridos tipo 19A y proteínas. Dos fermentadores de 3 l

se configuraron con un fermentador que sirve como el control del procedimiento original, usando solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 % (p/v) como la alimentación básica. El otro fermentador usó  $\text{NaOH}$  3 N como la alimentación básica.

5 Durante la fase de recuperación, las células se lisaron en el fermentador con DOC (concentración final del 0,13 % (p/v)) con el fermentador que se retuvo a 36 °C durante 30 minutos. A continuación de esta etapa, el lisado se retuvo durante la noche con agitación a temperatura ambiente (22 °C). Después de la retención del lisado, el lisado se valoró con pH a través de un intervalo de sin ajustar a 4,5 con muestras tomadas a diversos valores de referencia de pH. Estas muestras se retuvieron durante la noche a temperatura ambiente antes de ser procesadas y analizadas con respecto a concentraciones de polisacáridos y proteínas. Los niveles de OD, base y glucosa durante la fase de fermentación se muestran en la Figura 1 y la Figura 2. La principal diferencia consistió en una OD final más alta para el análisis de carbonato.

15 El efecto del ajuste de pH del lisado posterior al DOC en los niveles de proteínas totales se examinó también, y se muestra en la Figura 3. Los niveles de pH más bajos redujeron la carga de proteínas en caldo libre de células tanto para el análisis con  $\text{NaOH}$  como para el análisis con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . El pH más bajo (< 6,6) no tuvo un impacto en el rendimiento de los polisacáridos. Los resultados del análisis de fermentación sirvieron como una indicación en cuanto a que la alimentación básica con  $\text{NaOH}$  constituyó una alternativa aceptable para el procedimiento usando la alimentación básica con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  durante fermentación, pero produjo rendimientos más bajos con respecto a aquellos obtuvieron con la alimentación con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

#### Efecto de valorador básico en peso molecular de 19A y 6A

20 Un conjunto de fermentaciones en la escala de 3 l se llevó a cabo para determinar si el valorador básico, concentración de HySoy y etapa de retención de pH afectaban el peso molecular de serotipo 19A. La determinación del peso molecular se llevó a cabo usando ensayo de MALLS continuando con el procedimiento de purificación modificado. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Para serotipo 6A, solo se evaluó el valorador básico. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

25 Tabla 1. Impacto de valorador básico en peso molecular de 19A (L29331-94)

Análisis nro.	pH/Temp	HySoy	Retención de pH	Base	MALLS (kDa)
D	7,0/36 °C	28 g/l	5,0	$\text{NaOH}$ 3 N	340
E	7,0/36 °C	20 g/l	5,0	$\text{NaOH}$ 3 N	350
F	7,0/36 °C	20 g/l	5,0	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ al 20 %	713
H	7,0/36 °C	20 g/l	6,6	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ al 20 %	713

Tabla 2. Impacto de valorador básico en peso molecular de 6A

Análisis nro.	Base	MALLS (kDa)
Lab 1	$\text{NaOH}$ 3 N	662
Lab 2	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ al 20 %	1189
Piloto 1	$\text{NaOH}$ 3 N	500
Piloto 2	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ al 20 %	950

#### Efecto de bicarbonato y valorador de pH de base mixta

30 En el primer estudio (análisis L29331-122 y -139), la variación de niveles de bicarbonato de sodio inicial y mezclas de bases de hidróxido de sodio y carbonato de sodio se usaron en conjunto con una etapa de retención de pH 5,0 después de la etapa de retención de DOC. Las adiciones de bicarbonato inicial variaron de 10-50 mM y el carbonato de sodio que se agregado a hidróxido de sodio 3N para el valorador básico varió de 0,2-1,8 M. Un análisis contuvo 50 mM de bicarbonato iniciales y usó  $\text{NaOH}$  como un valorador básico. Los niveles de carbonato al final de estas fermentaciones variaron de 14-111 mM. Los pesos moleculares de serotipo 19A variaron de 520 a 713 kDa. Los parámetros y los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> vs. base mixta como valorador de pH

Análisis nro.		NaHCO <sub>3</sub> (mM)	Base		MALLS (kDa)	Rendimiento PS (mg/ml)
			Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaOH		
Parte I L29331-122 20 g/l de HySoy	E	0	20 %	0	759	0,836
	F	10	0,2 M	3 N	520	0,308
	G	10	0,4 M	3 N	648	0,538

Parte II L29331-139 28 g/l de HySoy	H	10	0,9 M	3 N	563	0,334
	C	20	0,9 M	3 N	662	1,027
	D	20	1,8 M	3 N	611	0,903
	G	50	0,9 M	3 N	713	0,924
	H	50	0 M	3 N	713	1,051

5 Un segundo estudio (L29331-159 y -185) usó adiciones de bicarbonato inicial de 15-30 mM y mezclas de base usando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4-1,0 M. Los niveles de carbonato el final de la fermentación variaron de 24-62 mM. Los pesos moleculares de serotipo 19A variaron de 502 a 763 kDa. Los parámetros y resultados de los análisis se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. NaHCO<sub>3</sub> con base mixta como valorador de pH

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

10 Comparación de procedimientos de fermentación de valoración básica de carbonato puro y mixto

Un experimento se llevó a cabo para comparar el procedimiento de mezcla de bases (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,7 M/ NaOH 3 N) con respecto al procedimiento de valoración de carbonato (solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %, p/v) Los resultados (Tabla 5) confirmaron que el peso molecular del procedimiento de valoración de carbonato resultó mayor y más consistente (778, 781 kDa) con respecto al peso molecular del procedimiento de mezcla de bases (561-671 kDa). El rendimiento de los polisacáridos resultó mayor también con el procedimiento de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Tabla 5. Análisis L29399-1 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> vs. base mixta

Análisis nro.	NaHCO <sub>3</sub> (mM)	Base		MW (kDa)	Rendimiento PS (mg/ml)
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaOH		
C	25	0,7 M	3 N	565	1,106
D	25	0,7 M	3 N	561	0,908
E	25	0,7 M	3 N	612	0,894

(continuación)

Análisis nro.	NaHCO <sub>3</sub> (mM)	Base		MW (kDa)	Rendimiento PS (mg/ml)
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaOH		
G	25	0,7 M	3 N	671	0,873
F	0	20 %	0	778	1,282
H	0	20 %	0	781	1,249

Análisis en escala piloto

- 5 Varios análisis en escala piloto (100 l) de serotipo 19A con diversos valoradores básicos se llevaron a cabo. La determinación de peso molecular se llevó a cabo usando ensayo de MALLS continuando con un procedimiento de purificación completo y se informa del lote purificado final. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Impacto de valorador básico en peso molecular de 19A en escala piloto

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

10 Efecto de valorador básico y superposición en peso molecular de 19A

Un conjunto de fermentaciones en la escala de 3 l se llevaron a cabo para determinar si el valorador básico y superposición atmosférica afectaban el peso molecular. La determinación del peso molecular se llevó a cabo usando ensayo de MALLS continuando con el procedimiento de purificación modificado. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

## 15 Tabla 7. Impacto de valorador básico y superposición en peso molecular de 19A

Análisis nro.	Base	Superposición	MALLS (kDa)
Control	NaOH 3 N	Aire	350
C	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,7 M	Aire	855
D	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1,5 M /NaOH 1,5 M	Aire	710
E	NaOH 3 N	CO <sub>2</sub> al 100 %	634
F	NaOH 3 N	CO <sub>2</sub> al 50 %	646
G	NaOH 3 N	CO <sub>2</sub> al 20 %	567
H	NaOH 3 N	CO <sub>2</sub> al 10 %	547

Los artículos “un” y “uno, una” se usan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (a saber, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” se refiere a uno o más elementos.

5 Todas las publicaciones y solicitudes de patentes que se mencionan en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de aquellos expertos en la técnica a quienes la presente invención se refiere.

A pesar de que la invención precedente se ha descrito en algunos detalles a modo de ilustración y ejemplo con el fin de claridad de entendimiento, ciertos cambios y modificaciones pueden llevarse a la práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento de producción de una solución que contiene polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados de alto peso molecular en el que dichos polisacáridos comprenden enlaces fosfodiéster entre unidades de repetición, comprendiendo el procedimiento:
- a) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* que producen polisacáridos capsulares que comprenden un enlace fosfodiéster entre unidades de repetición;
  - b) suministrar CO<sub>2</sub> a dicho cultivo de fermentación; en el que el suministro de CO<sub>2</sub> a dicho cultivo de fermentación comprende una primera adición de NaHCO<sub>3</sub> al cultivo de fermentación a 10-50 mM y una  
10 segunda adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;
  - c) lisar las células bacterianas en dicho cultivo de fermentación; y
  - d) asilar polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* a partir de dicho cultivo de fermentación;
- en el que el peso molecular de dichos polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* aislados es de al menos 480 kDa, y en el que dichos polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* son serotipo 19A.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el lisado del *Streptococcus pneumoniae* en dicho cultivo de fermentación comprende la adición de desoxicolato de sodio a dicho cultivo de fermentación.

Figura 1

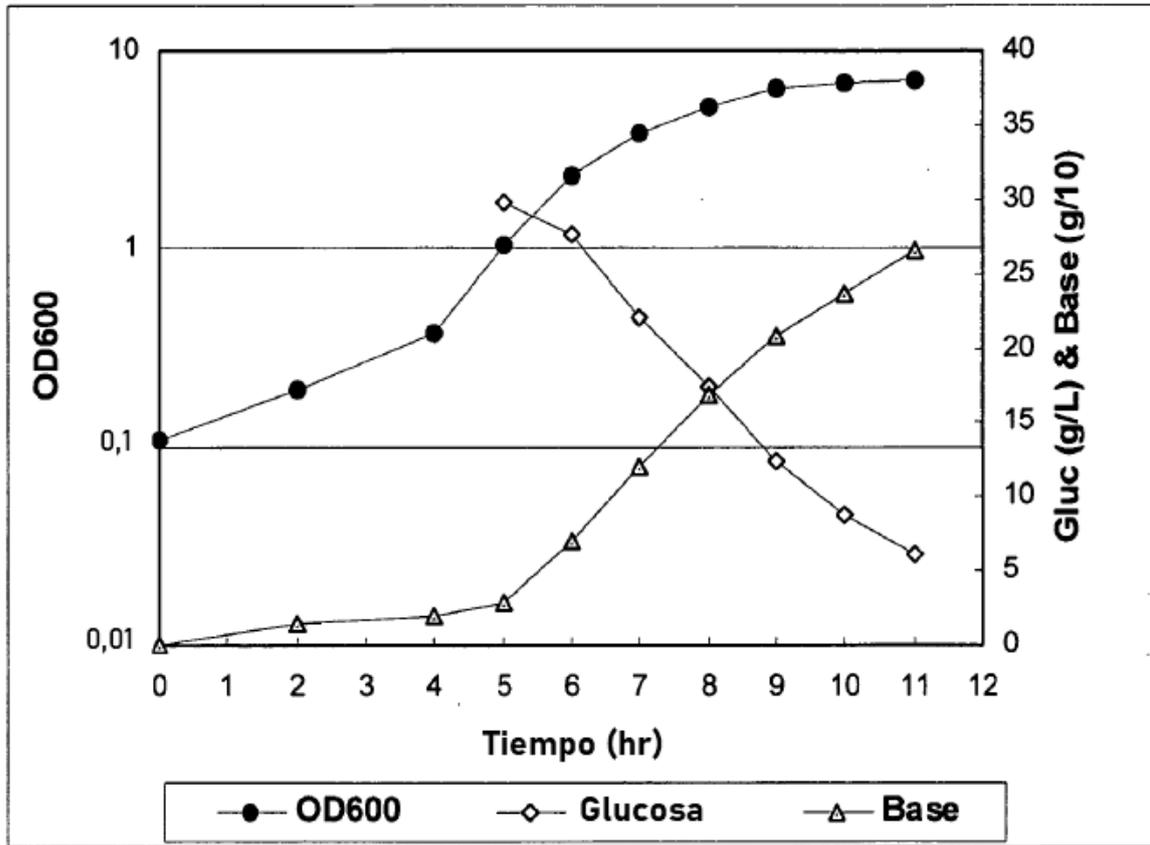


Figura 2

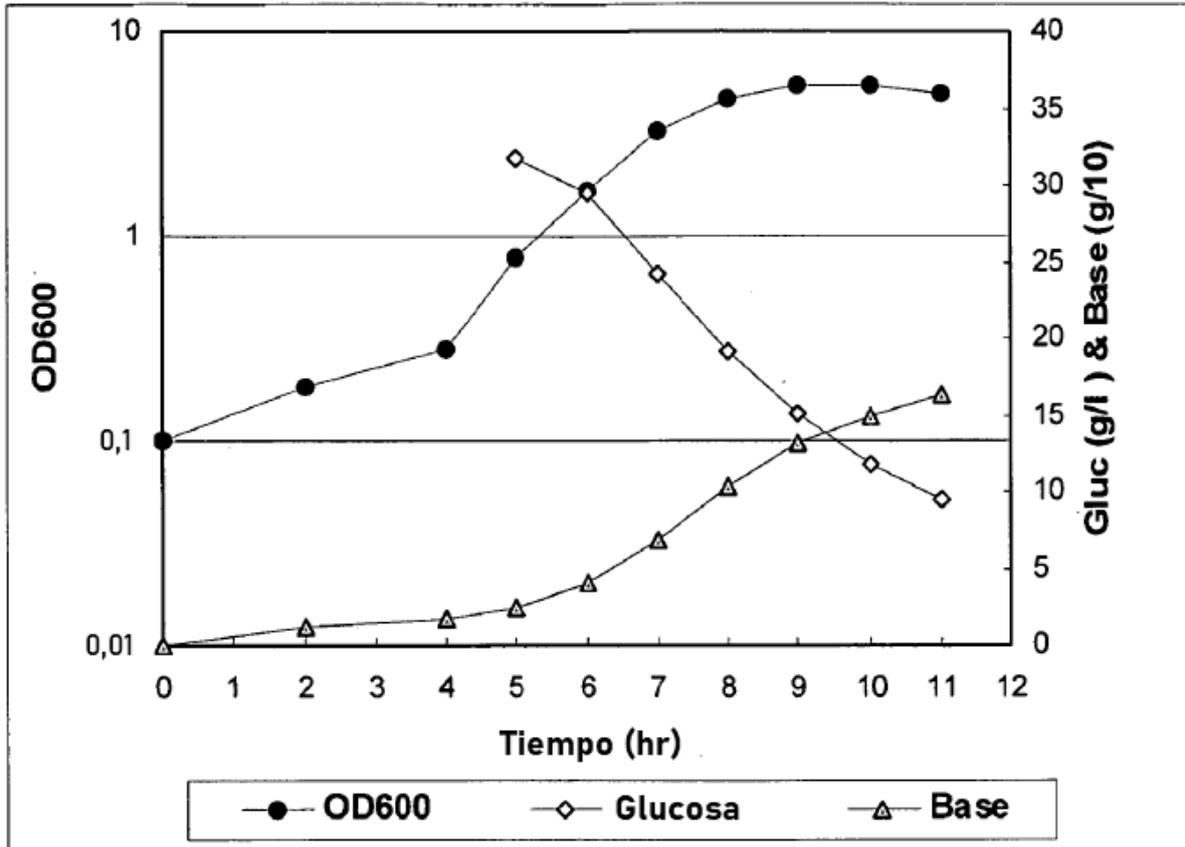


Figura 3

