

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992636** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.17

(22) Дата подачи заявки
2018.05.03

(51) Int. Cl. **C08B 37/00** (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01)
C08H 1/00 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)

**(54) СПОСОБ УДАЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ ИЗ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ**

(31) 201721015961

(32) 2017.05.05

(33) IN

(86) PCT/IB2018/053069

(87) WO 2018/203268 2018.11.08

(71) Заявитель:
**СЕРУМ ИНСТИТУТ ОФ ИНДИЯ
ПРАЙВАТ ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:
**Дхере Раджив Мхаласакант, Писал
Самбхаджи Шанкар, Аннамраджу
Даттатрея Сарма (IN)**

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к усовершенствованному способу очистки бактериальных капсулярных полисахаридов, более конкретно капсулярных полисахаридов грамотрицательных бактерий. Данный способ включает в себя концентрирование и диафильтрацию бактериальной биомассы, обработку анионным детергентом и сильной щелочью с последующим центрифугированием, диафильтрацией и осаждением средством на основе катионного детергента бактериальных полисахаридов. Данный способ приводит к значительному уменьшению примесей эндотоксинов, белков и нуклеиновых кислот, обеспечивая тем самым более высокое извлечение капсулярного полисахарида с желаемым уровнем О-ацетила. Данный способ является масштабируемым, неферментативным и включает в себя меньше этапов очистки.

A1

201992636

201992636

A1

СПОСОБ УДАЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ ИЗ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к области биотехнологии и, в частности, относится к сбору и последующей обработке для очистки бактериальных капсулярных полисахаридов.

Уровень техники изобретения

Neisseria meningitidis является основной причиной инфекции мозговых оболочек (оболочек головного мозга) и спинномозговой жидкости (СМЖ), окружающих головной и спинной мозг, что приводит к смерти и инвалидности во всем мире.

Neisseria meningitidis, также известная как менингококк, является грамотрицательной бактерией. В соответствии со структурой полисахаридной капсулы было идентифицировано 13 серогрупп *N. meningitidis*, из которых 6 серогрупп (А, В, С, W, Х и Y) потенциально могут вызывать эпидемии (см. Lee Harrison et al 2011).

Менингит встречается в небольших очагах по всему миру с сезонными вспышками эпидемического бактериального менингита в различных пропорциях. Наибольшая нагрузка менингококковой инфекции наблюдается на африканском континенте, особенно в странах Африки к югу от Сахары, также известном как пояс менингита. Сотрудники «Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC)» и «Всемирной организации здравоохранения» подсчитали, что менингококковая инфекция стала причиной 171 000 случаев смерти во всем мире в 2000 году. Кроме того, отчет CDC подтверждает появление *Neisseria meningitidis* как основной причины менингита и сепсиса у детей и молодых людей в Соединенных Штатах. Таким образом, *Neisseria meningitidis* продолжает оставаться проблемой общественного здравоохранения как в развитых, так и в развивающихся странах.

В 1996-97 годах в результате эпидемии, вызванной *Neisseria meningitidis* серогруппы А, было зарегистрировано более 250 000 случаев заболевания и более 25 000 случаев смерти; что дополнительно стимулировало мировое медицинское сообщество заняться разработкой вакцины, которая позволила бы ликвидировать эпидемию менингита группы А в Африке.

В 2010 году менингококковая полисахаридная конъюгированная вакцина против менингита А, то есть Менафривак, была успешно внедрена на африканском континенте, что привело к почти полному исчезновению эпидемий, вызванных *Neisseria meningitidis* серогруппы А. Но со снижением влияния *Neisseria meningitidis* серогруппы А, влияние других менингококковых серогрупп, таких как Men-C Men-W, Men-X и Men-Y стало

возрастать. Чтобы противостоять этому драматическому эффекту, были разработаны и выведены на рынок различные моновалентные и поливалентные вакцины, включающие в себя вышеупомянутую серогруппу. Хотя поливалентные конъюгатные вакцины А, С, Y и W были лицензированы с 2005 года (Menactra®, Menveo®) для применения у детей и взрослых в Канаде, Соединенных Штатах Америки и Европе, они доступны на рынке по очень высокой цене, что делает их недоступным для остального мирового сообщества.

Капсула серогруппы А состоит из повторяющихся единиц О-ацетилированного(α 1-6)-связанного N-ацетилманнозамин-1-фосфата. Капсулярные полисахариды из серогрупп В, С, W и Y состоят из производных сиаловой кислоты; серогруппы В и С экспрессируют (α 2→8)- и (α 2→9)-связанные гомополимеры сиаловой кислоты, а чередующиеся последовательности d-галактозы или d-глюкозы и сиаловой кислоты экспрессируются серогруппами W и Y. Загрязняющие примеси при ферментации бульона по-разному взаимодействуют с повторяющимися частями молекул, присутствующими на капсулярных полисахаридах. Следовательно, существует потребность в способе, который использует эти различия для выделения различных бактериальных капсулярных полисахаридов из разных серогрупп.

В соответствии с серией технических докладов ВОЗ по менингококковой конъюгированной вакцине выделенные полисахариды должны отвечать следующим требованиям:

Таблица 1

Контрольный параметр	Требования ВОЗ		
	Men-C	Men-W	Men-Y
Содержание полисахарида (ПС)	>3 мг/мл	>3 мг/мл	>3 мг/мл
Примесь белка	<1%	<5%	<5%
Примесь нуклеиновых кислот	<1%	<2%	<2%
Содержание сиаловой кислоты	>80%	>56%	>56%
Содержание О-ацетила	>1,5 мМ на г ПС	>0,3 мМ на г ПС	>0,3 мМ на г ПС
Содержание эндотоксина	<100 ЕЭ на мкг ПС	<100 ЕЭ на мкг ПС	<100 ЕЭ на мкг ПС

Распределение по размеру молекул	75% больше 0,5 кДа	80% больше 0,5 кДа	80% больше 0,5 кДа
---	--------------------	--------------------	--------------------

Классические способы очистки бактериального капсулярного ПС, используемого в вакцинах, включают в себя несколько селективных осаждений этанолом и/или катионным детергентом с последующим непрерывным центрифугированием, ультрацентрифугированием и депротеинизацией фенолом.

Самая ранняя работа по выделению полисахарида *Neisseria meningitidis* из серогрупп А, В и С была опубликована Gotschlich et al. (1969). Gotschlich et al. использовали катионный детергент цетавлон (гексадецилтриметиламмонийбромид) для быстрого осаждения отрицательно заряженных полисахаридов из интактной культуры с последующей диссоциацией комплекса детергент-полисахарид с применением экстракции 0,9 М CaCl₂ и центрифугирования, методика осаждения этанолом использовалась для удаления нуклеиновых кислот, в то время как белки удаляли путем обработки полисахаридов ацетатом натрия с последующей гомогенизацией с содержащим хлороформ бутанолом, также сообщается об альтернативном использовании горячей смеси фенол-вода. Способ окончательный очистки включал в себя осаждение полисахаридов этанолом (4-5 раз) и ацетоном. Этот метод связан с неудобством использования хлороформа и большого количества этанола. (См. Т.Р. Pato, Master's thesis, Instituto de Quimica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003, p. 95.).

В работе Tanizaki et al. описан способ очистки полисахарида *Neisseria meningitidis* С, в котором экстракция фенолом была заменена расщеплением протеиназой с использованием смеси протеиназы К, нагарса и трипсина; тангенциальной ультрафильтрацией в полых волокнах с отсечением по молекулярной массе 100 кДа вместо ультрацентрифугирования; с последующей интенсивной диафильтрацией с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 100 кДа, выполненной в 20 mM трис-HCl-буфере, содержащем 0,5% дезоксихолата, для удаления низкомолекулярных белков и липополисахаридов (ЛПС). Несмотря на использование вышеуказанных модификаций, выделенный полисахаридный препарат содержал белки и нуклеиновые кислоты в количестве 2% (мас./мас.) и 1,5% (мас./мас.) соответственно [См. Tanizaki et al; Journal of Microbiological Methods Volume 27, Issue 1, September 1996, Pages 19-23 & Goncalves et al 2007;Formatex; Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology].

В работе TP Pato et al. (2006) раскрыт модифицированный способ очистки полисахарида *Neisseria meningitidis* С, включающий в себя центрифугирование в

непрерывном потоке культуры для удаления клеток; концентрацию супернатанта путем тангенциальной фильтрации (отсечение по молекулярной массе 100 кДа); добавление 0,5% DOC, нагрев до 55°C в течение 30 минут и тангенциальную фильтрацию (отсечение по молекулярной массе 100 кДа); анионообменную хроматографию (источник 15Q) и эксклюзионную хроматографию (сефароза CL-4B). [См. T.P. Pato et al. / J. Chromatogr. В 832 (2006) 262–267].

В Патенте US7491517B2 раскрыто применение ЦТАБ, этанола, протеиназы К, активированного угля и гель-фильтрации для удаления примесей во время очистки полисахарида *Neisseria meningitidis* C. Однако этот многоэтапный процесс приводит к потере извлечения полисахарида, а использование активированного угля может привести к нежелательным выщелачиваемым продуктам.

В Международной патентной заявке WO2017006349 описано применение ацетата цинка/сульфата аммония/цитрата натрия для удаления белковых примесей из собранного экстракта *N. meningitidis*. В этом источнике также раскрыто применение ферментов, таких как бензоназа, протеиназа К или нагарса, для разложения остаточных белков и/или материалов нуклеиновых кислот с последующей хроматографической очисткой.

В Международной патентной заявке WO2015128798A1 раскрыт способ удаления примесей из полисахарида *Neisseria meningitidis* C. В указанном способе используется инкубация при температуре 50-60°C в присутствии анионных детергентов, таких как дезоксихолат натрия или HEPES, деацетилирование неочищенных полисахаридов с использованием 0,5-1,5 М NaOH при температуре 50°C в течение от 30 минут до 10 часов и дальнейшая очистка с помощью диафильтрации и хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC).

В работе Tian et al. раскрыт способ очистки полисахаридов *Neisseria meningitidis* серогрупп C, W и Y, включающий в себя использование ЦТАБ, этанола, DOC, Capto Adhere (мультимодалная анионообменная хроматография), Capto DEAE (слабый анион) и Сефадекс G25, где содержание эндотоксина составляет менее 25 ЕЭ/мг, содержание белка менее 10 мг/г, содержание нуклеиновых кислот от 1 до 7 мг/г [См. Tian et al. 2013 GE Healthcare; Application note, 29216880 AA].

Способ Готшлиха, являющийся многоэтапным процессом, приводит к существенной потере извлечения продукта, то есть примерно 37%. Использование химического вещества, такого как фенол, может приводить к нежелательным структурным изменениям в полисахариде или белке-носителе, а также приводит к нежелательным фенольным токсичным отходам.

В описанном в источниках US7491517B2, WO2017006349 и TP Pato et al. (2006) способе используются ферменты, которые способствуют деградации примесей белков и нуклеиновых кислот, однако удаление ферментов и гидролизованного материала является непростой задачей и может привести к потере целевого продукта. Кроме того, регулирующие органы ограничили использование животных ферментов в продуктах для людей из-за риска загрязнения прионами. Использование ферментов, помимо факта высокой стоимости, приводит к появлению большего количества регуляторных проблем в связи с cGMP, например, происхождение ферментов (от животных или рекомбинантных), различия в активности ферментов между различными поставщиками и партиями и т.д.

В источниках WO2017006349 и US4686102A раскрыто применение сульфата аммония для осаждения примесей белка и нуклеиновых кислот. Однако иногда он также осаждает капсулярные полисахариды, что приводит к потере общего полисахарида.

Дезоксихолат натрия (DOC) представляет собой мягкий детергент и является одним из наиболее часто используемых детергент при очистке полисахаридов. Дезоксихолат натрия со стероидной структурой основы меньше денатурирует и ограничен в своей растворяющей способности, он разрушает эндотоксины, не влияя на химическую структуру; и, следовательно, после удаления дезоксихолата натрия эндотоксины возвращают свою биологическую активность. Кроме того, способы на основе DOC не работают эффективно для удаления загрязняющих примесей из полисахаридов, особенно полисахаридов, содержащих сиаловую кислоту. Это может быть связано со слабой детергентной активностью DOC в отношении ассоциации липополисахарид-белок, образующейся во время последующей обработки, что приводит к высокому уровню содержания эндотоксинов и белка в конечном выделенном полисахариде. Кроме того, дезоксихолат натрия является продуктом животного происхождения, даже его остаточное присутствие в конечном продукте может привести к неприятию продукта регулирующими органами и некоторыми религиозными общинами.

Хроматографические методы, такие как эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография и хроматография с гидрофобным взаимодействием, успешно применяются для выделения бактериальных полисахаридов с эффективным удалением примесей белков и нуклеиновых кислот. Несмотря на успешное выделение бактериального полисахарида, соответствующего требованиям ВОЗ, использование хроматографических методов включает в себя многоэтапную трудоемкую и длительную пробоподготовку, имеет проблемы с масштабированием, оно резко ухудшает восстановление капсулярных полисахаридов и, таким образом, не является практически

возможным недорогим вариантом для последующей обработки в промышленных масштабах.

Выщелачивание биологических препаратов составляет 20-80% от общих затрат на производство (Ansejo and Patrick, 1990), и разработка новых стратегий последующей обработки крайне важна для сокращения производственных затрат и обеспечения доступности вакцины для всего населения через систему здравоохранения.

В настоящее время способ, используемый для получения полисахаридов в их очищенных формах, включает в себя несколько этапов обработки детергентом и дифференциальное осаждение полученного бульона с использованием органического растворителя, такого как этанол.

Однако следующие два основных ограничения заставляют искать альтернативный способ очистки.

В настоящее время в качестве начального этапа удаления примесей (белков, нуклеиновых кислот и эндотоксинов) применяется анионное поверхностно-активное вещество дезоксихолат натрия (DOC). DOC представляет собой детергент животного происхождения на основе желчи со стероидной структурой основы. Из-за своей объемной структуры он имеет ограниченную растворимость и меньшую денатурирующую способность в отношении биологических макромолекул. Кроме того, источник его стабильных поставок с необходимой нормативной сертификацией ограничивается одним продавцом/поставщиком.

Высокий расход этанола и включение дополнительных этапов (угольная фильтрация) делают этот процесс трудоемким, длительным и дорогостоящим.

Сохраняется значительная потребность в альтернативных, простых, масштабируемых и экономически эффективных способах очистки бактериальных полисахаридов для получения более высокого выхода полисахаридов. Настоящее изобретение относится к надежному и доступному способу последующей очистки для выделения бактериальных капсулярных полисахаридов, где указанный способ приводит к значительному уменьшению примесей эндотоксина, белка и нуклеиновых кислот, тем самым обеспечивая более высокое извлечение полисахарида, а также поддержание желаемых уровней О-ацетила в соответствии с требованиями ВОЗ.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к альтернативному способу очистки бактериальных капсулярных полисахаридов, в частности, капсулярных полисахаридов *N. meningitidis*.

Данный способ включает в себя концентрирование и диафильтрацию бактериальной биомассы посредством тангенциальной поточной фильтрации с отсечением по молекулярной массе 100 кДа с последующим добавлением анионного детергента и сильной щелочи для денатурации белков, нуклеиновых кислот и липополисахаридов. Затем биологический экстракт подвергают центрифугированию, диафильтрации и осаждению бактериальных полисахаридов с применением ЦТАБ. Предложенный способ приводит к улучшенному выходу полисахарида, является масштабируемым, неферментативным, использует экономически эффективное и меньшее количество этапов очистки. Указанный способ приводит к значительному уменьшению примесей эндотоксина, белка и нуклеиновых кислот, что обеспечивает более высокий выход полисахарида, а также поддерживает желаемые уровни О-ацетила.

Фигуры

Фигура 1: ЯМР-спектры полисахарида Men-C

Фигура 2: ЯМР-спектры полисахарида Men-Y.

Фигура 3: ЯМР-спектры полисахарида Men-W.

Фигура 4: ЯМР-спектры полисахарида Men-A

Фигура 5: ЯМР-спектры полисахарида Men-X

Описание изобретения

В соответствии с общим аспектом изобретения одну из представляющих интерес бактериальных серогрупп выращивают в подходящей среде и инактивируют с использованием формальдегида или любого общеизвестного способа из уровня техники; далее бактериальную культуру подвергают последующей обработке для выделения очищенного капсулярного полисахарида. Представляющие интерес бактерии для выделения капсулярного полисахарида по настоящему изобретению получают из граммотрицательных бактерий, выбранных из рода, включая без ограничений, *Escherichia*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* и т.д.; более предпочтительно капсулярный полисахарид, экспрессируется серогруппой *Neisseria meningitidis*. В другом аспекте настоящего изобретения полисахарид может быть получен из группы, включающей в себя *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus* группы A, *Streptococcus* группы B Ia, Ib, II, III, V, VI или VIII; *Streptococcus* группы C, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp.,

Campylobacter jejuni, *Clostridium* spp., *Clostridium difficile*, *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema* spp., *Borrelia* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira* spp., *Hemophilus ducreyi*, *Corynebacterium diphtheria*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Ehrlichia* spp. и *Rickettsia* spp.. Полисахариды *Streptococcus pneumoniae* типа 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9A, 9F, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 17F, 18C, 19F 19A, 20, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 38 и 45; Полисахариды *Neisseria meningitidis* серогруппы A, B, C, D, W135, X, Y, Z, 29E; и *H. influenzae* типа b.

Биологический материал, использованный во время экспериментов, был следующим:

Полисахариды были выделены из:

Таблица 2

Название организма	Обозначение штамма	Источник штамма
<i>Neisseria meningitidis</i> A	M1027	SynCo Biopartners (Нидерланды)
<i>Neisseria meningitidis</i> C	C11(60E)	CBER/FDA, США
<i>Neisseria meningitidis</i> W	S877	CBER/FDA, США
<i>Neisseria meningitidis</i> Y	M10659	CDC, США
<i>Neisseria meningitidis</i> X	M8210	CBER/FDA, США

Неконъюгированный белок-носитель, то есть CRM197 или TT.CRM197 был получен из рекомбинантного штамма *Pseudomonas fluorescens* CS463-003 (MB101) от Pfenex, США. TT был получен из *Clostridium tetani* (Harvard No. 49205), полученного от CRI, Национального контрольного органа, Казаули, Химачал-Прадеш, Индия. CRI получил этот штамм от NVI, Нидерланды.

В соответствии с первым вариантом осуществления изобретения бактериальный капсулярный полисахарид был очищен из инактивированного сбора с использованием центрифугирования; и супернатант подвергали диафильтрации с использованием установки тангенциальной поточной фильтрации с отсечением по молекулярной массе 100 кДа. Специалисту в данной области техники хорошо понятно, что вместо центрифугирования и диафильтрации может быть использован любой другой подходящий способ для концентрации бактериальных капсулярных полисахаридов. В одном из предпочтительных аспектов осуществления изобретения капсулярный полисахарид был получен из *Neisseria meningitidis* серогруппы A, C, W, Y и X.

В соответствии со вторым вариантом осуществления изобретения ретентат, полученный в первом варианте осуществления изобретения, подвергали обработке анионным поверхностно-активным веществом/детергентом. Анионный детергент выбирают из группы, включающей в себя алкилсульфаты, додецилсульфат натрия, дезоксихолат натрия, додецилсульфонат натрия, s-алкилсульфаты натрия, жирный спирт полиоксиэтиленовый эфир сульфат натрия, олеилсульфат натрия, N-олеилполи(аминокислота) натрия, алкилбензолсульфонаты натрия, альфа-олефинсульфонаты натрия, алкилсульфонаты натрия, сложные эфиры альфа-сульфомонокарбоновых кислот, сложные эфиры сульфоалкиловых жирных кислот, сукцинатный сульфат, алкилнафталинсульфонаты, алкансульфонаты натрия, лигнинсульфонат натрия и сульфонаты натрия алкилглицеридовых эфиров.

Предпочтительно указанное анионное поверхностно-активное вещество представляет собой алкилсульфат, более предпочтительно додецилсульфат натрия в конечной концентрации в диапазоне от 0,1% до 4%, более предпочтительно 1%, его добавляли к ретентату и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Амфипатическая природа ДСН делает его сильным хаотропным агентом, который не только разрушает белки, но и растворяет их.

В другом аспекте второго варианта осуществления изобретения инактивированный сбор может быть непосредственно обработан анионным поверхностно-активным веществом и дополнительно подвергнут концентрированию капсулярного полисахарида, приводя к достаточному снижению количества примесей, что делает последующий этап использования катионного детергента необязательным.

В соответствии с третьим вариантом осуществления изобретения к смеси, полученной в вышеуказанном варианте осуществления изобретения, добавляли сильную щелочь и доводили значение pH до 9-11 при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа. Указанная сильная щелочь была выбрана из группы, включающей в себя гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат натрия, гидроксиламин, триэтиламин и гидроксид лития.

В соответствии с предпочтительным аспектом третьего варианта осуществления изобретения к смеси, полученной в указанном выше варианте осуществления изобретения, указанную сильную щелочь, то есть гидроксид натрия, добавляли в конечной концентрации 5-20 М и значение pH доводили до 10,5 при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа.

В другом аспекте третьего варианта осуществления изобретения к смеси, полученной во втором варианте осуществления изобретения, альтернативно вместо

щелочи добавляли ЭДТА и ацетат натрия при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа.

В соответствии с четвертым вариантом осуществления изобретения раствор, полученный в указанном выше варианте осуществления изобретения, нейтрализовали (рН 7,0) путем добавления мягкой органической кислоты. Указанная мягкая органическая кислота представляет собой комбинацию одной или нескольких кислот, включая муравьиную кислоту, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, щавелевую кислоту и т.д. К этой нейтрализованной смеси добавляли гидрофильный спирт, предпочтительно этанол, до конечной концентрации 30-35% и инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Гидрофильный спирт выбирают из одного из следующих спиртов: метанола, этанола, н-пропилового спирта, изопропилового спирта, ацетона и трет-бутилового спирта; или комбинации двух или более из них; и его концентрация составляет <65% или >95%.

В соответствии с пятым вариантом осуществления изобретения избыток анионного детергента удаляли из раствора. Раствор, полученный в вышеуказанном варианте осуществления изобретения, подвергали центрифугированию и собирали супернатант. 0,1 М калиевую соль смешивали с супернатантом и после ее растворения смесь инкубировали при температуре 2-8°C в течение >3 часов. Калиевая соль выбрана из одной из следующих солей: хлористого калия, ацетата калия, сульфата калия, карбоната калия, бикарбоната калия, фосфата калия, гидрофосфата калия, дигидрофосфата калия, нитрата калия и других солей калия или комбинации двух или более из них. На этом этапе используется низкая растворимость додецилсульфата калия. При добавлении калиевой соли, предпочтительно KCl, ДСН в растворе превращается в додецилсульфат калия, будучи менее растворимым он легко выпадает в осадок, что приводит к полному удалению ДСН. Специалисту в данной области техники хорошо известно, что концентрация KCl может варьироваться для получения желаемого результата. Протокол, упомянутый в этом варианте осуществления изобретения, может быть изменен в соответствии с требованием специалиста в данной области техники.

В другом аспекте пятого варианта осуществления изобретения избыток анионного детергента может быть удален из раствора с использованием гель-фильтрации, осаждения этанолом и ионообменных смол/амберлитовых колонок.

В соответствии с шестым вариантом осуществления изобретения раствор, полученный в указанном выше варианте осуществления изобретения, подвергали центрифугированию и собирали супернатант. Супернатант пропускали через фильтр 0,2

мкм и ретентат подвергали диафильтрации путем тангенциальной поточной фильтрации с отсечением по молекулярной массе 100 кДа.

В соответствии с седьмым вариантом осуществления изобретения ретентат, полученный в указанном выше варианте осуществления изобретения, подвергали диафильтрации с использованием буфера Трис-HCl в конечной концентрации 25 мМ. Затем добавляли катионный детергент до конечной концентрации 1-2% и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при постоянном перемешивании. Катионный детергент(ы) выбирают из соли цетилтриметиламмония, соли тетрабутиламмония, соли миристилтриметиламмония и гексадиметринбромиды; или комбинации двух или более из них. Специалисту в данной области техники хорошо известно, что концентрация катионного детергента может варьироваться в диапазоне от 0,1% до 4%, чтобы получить желаемый результат. Предпочтительно катионный детергент представляет собой ЦТАБ.

В соответствии с восьмым вариантом осуществления изобретения раствор, полученный в указанном выше варианте осуществления изобретения, может быть подвергнут центрифугированию, и осажденный ЦТАБ-полисахарид собирают и растворяют в 30-64% этаноле. Растворенная смесь может быть дополнительно подвергнута центрифугированию для удаления нерастворенных остатков.

В соответствии с девятым вариантом осуществления изобретения к супернатанту, полученному в указанном выше варианте осуществления изобретения, добавляли NaCl до конечной концентрации 0,1 М при постоянном перемешивании. Осажденный полисахарид собирали и растворяли в 1 М NaCl с последующим осаждением спиртом (30-64%).

В соответствии с десятым вариантом осуществления изобретения раствор, полученный в указанном выше варианте осуществления изобретения, подвергали интенсивной диафильтрации водой для инъекций с использованием тангенциальной поточной фильтрации с отсечением по молекулярной массе 100 кДа и пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и хранили при температуре -20°C или ниже в качестве конечной массы.

В соответствии с одиннадцатым вариантом осуществления изобретения очищенный капсулярный полисахарид *N. meningitidis* серогрупп С, W и Y получали приведенным ниже способом:

- *N. meningitidis* серогрупп С, W и Y соответственно выращивали в подходящей среде и инактивировали с использованием формальдегида;
- К этому инактивированному сбору добавляли додецилсульфат натрия до конечной концентрации 1% и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов;

- Добавляли гидроксид натрия до конечной концентрации 05-20 мМ и доводили значение рН до 10,5 при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа;

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, нейтрализовали добавлением мягкой органической кислоты, то есть уксусной кислоты.

- К этому нейтрализованному раствору добавляли этанол до конечной концентрации 30-35% и инкубировали в течение нескольких часов при постоянном перемешивании.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали и собирали супернатант.

- К супернатанту добавляли 0,1М KCL и инкубировали при температуре 2-8°C в течение не менее 3 часов.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, подвергали центрифугированию и собирали супернатант. Супернатант пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и ретентат подвергали диафильтрации путем тангенциальной поточной фильтрации через фильтр с отсечением по молекулярной массе 100 кДа с использованием буфера Трис-HCl.

- К ретентату, полученному на вышеуказанном этапе, добавляли буфер Трис-HCl до конечной концентрации 25 мМ с последующим добавлением ЦТАБ до конечной концентрации 2%; и инкубировали при комнатной температуре не менее 1 часа.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали, осадок собирали и растворяли в 30-64% этаноле. Растворенную смесь затем подвергали центрифугированию для удаления нерастворенных остатков.

- К супернатанту, полученному на вышеуказанном этапе, добавляли NaCl до конечной концентрации 0,1-0,3 М. Осажденный ПС растворяли в 1 М NaCl с последующим осаждением 30-64% спиртом.

- Раствор, полученный на вышеупомянутом этапе, подвергали интенсивной диафильтрации против воды для инъекций при помощи тангенциальной поточной фильтрации с отсечением по молекулярной массе 100 кДа, пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и хранили при температуре -20°C в качестве конечной массы.

В соответствии с двенадцатым вариантом осуществления изобретения способ очистки, упомянутый в одиннадцатом варианте осуществления изобретения, обеспечивает получение

- Полисахарида *N. meningitidis* серогруппы C с выходом 60-80%, в котором содержание эндотоксина составляет менее 50 ЕЭ/мг, содержание белка менее 0,50% и содержание нуклеиновых кислот менее 0,20%.

- Полисахарида *N. meningitidis* серогруппы Y с выходом 60-80%, в котором содержание эндотоксина составляет менее 50 ЕЭ/мг, содержание белка менее 0,50% и содержание нуклеиновых кислот менее 0,30%.

- Полисахарида *N. meningitidis* серогруппы W с выходом 60-80%, в котором содержание эндотоксина составляет менее 50 ЕЭ/мг, содержание белка менее 0,5% и содержание нуклеиновых кислот менее 0,2%.

В соответствии с тринадцатым вариантом осуществления изобретения очищенный капсулярный полисахарид *N. meningitidis* серогрупп А и Х получали приведенным ниже способом:

- *N. meningitidis* серогрупп А и Х соответственно выращивали в подходящей среде и инактивировали с использованием формальдегида;

- К этой инактивированному сбору добавляли додецилсульфат натрия до конечной концентрации 1% и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов;

- К этой инактивированному сбору добавляли ЭДТА и ацетат натрия до конечной концентрации 1% и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов;

- Добавляли этанол до конечной концентрации 30-35% и инкубировали в течение двух часов при постоянном перемешивании.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали и собирали супернатант.

- К супернатанту добавляли 0,1М KCl и инкубировали при температуре 2-8°C в течение не менее 3 часов.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, подвергали центрифугированию и собирали супернатант. Супернатант пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и ретентат концентрировали и подвергали диафильтрации путем тангенциальной поточной фильтрации через фильтр с отсечением по молекулярной массе 100 кДа с использованием 25 mM буфера Трис-HCl.

- Добавляли ЦТАБ до конечной концентрации 1-2%; и инкубировали при комнатной температуре не менее 1 часа.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали, осадок собирали и растворяли в 30-64% этаноле. Растворенную смесь затем подвергали центрифугированию для удаления нерастворенных остатков.

- К супернатанту, полученному на вышеуказанном этапе, добавляли NaCl до конечной концентрации 0,1-0,3 М. Осажденный ПС растворяли в 1 М NaCl с последующим осаждением 30-64% спиртом.

- Раствор, полученный на вышеупомянутом этапе, подвергали интенсивной диафильтрации против воды для инъекций при помощи тангенциальной поточной фильтрации с отсечением по молекулярной массе 100 кДа, пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и хранили при температуре -20°C в качестве конечной массы.

В соответствии с четырнадцатым вариантом осуществления изобретения способ очистки, упомянутый в тринадцатом варианте осуществления изобретения, обеспечивает получение

- Полисахарида *N. meningitidis* серогруппы А с выходом 60-80%, в котором содержание эндотоксина составляет менее 50 ЕЭ/мг, содержание белка менее 0,50% и содержание нуклеиновых кислот менее 0,20%.

- Полисахарида *N. meningitidis* серогруппы Х с выходом 60-80%, в котором содержание эндотоксина составляет менее 50 ЕЭ/мг, содержание белка менее 0,50% и содержание нуклеиновых кислот менее 0,30%.

В соответствии с пятнадцатым вариантом осуществления изобретения указанный очищенный полисахарид конъюгировали с белком-носителем. Понятно, что белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридами, может представлять собой любой белок-носитель, известный в данной области техники, в соответствии с требованиями специалиста в данной области техники. Не ограничивающие примеры белков-носителей включают в себя белок-носитель из следующей неограниченной группы, CRM 197, дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, коклюшный анатоксин, LT *E.coli*, ST *E.coli*, экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс белков наружной мембраны с (ОМРС), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый адгезиновый белок (PsaA), пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, защитный антиген (РА) *Bacillus anthracis*, детоксифицированный фактор вызывающий отек (ЕF), летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин фисуреллы (KLH), человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин (БСА) и очищенное белковое производное туберкулина (PPD).

В другом аспекте пятнадцатого варианта осуществления изобретения перед конъюгированием полисахарид, очищенный данным способом, доводили до определенного размера химическими или механическими способами, включая, без ограничений обработку ультразвуком, обработку микроволнами, озонлиз, обработку ионизирующим излучением, разрушение клеток под высоким давлением, применение гомогенизатора, применение микрофлюидизера, обработку ацетатом натрия, обработку метапериодатом натрия, нагревание в вакууме и т.д.

В другом аспекте пятнадцатого варианта осуществления изобретения полисахарид, очищенный данным способом, может быть конъюгирован с белком-носителем с использованием восстановительного аминирования, цианилирования, конъюгирования с карбодиимидом.

В соответствии с шестнадцатым вариантом осуществления изобретения получали иммуногенную композицию. Данная композиция состояла из:

(а) конъюгата (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы А и (ii) столбнячного анатоксина;

(b) конъюгата (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы С и (ii) CRM197;

(с) конъюгата (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы Y и (ii) CRM197;

(d) конъюгата (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы W135 и (ii) CRM197; и

(е) конъюгата (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы Х и (ii) столбнячного анатоксина.

В соответствии с семнадцатым вариантом осуществления изобретения содержание эндотоксинов может быть измерено при помощи «Испытания на бактериальные эндотоксины с помощью кинетического турбидиметрического анализа (КТА)» или испытания на пирогенность у кролика; содержание белка может быть измерено методом Лоури; и содержание нуклеиновых кислот может быть измерено с помощью спектрофотометрии. Понятно, что любой другой подходящий метод может быть использован для количественного определения содержания эндотоксина, белков и нуклеиновых кислот.

В другом аспекте семнадцатого варианта осуществления изобретения распределение по размеру молекул очищенного полисахарида *Neisseria meningitidis* серогруппы А, С, W, Y и Х может быть выполнено с использованием эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В другом аспекте шестнадцатого варианта осуществления изобретения содержание О-ацетила может быть измерено с использованием колориметрического анализа по методу Хестрина.

Примеры

Пример 1: Получение бактериальных полисахаридов (процесс накопления *N. meningitidis* серогруппы С)

Полисахариды получали при помощи описанного ниже процесса ферментации.

Объем ферментации: 300 литров

- Для подготовки ферментера проводили мойку на месте (CIP), испытание на удерживание давления и стерилизацию на месте (SIP).

- После завершения SIP стерильную среду для ферментации асептически переносили в ферментер.

- Состав среды

Среда для ферментации серогруппы С

Таблица 3

Ингредиент	Количество (г/л)
Моногидрат D-глюкозы	10
Хлорид натрия	5,8
L-аргинин	1
L-серин	1
Хлорид кальция	0,028
Гептагидрат сульфата железа (II)	0,01
Хлорид аммония	0,3
Дикалийгидрофосфат	4
Дрожжевой экстракт	5
Хлорид магния	0,4
Соевый пептон	3
Казаминовые кислоты	5
L-глутамат натрия моногидрат	10
Сульфат аммония	1,2
L-цистин	0,3

Питательная среда для серогруппы С

Таблица 4

Ингредиент	Количество (г/л)
Моногидрат D-глюкозы	200
L-глутамат натрия моногидрат	150
Казаминовые кислоты	4
Хлорид аммония	0,2

- Уровень растворенного кислорода регулировали до желаемого уровня.

- Среду для ферментации инокулировали культуральным организмом. Ферментер работал в режиме периодического культивирования с подпиткой в течение 11-14 часов.

- После того как культура достигает желаемой ОП при длине волны 590 нм, культуру в ферментере инактивировали, используя формальдегид.

- После завершения инкубации температуру устанавливали на уровне $10 \pm 5^{\circ}\text{C}$ с последующим отделением клеток с помощью центрифугирования.

- Супернатант собирали и подвергали глубокой фильтрации; первично очищенный сбор фильтровали с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм и переносили на очистку.

Результаты:

Таблица 5

Параметр	Men-C
Общий выход ПС биомассы (мг/л)	703,33
Примесь эндотоксина (ЕЭ на мг ПС)	>500
Примесь белка (%)	109
Примесь нуклеиновых кислот (%)	12,3

Пример 2: Получение капсулярных полисахаридов (процесс накопления *N. meningitidis* серогруппы A, W, X и Y)

Используя протокол, упомянутый в примере 1, получали капсулярный полисахарид *N. meningitidis* серогруппы A, W, X и Y.

Среда для ферментации серогруппы Y

Таблица 6

Ингредиент	Количество (г/л)
Моногидрат D-глюкозы	10
Хлорид натрия	5,8
Сульфат калия	1
L-аргинин	0,75
L-серин	0,75
L-цистеин	0,4
Хлорид кальция	0,025
Гептагидрат сульфата железа (II)	0,01

Хлорид аммония	0,15
Дикалийгидрофосфат	4
Дрожжевой экстракт	3
Хлорид магния	0,3
Соевый пептон	3
Казаминовые кислоты	5
Тиамин гидрохлорид	0,05
L-глутамат натрия моногидрат	10
L-триптофан	0,2

Питательная среда для серогруппы Y

Таблица 7

Ингредиент	Количество (г/л)
Моногидрат D-глюкозы	200
L-глутамат натрия моногидрат	150
L-аргинин	1
L-серин	1
Соевый пептон	10
Дрожжевой экстракт	16,6

Среда для ферментации серогруппы W

Таблица 8

Ингредиент	Количество (г/л)
Моногидрат D-глюкозы	10
Хлорид натрия	5,8
Сульфат калия	1
L-аргинин	0,75
L-серин	0,75
L-цистеин	0,4
Хлорид кальция	0,025
Гептагидрат сульфата железа (II)	0,01
Хлорид аммония	0,25
Дикалийгидрофосфат	4
Дрожжевой экстракт	3

Хлорид магния	0,3
Соевый пептон	3
Казаминовые кислоты	5
Тиамин гидрохлорид	0,05
L-глутамат натрия моногидрат	10

Питательная среда для серогруппы W

Таблица 9

Ингредиент	Количество (г/л)
Моногидрат D-глюкозы	200
L-глутамат натрия моногидрат	150
L-аргинин	4
L-серин	4
Соевый пептон	4
Дрожжевой экстракт	4
Хлорид магния	1,6
Хлорид кальция	0,2
Хлорид аммония	0,8

Результаты:

Таблица 10

Параметр	Men-A	Men-X	Men-W	Men-Y
Неочищенный ПС (мг/л)	2540	1024	733	1205
Эндотоксин (ЕЭ на мкг ПС)	>500	>500	>500	>500
Белок (%)	19,31	18,2	60,5	38
Нуклеиновые кислоты (%)	1,2	1,16	12	3,3

Первично очищенный сбор по результатам тестирования содержал ПС (полисахарид) в количестве 1-6 г/л. Этот первично очищенный сбор подвергали дальнейшей очистке.

Пример 3: Очистка капсулярных полисахаридов (процесс выделения и очистки продукта *N. meningitidis* серогруппы C) с использованием ДСН с последующим осаждением спиртом.

Неочищенный полисахарид, полученный в соответствии с Примером 1, смешивали с растворами ДСН различной концентрации. Затем добавляли этанол до конечной концентрации, которая примерно на 10% ниже концентрации, при которой полисахарид начинает осаждаться. Полученную смесь далее подвергали фильтрации.

Использованные концентрации ДСН:

0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% и 10%

Все вышеупомянутые концентрации ДСН показали эффективность в отношении уменьшения примесей. При концентрации ДСН выше 4% не наблюдалось существенных различий в профиле примесей.

Оптимальное уменьшение примесей, особенно белков, наблюдалось при концентрации ДСН равной 1%.

Очищенный полисахарид имел содержание примеси эндотоксинов > 100 ЕЭ на мкг полисахарида, тогда как предел ВОЗ составляет < 100 ЕЭ на мкг полисахарида.

Пример 4: Очистка капсулярных полисахаридов (процесс выделения и очистки продукта *N. meningitidis* серогруппы C)

Протокол:

Было проведено два различных эксперимента с объемом ферментационной смеси 5 и 300 литров.

Полисахариды очищали, используя описанный ниже процесс очистки.

- Неочищенный полисахарид, полученный в Примере 1, помещали в сосуд.
- Неочищенный полисахарид концентрировали в 3-6 раз путем тангенциальной поточной фильтрации с отсечением по молекулярной массе 100 кДа.
- К этому инаktivированному сбору добавляли додецилсульфат натрия до конечной концентрации 1% и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов;
- Добавляли гидроксид натрия до конечной концентрации 0,8-20 мМ и значение pH доводили до 10,5 при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа;
- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, нейтрализовали добавлением уксусной кислоты.

- К этому нейтрализованному раствору добавляли этанол до конечной концентрации 33% и инкубировали в течение нескольких часов при постоянном перемешивании.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали и собирали супернатант.

- Концентрацию этанола увеличивали до 40%.

- К супернатанту добавляли 0,1M KCL и инкубировали при температуре 2-8°C в течение не менее 3 часов.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали и собирали супернатант. Полисахарид осаждали путем увеличения конечной концентрации этанола до 65%.

- Полисахаридный осадок растворяли в 1 M NaCl. Супернатант пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и ретентат подвергали диафильтрации путем тангенциальной поточной фильтрации через фильтр с отсечением по молекулярной массе 100 кДа с использованием 25 mM буфера Трис-HCl, чтобы получить очищенный полисахарид (Этап I).

- Добавляли ЦТАБ до конечной концентрации 2%; и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали, осадок собирали и растворяли в 96% этаноле. Растворенную смесь затем центрифугировали для удаления нерастворенных остатков.

- К супернатанту, полученному на вышеуказанном этапе, добавляли NaCl до конечной концентрации 0,2 M. Осажденный ПС растворяли в 1 M NaCl с последующим осаждением ПС с использованием 65% спирта.

- Раствор, полученный на вышеописанном этапе, подвергали интенсивной диафильтрации против 0,5 M NaCl, затем воды для инъекций путем тангенциальной поточной фильтрации через фильтр с отсечением по молекулярной массе 100 кДа, пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и хранили при температуре -20°C в качестве конечной массы.

Результаты:

Таблица 11

N. meningitidis серогруппа С	Неочищенный полисахарид		Очищенный полисахарид Этап I		Очищенный полисахарид Этап II	
	Объем	5 л	300 л	5 л	300 л	5 л

ферментации						
Объем ПС	1	50	0,65	30	0,6	18
Концентрация ПС (мг/мл)	3,87	4,22	3,83	5,62	3,08	7,33
Общее кол-во ПС (грамм)	3,87	211	2,48	168	1,84	131,94
Примесь белка (%)	93,79	109,47	0,6	0,52	0,25	0,13
Примесь нуклеиновых кислот (%)	7,49	12,32	0,02	0,3	0,02	0,08
Примесь эндотоксина (ЕЭ на мкг ПС)	н.п.	н.п.	<20	<30	<20	40
Извлечение на этапе (%)	н.п.	н.п.	64,3	79,9	74,23	78,25
Размер молекулы по ВЭЖХ (кДа)	н.п.	н.п.	434	450	392	376
Содержание О-ацетила Предел: >1,5 ммоль/г	н.п.	н.п.	2,8	2,85	2,64	2,6
Общее окончательное извлечение (%)	н.п.	н.п.	64,3	79,9	64	62,5

Примечание: н.п. = не применимо

Было проведено два различных эксперимента с объемом ферментационной смеси 5 и 300 литров.

Было отмечено, что совместное использование анионного детергента и щелочи оказало сильное влияние на уменьшение профиля примесей. Уровень примесей на этапе очистки I и этапе очистки II значительно ниже предельных значений ВОЗ для полисахарида Men-C.

При объеме 5 литров и 300 литров примесь белка (%) = <1%; примесь нуклеиновых кислот (%) = <0,3%; примесь эндотоксина (ЕЭ на мкг ПС) = <40 ЕЭ на мкг ПС.

При обоих объемах и на этапе очистки I и этапе очистки II извлечение очищенного полисахарида было выше 60% по сравнению с неочищенным образцом.

Пример 5: Очистка капсулярных полисахаридов (процесс выделения и очистки продукта *N. meningitidis* серогруппы W и Y)

Протокол:

Было проведено два различных эксперимента с объемом ферментационной смеси 5 и 300 литров.

Полисахариды очищали, используя описанный ниже процесс очистки.

- Неочищенный полисахарид, полученный в Примере 2, помещали в сосуд.
- Неочищенный полисахарид концентрировали в 3-6 раз путем тангенциальной поточной фильтрации с отсечением по молекулярной массе 100 кДа.
- К этому инактивированному сбору добавляли додецилсульфат натрия до конечной концентрации 1% и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов;
- Добавляли гидроксид натрия до конечной концентрации 0,8-20 мМ и значение pH доводили до 10,5 при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа;
- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, нейтрализовали добавлением уксусной кислоты.
- К этому нейтрализованному раствору добавляли этанол до конечной концентрации 33% и инкубировали в течение нескольких часов при постоянном перемешивании.
- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали и собирали супернатант.
- К супернатанту добавляли 0,1М KCL и инкубировали при температуре 2-8°C в течение примерно 8 часов.
- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали и собирали супернатант.
- Супернатант пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и ретентат подвергали диафильтрации путем тангенциальной поточной фильтрации через фильтр с отсечением по молекулярной массе 100 кДа с использованием 25 мМ буфера Трис-HCl, чтобы получить очищенный полисахарид (Этап I).
- Добавляли ЦТАБ до конечной концентрации 2%; и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали, осадок собирали и растворяли в 96% этаноле. Растворенную смесь затем центрифугировали для удаления нерастворенных остатков.

- К супернатанту, полученному на вышеуказанном этапе, добавляли NaCl до конечной концентрации 0,25 М. Осажденный ПС растворяли в 1 М NaCl с последующим осаждением ПС с использованием 65% спирта.

- Раствор, полученный на вышеописанном этапе, подвергали интенсивной диафильтрации против воды для инъекций путем тангенциальной поточной фильтрации через фильтр с отсечением по молекулярной массе 100 кДа, пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и хранили при температуре -20°C в качестве конечной массы (Этап II).

Результат:

Таблица 12

N. meningitidis серогруппа Y	Неочищенный полисахарид		Очищенный полисахарид Этап I		Очищенный полисахарид Этап II	
Объем ферментации	5 л	300 л	5 л	300 л	5 л	300 л
Объем ПС	1,25	50	0,75	35	0,8	29,5
Концентрация ПС (мг/мл)	5,67	7,23	7,23	7,88	5,39	8,41
Общее кол-во ПС (грамм)	7,08	361,5	5,42	275,8	4,31	248
Примесь белка (%)	38,62	38,03	2,21	1,64	0,16	0,08
Примесь нуклеиновых кислот (%)	1,94	3,31	0,69	0,25	0,11	0,71
Примесь эндотоксина (ЕЭ на мгк ПС)	н.п.	н.п.	50	56	44	45
Извлечение на этапе (%)	н.п.	н.п.	76,50	76,29	79,52	89,95
Размер	н.п.	н.п.	660	620	608	543

молекулы по ВЭЖХ (кДа)						
Содержание О-ацетила Предел: >0,3 ммоль/г	н.п.	н.п.	0,85	0,8	0,79	0,75
Общее окончательное извлечение (%)	н.п.	н.п.	76,50	76,29	60,83	68,62

Таблица 13

N. meningitidis серогруппа W	Неочищенный полисахарид		Очищенный полисахарид Этап I		Очищенный полисахарид Этап II	
Объем ферментации	5 л	300 л	5 л	300 л	5 л	300 л
Объем ПС	1	39	0,8	28,5	0,8	16,5
Концентрация ПС (мг/мл)	4,26	5,65	3,5	6,01	3,25	8,75
Общее кол-во ПС (грамм)	4,26	220	2,8	171	2,6	144
Примесь белка (%)	62,1	60,53	3,4	2,16	<0,21	<0,21
Примесь нуклеиновых кислот (%)	7,98	12	0,85	1,16	0,1	0,09
Примесь эндотоксина (ЕЭ на мгк ПС)	н.п.	н.п.	<30	<40	<20	<10
Извлечение на этапе (%)	н.п.	н.п.	65	77	92	84,2
Размер молекулы по ВЭЖХ (кДа)	н.п.	н.п.	400	420	395	380
Содержание О-	н.п.	н.п.	1,21	1,15	1,05	0,99

ацетила Предел: >0,3 ммоль/г						
Общее окончательное извлечение (%)	н.п.	н.п.	65	77	61	65,4

Было проведено два различных эксперимента с объемом ферментационной смеси 5 и 300 литров.

При сравнении наблюдали, что уровень примесей на этапе очистки I и этапе очистки II значительно ниже пределов требований ВОЗ для полисахарида Men-Y и Men-W.

Было отмечено, что совместное использование анионного детергента и щелочи оказало сильное влияние на уменьшение профиля примесей. Уровень примесей на этапе очистки I и этапе очистки II значительно ниже предельных значений ВОЗ для полисахарида Men-C.

При объеме 5 литров и 300 литров примесь белка (%) = <3,5%; примесь нуклеиновых кислот (%) = <1,5%; примесь эндотоксина (ЕЭ на мкг ПС) = <60 ЕЭ на мкг ПС.

При обоих объемах и на этапе очистки I и этапе очистки II извлечение очищенного полисахарида было выше 60% по сравнению с неочищенным образцом.

Пример 6: Очистка капсулярных полисахаридов (процесс выделения и очистки продукта *N. meningitidis* серогруппы A и X)

Протокол:

Было проведено два различных эксперимента с объемом ферментационной смеси 5 и 300 литров.

Полисахариды очищали, используя описанный ниже процесс очистки.

- Неочищенный полисахарид, полученный в Примере 2, помещали в сосуд.
- Неочищенный полисахарид концентрировали в 3-6 раз путем тангенциальной поточной фильтрации с отсечением по молекулярной массе 100 кДа.
- К этому инактивированному сбору добавляли додецилсульфат натрия до конечной концентрации 1% и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов;
- Добавляли ацетат натрия, ЭДТА и додецилсульфат натрия до конечной концентрации 6%, 2 mM и 1% соответственно; при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа;

- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали и собирали супернатант.
- К супернатанту добавляли 0,1М KCL и инкубировали при температуре 2-8°C в течение примерно 3 часов.
- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали и собирали супернатант.
- Супернатант пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и ретентат подвергали диафильтрации путем тангенциальной поточной фильтрации через фильтр с отсечением по молекулярной массе 100 кДа с использованием 25 мМ буфера Трис-HCl, чтобы получить очищенный полисахарид (Этап I).
- Добавляли ЦТАБ до конечной концентрации 2%; и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.
- Раствор, полученный на вышеуказанном этапе, центрифугировали, осадок собирали и растворяли в 96% этаноле. Растворенную смесь затем центрифугировали для удаления нерастворенных остатков.
- К супернатанту, полученному на вышеуказанном этапе, добавляли NaCl до конечной концентрации 0,2 М. Осажденный ПС растворяли в 1 М NaCl с последующим осаждением ПС с использованием 65% спирта.
- Раствор, полученный на вышеописанном этапе, подвергали интенсивной диафильтрации против воды для инъекций путем тангенциальной поточной фильтрации через фильтр с отсечением по молекулярной массе 100 кДа, пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и хранили при температуре -20°C в качестве конечной массы (Этап II).

Результаты:

Таблица 14

N. meningitidis серогруппа А	Неочищенный полисахарид	Очищенный полисахарид Этап I	Очищенный полисахарид Этап II
Объем ферментации	300 л	300 л	300 л
Объем ПС	50	45	30
Концентрация ПС (мг/мл)	11,44	6,63	9,75
Общее кол-во ПС (грамм)	572	298,35	292,5

Примесь белка (%)	19,31	2,05	0,14
Примесь нуклеиновых кислот (%)	1,22	0,12	0,05
Примесь эндотоксина (ЕЭ на мгк ПС)	н.п.	29,08	35
Остаточное содержание ДСН (м.д.)	н.п.	<5	<5
Извлечение на этапе (%)	н.п.	52	98
Размер молекулы по ВЭЖХ (кДа)	н.п.	350	306
Содержание О-ацетила Предел: >2 ммоль/г	н.п.	2,69	2,65
Общее окончательное извлечение (%)	н.п.	52	51

Таблица 15

N. meningitidis серогруппа X	Неочищенный полисахарид	Очищенный полисахарид Этап I	Очищенный полисахарид Этап II
Объем ферментации	300 л	300 л	300 л
Объем ПС	55	40	30
Концентрация ПС (мг/мл)	5,05	5,23	6,21
Общее кол-во ПС (грамм)	277,75	209,2	186,30

Примесь белка (%)	18,21	0,6	0,54
Примесь нуклеиновых кислот (%)	1,16	0,76	0,14
Примесь эндотоксина (ЕЭ на мкг ПС)	н.п.	30	13,79
Остаточное содержание ДСН (м.д.)	н.п.	<5	<5
Извлечение на этапе (%)	н.п.	75,3	88,9
Размер молекулы по ВЭЖХ (кДа)	н.п.	485	479
Общее окончательное извлечение (%)	н.п.	75,3	67,25

При сравнении наблюдали, что уровень примесей на этапе очистки I и этапе очистки II значительно ниже пределов требований ВОЗ для полисахарида Men-A и Men-X.

Было отмечено, что использование анионного детергента оказало сильное влияние на уменьшение профиля примесей. Уровень примесей на этапе очистки I и этапе очистки II значительно ниже предельных значений ВОЗ для полисахарида Men-A и Men-X.

При объеме 300 литров примесь белка (%) = <2,5%; примесь нуклеиновых кислот (%) = <1%; примесь эндотоксина (ЕЭ на мкг ПС) = <40 ЕЭ на мкг ПС.

При обоих объемах и на этапе очистки I и этапе очистки II извлечение очищенного полисахарида серогруппы X было выше 60%, а полисахарида серогруппы A было выше 50% по сравнению с неочищенным образцом.

Пример 7:

Структурная целостность выделенных полисахаридов (ПС)

См. Фигуры 1-5 для ЯМР спектров.

Структурная целостность выделенных полисахаридов *N. meningitidis* серогруппы A, C, W, Y и X была подтверждена с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Зарегистрированные ЯМР спектры были сопоставимы и подтвердили их идентичность как частично О-ацетилированного менингококкового полисахарида серогруппы А, С, W и Y; и N-ацетилированного полисахарида серогруппы X.

Пример 8:

Сравнительный анализ процесса очистки на основе дезоксихолата натрия (DOC) и заявленного способа очистки полисахаридов.

Способ очистки на основе дезоксихолата натрия (DOC) «An improved method for meningococcus polysaccharide purification Tanizaki et al (Conjugate and Polysaccharide Vaccines, Poster 79, <http://neisseria.org/ipnc/1996/Neis1996-chap4.pdf>)» оптимизировали следующим образом:

Сбор молекулярной массой 100 кДа; Обработка DOC + ЭДТА + NaOAc + этанол (40%); центрифугирование, сбор супернатанта и фильтрация через фильтр с размером пор 0,2 мкм; Концентрирование и диафильтрация; обработка ЦТАБ (3%) при комнатной температуре; Центрифугирование и сбор осаденного ЦТАБ-ПС; Растворение осадка ЦТАБ -ПС в 96% этаноле и осаждение 0,1 М NaCl; Растворение осадка в 40% этаноле и добавление 1 М NaCl (2-8°C); Центрифугирование и сбор супернатанта; Угольная фильтрация; Осаждение ПС за счет увеличения концентрации этанола; Растворение гранул ПС в воде для инъекций и концентрирование и диафильтрация с водой для инъекций и хранение при температуре -20°C после фильтрации через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

Способ очистки на основе DOC широко применяется в промышленности для очистки полисахаридов, используемых в качестве вакцинного антигена.

Профиль примесей для полисахарида, полученного способом очистки на основе DOC, сравнивали с заявленным способом настоящего изобретения.

Результаты:

Таблица 16

		% окончательного извлечения	% белка	% нуклеиновых кислот	Эндотоксин (ЕЭ на мгк ПС)
Men-A	DOC	65	<0,3	<0,2	<20
	ДСН	64	<0,3	<0,2	<20
Men-C	DOC	65	<0,3	<0,2	<20
	ДСН	62,00	<0,3	<0,2	<20

Men-W	DOC	60	<0,5	<0,5	<30
	ДСН	70	<0,5	<0,5	<30
Men-Y	DOC	60	<0,5	<0,5	<30
	ДСН	70	<0,5	<0,5	<30
Men-X	DOC	65	<0,3	<0,2	<20
	ДСН	70	<0,3	<0,2	<20

Способ настоящего изобретения на основе ДСН и способ на основе DOC показали аналогичные результаты для серогруппы А и С, тогда как для серогруппы W, Y и X способ на основе ДСН показал улучшенное окончательное извлечение по сравнению со способом на основе DOC.

Как видно из приведенных выше результатов, модифицированный способ на основе ДСН имеет явные преимущества с точки зрения, как простоты эксплуатации, так и ряда других преимуществ, таких как то, что DOC, являющийся компонентом животного происхождения, и не совместимый с требованиями Халяль. DOC производится и поставляется одним поставщиком по всему миру, в то время как ДСН является синтетическим детергентом, сертифицированным по Халяль, и у него есть несколько поставщиков, доступных по всему миру. DOC расщепляет эндотоксины, не влияя на химический состав, и после удаления этого детергента они могут восстановить свою биологическую активность, в то время как ДСН, благодаря своей амфипатической природе и более высокому агрегационному числу, хорошо денатурирует и растворяет белки, а также необратимо разрушает эндотоксины до их мономерных единиц.

При использовании ДСН имеет место уменьшенное потребление химических реактивов и расходных материалов (этанол, ультрафильтры, угольные фильтры и т.д.), что является явным преимуществом. Кроме того, использование ДСН в качестве замены является неинвазивным для структурной целостности полисахаридов.

Пример 9:

Иммуногенную композицию, как показано ниже, готовили и проверяли на иммуногенность.

Композиция состояла из:

(а) конъюгата (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы А и (ii) столбнячного анатоксина;

(b) конъюгата (i) капсулярного сахара Neisseria meningitidis серогруппы C и (ii) CRM197;

(c) конъюгата (i) капсулярного сахара Neisseria meningitidis серогруппы Y и (ii) CRM197;

(d) конъюгата (i) капсулярного сахара Neisseria meningitidis серогруппы W135 и (ii) CRM197; и

(e) конъюгата (i) капсулярного сахара Neisseria meningitidis серогруппы X и (ii) столбнячного анатоксина.

Результаты:

Было установлено, что иммуногенная композиция является иммуногенной.

Преимущества изобретения:

Данный способ приводит к значительному уменьшению примесей эндотоксина, белка и нуклеиновых кислот, обеспечивая тем самым более высокое извлечение капсулярного полисахарида с желаемым уровнем О-ацетила. Как видно из приведенных выше результатов, заявленный способ имеет явные преимущества с точки зрения простоты эксплуатации, а также ряд других преимуществ, таких как:

Проблема соблюдения нормативно-правового регулирования: DOC является компонентом животного происхождения и не соответствует требованиям Халяль. Он производится и поставляется одним поставщиком по всему миру, в то время как ДСН является синтетическим детергентом, сертифицированным по Халяль, а также имеет нескольких поставщиков, доступных по всему миру.

Функциональная проблема: DOC расщепляет эндотоксины, не влияя на их химический состав, и после удаления этого детергента они могут восстановить свою биологическую активность, тогда как ДСН благодаря своей амфипатической природе и более высокому агрегационному числу, денатурирует и растворяет белки, а также необратимо разрушает эндотоксины до их мономерных единиц.

При использовании ДСН имеет место уменьшенное потребление химических реактивов и расходных материалов (этанол, ультрафильтры, угольные фильтры и т.д.), что является явным преимуществом.

Способ, описанный в настоящей патентной заявке, приводит к значительному снижению других клеточных примесей. Кроме того, данный способ обеспечивает эффективное удаление реагентов, используемых во время первичной и последующей переработки.

Кроме того, способ, описанный в настоящей патентной заявке, является неинвазивным для структурной целостности полисахаридов, что позволяет им сохранить свою иммуногенность.

Ввиду множества возможных вариантов осуществления, к которым могут быть применены принципы раскрытого изобретения, следует понимать, что иллюстративные варианты осуществления изобретения являются только предпочтительными примерами изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения полисахарида из биологического образца, включающий в себя следующие этапы:

- a) смешивание раствора неочищенного полисахарида с анионным детергентом;
 - b) добавление к раствору щелочи;
 - c) нейтрализация pH раствора;
 - d) спиртовое осаждение раствора с последующим центрифугированием и удержанием супернатанта;
 - e) удаление детергента, присутствующего в супернатанте;
 - f) концентрирование и диафильтрация полисахарида;
- где полученный очищенный полисахарид имеет степень извлечения 60-80%; оптимальные уровни О-ацетилирования и минимальное содержание примесей, состоящих из эндотоксинов, белков и нуклеиновых кислот.

2. Способ по п. 1, где способ дополнительно включает в себя следующие этапы:

- g) смешивание раствора полисахарида с катионным детергентом;
- h) центрифугирование раствора и сбор осадка;
- i) растворение осадка в спирте с последующим осаждением полисахаридов с использованием соли.

3. Анионный детергент по п.1 выбранный из группы, включающей в себя алкилсульфаты, додецилсульфат натрия, дезоксихолат натрия, додецилсульфонат натрия, s-алкилсульфаты натрия, жирный спирт полиоксиэтиленовый эфир сульфат натрия, олеилсульфат натрия, N-олеилполи(аминокислота) натрия, алкилбензолсульфонаты натрия, альфа-олефинсульфонаты натрия, алкилсульфонаты натрия, сложные эфиры альфа-сульфомонокарбоновых кислот, сложные эфиры сульфоалкиловых жирных кислот, сукцинатный сульфонат, алкилнафталинсульфонаты, алкансульфонаты натрия, лигнинсульфонат натрия и сульфонаты натрий алкилглицеридовых эфиров.

4. Способ по п.3, где анионный детергент представляет собой додецилсульфат натрия (ДСН).

5. Способ по п.3, где конечная концентрация анионного детергента(ДСН) в растворе находится в диапазоне от 0,1 до 4,0%, предпочтительно менее 1%.

6. Способ по п.1, где щелочь выбрана из группы, включающей в себя гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат натрия, гидроксилламин, триэтиламин и гидроксид лития.

7. Способ по п.1, где щелочь представляет собой гидроксид натрия.

8. Способ по п.1, где конечная концентрация щелочи в растворе находится в диапазоне от 5 до 50 мМ, предпочтительно в диапазоне от 5 до 20 мМ и наиболее предпочтительно в диапазоне от 8 до 15 мМ.

9. Способ по п.1, где рН раствора после добавления щелочи находится в диапазоне значений рН от 9 до 11, предпочтительно значение рН составляет 10,5.

10. Способ по п.1, где раствор нейтрализуют (рН 7,0) путем добавления мягкой органической кислоты.

11. Способ по п.10, где мягкая органическая кислота представляет собой муравьиную кислоту, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, щавелевую кислоту; предпочтительно уксусную кислоту.

12. Способ по п.1, где удаление детергента осуществляют с использованием, по меньшей мере, одной или нескольких из следующих операций: обработка калиевой солью, гель-фильтрация, обработка этанолом и использование ионообменных смол/амберлитовых колонок.

13. Способ по п.1, где удаление детергента осуществляют путем осаждения детергента с использованием калиевой соли.

14. Способ по п.13, где калиевая соль представляет собой хлорид калия, ацетат калия, сульфат калия, карбонат калия, бикарбонат калия, фосфат калия, гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия, нитрат калия и другие соли калия или комбинацию двух или более из них.

15. Способ по п.14, где калиевая соль представляет собой хлорид калия.

16. Способ по п.13, где конечная концентрация калиевой соли в растворе выше или равна концентрации, при которой анионный детергент осаждается в достаточной степени.

17. Способ по п.13, где конечная концентрация калиевой соли в растворе составляет менее 300 мМ, предпочтительно 100 мМ.

18. Способ по п.1, где полисахарид получают из биологического источника.

19. Способ по п.1 и п.18, где полисахарид получают из грамотрицательной бактерии.

20. Способ по п.1 и п.18, где полисахарид представляет собой полимер остатков сиаловой кислоты.

21. Способ по п.п. 1 и 18-20, где полисахарид получают из *Neisseria meningitidis*.

22. Способ по п.п. 1 и 18-21, где полисахарид получают из *Neisseria meningitidis* серотипа В, *Neisseria meningitidis* серотипа С, *Neisseria meningitidis* серотипа W, *Neisseria meningitidis* серотипа Y.

23. Способ по п.2, где катионный детергент (а) представляет собой соль цетилтриметиламмония, соль тетрабутиламмония, соль миристилтриметиламмония и гексадиметринбромид; или комбинацию двух или более из них.

24. Способ по п.23, где катионный детергент (а) представляет собой цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ).

25. Способ по п.24, где концентрация катионного детергента(в) составляет менее 3%, предпочтительно 1%.

26. Способ по п.1 и п.2, где спирт представляет собой гидрофильный спирт.

27. Способ по п.26, где гидрофильный спирт представляет собой метанол, этанол, н-пропиловый спирт, изопропиловый спирт, ацетон и трет-бутиловый спирт; или комбинацию двух или более из них; и его концентрация составляет <65% или >95%.

28. Способ по п.1 и п.2, где спирт представляет собой этанол.

29. Способ по п.1, где концентрирование и диафильтрацию полисахарида осуществляют путем тангенциальной поточной фильтрации с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 100 кДа.

30. Способ по п.2, где соль, используемая для осаждения, представляет собой хлорид натрия, хлорид аммония, хлорид калия или комбинацию двух или более из них.

31. Способ по п.2 и п.30, где соль, используемая для осаждения, представляет собой хлорид натрия.

32. Способ по п.п. 2 и 30-31, где концентрация соли находится в диапазоне от 0,25 до 2М.

33. Способ выделения полисахарида, включающий в себя следующие этапы:

- а) смешивание раствора неочищенного полисахарида с анионным детергентом;
 - б) добавление к раствору ЭДТА и ацетата натрия;
 - с) спиртовое осаждение раствора с последующим центрифугированием и удержанием супернатанта;
 - д) удаление детергента, присутствующего в супернатанте;
 - е) концентрирование и диафильтрация бактериального полисахарида;
- где полученный очищенный полисахарид имеет степень извлечения 60-80%; оптимальный профиль О-ацетилирования и минимальное содержание примесей, состоящих из эндотоксинов, белков и нуклеиновых кислот.

34. Способ по п.33, где способ дополнительно включает в себя следующие этапы:

- а) смешивание раствора бактериального полисахарида с катионным детергентом;
- б) центрифугирование раствора и сбор осадка;

с) растворение осадка в спирте с последующим осаждением полисахаридов с использованием соли.

35. Способ по п.33, где детергент представляет собой анионный детергент.

36. Анионный детергент по п.35, где анионный детергент представляет собой одно из следующих детергентов: алкилсульфаты, додецилсульфат натрия, дезоксихолат натрия, додецилсульфонат натрия, s-алкилсульфаты натрия, жирный спирт полиоксиэтиленовый эфир сульфат натрия, олеилсульфат натрия, N-олеилполи(аминокислота) натрия, алкилбензолсульфонаты натрия, альфа-олефинсульфонаты натрия, алкилсульфонаты натрия, сложные эфиры альфа-сульфомонокислот, сложные эфиры сульфоалкиловых жирных кислот, сукцинатный сульфат, алкилнафталинсульфонаты, алкансульфонаты натрия, лигнинсульфонат натрия, сульфонаты натрия алкилглицеридовых эфиров и другой анионный детергент, или комбинация двух или более из них.

37. Способ по п.35, где анионный детергент представляет собой додецилсульфат натрия (ДСН).

38. Способ по п.35, где конечная концентрация додецилсульфата натрия (ДСН) находится в диапазоне от 0,1 до 4,0%, предпочтительно менее 1%.

39. Способ по п.33, где удаление детергента осуществляют с использованием, по меньшей мере, одной или нескольких из следующих операций: обработка калиевой солью, гель-фильтрация, обработка этанолом и использование ионообменных смол/амберлитовых колонок.

40. Способ по п.33, где удаление детергента осуществляют путем осаждения детергента с использованием калиевой соли.

41. Способ по п.33, где конечная концентрация калиевой соли в растворе выше или равна концентрации, при которой анионный детергент осаждается в достаточной степени.

42. Способ по п.40, где калиевая соль представляет собой хлорид калия, ацетат калия, сульфат калия, карбонат калия, бикарбонат калия, фосфат калия, гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия, нитрат калия и другие соли калия или комбинацию двух или более из них.

43. Способ по п.34, где катионный детергент (а) представляет собой соль цетилтриметиламмония, соль тетрабутиламмония, соль миристилтриметиламмония и гексадиметринбромид; или комбинацию двух или более из них.

44. Способ по п.42, где катионный детергент (а) представляет собой цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ).

45. Способ по п.35, где конечная концентрация детергента находится в диапазоне от 0,5 до 3,0%, предпочтительно менее 1%.

46. Способ по любому из предыдущих пунктов, где полисахарид получают из группы, включающей в себя *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus* группы A, *Streptococcus* группы B Ia, Ib, II, III, V, VI или VIII; *Streptococcus* группы C, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium* spp., *Clostridium difficile*, *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema* spp., *Borrelia* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira* spp., *Hemophilus ducreyi*, *Corynebacterium diphtheria*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Ehrlichia* spp. и *Rickettsia* spp. Полисахариды *Streptococcus pneumoniae* типа 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9A, 9F, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 17F, 18C, 19F 19A, 20, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 38 и 45; Полисахариды *Neisseria meningitidis* серогруппы A, B, C, D, W135, X, Y, Z, 29E; и *H. influenzae* типа b.

47. Способ по любому из предыдущих пунктов, где полисахарид получают из биологического источника.

48. Полисахарид, полученный способом по любому из предыдущих пунктов.

49. Полисахарид по любому из предыдущих пунктов представляет собой капсулярный полисахарид, субкапсулярный полисахарид или экзополисахарид.

50. Полисахарид по п.48 доводят до определенного размера химическими или механическими способами.

51. Вакцина, содержащая полисахаридный антиген, полученный способом по любому из предыдущих пунктов.

52. Полисахарид по любому из предыдущих пунктов, конъюгированный с белком-носителем, где белок-носитель представляет собой CRM197, пневмококковый поверхностный адгезин A (PsaA), дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (TT), фрагмент C столбнячного анатоксина, коклюшный анатоксин, белка D *H. influenzae*, LT *E.coli*, ST *E.coli*, экзотоксин A из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс белков наружной мембраны с (OMP), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок A (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин A (PsaA), пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3,

BVH-11, защитный антиген (РА) *Bacillus anthracis*, детоксифицированный фактор вызывающий отек (ЕF), летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин фисуреллы (KLH), человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин (БСА), очищенное белковое производное туберкулина (PPD); в частности CRM197, столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин и/или PsaA.

53. Полисахарид по любому из предыдущих пунктов, конъюгированный с белком-носителем с использованием восстановительного аминирования, цианилирования, конъюгирования с карбодиимидом.

54. Иммуногенная композиция, полученная по любому из предыдущих пунктов, где указанный конъюгат содержит капсулярный полисахарид *Neisseria meningitidis* (N. meningitidis), выбранный из серогруппы A, B, C, D, X, Y, Z, 29E и W-135.

55. Иммуногенная композиция, содержащая, по меньшей мере, один из компонентов:

а) конъюгат (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы A и (ii) столбнячного анатоксина;

б) конъюгат (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы C и (ii) CRM197;

с) конъюгат (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы Y и (ii) CRM197;

д) конъюгат (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы W135 и (ii) CRM197; и

е) конъюгат (i) капсулярного сахара *Neisseria meningitidis* серогруппы X и (ii) столбнячного анатоксина.

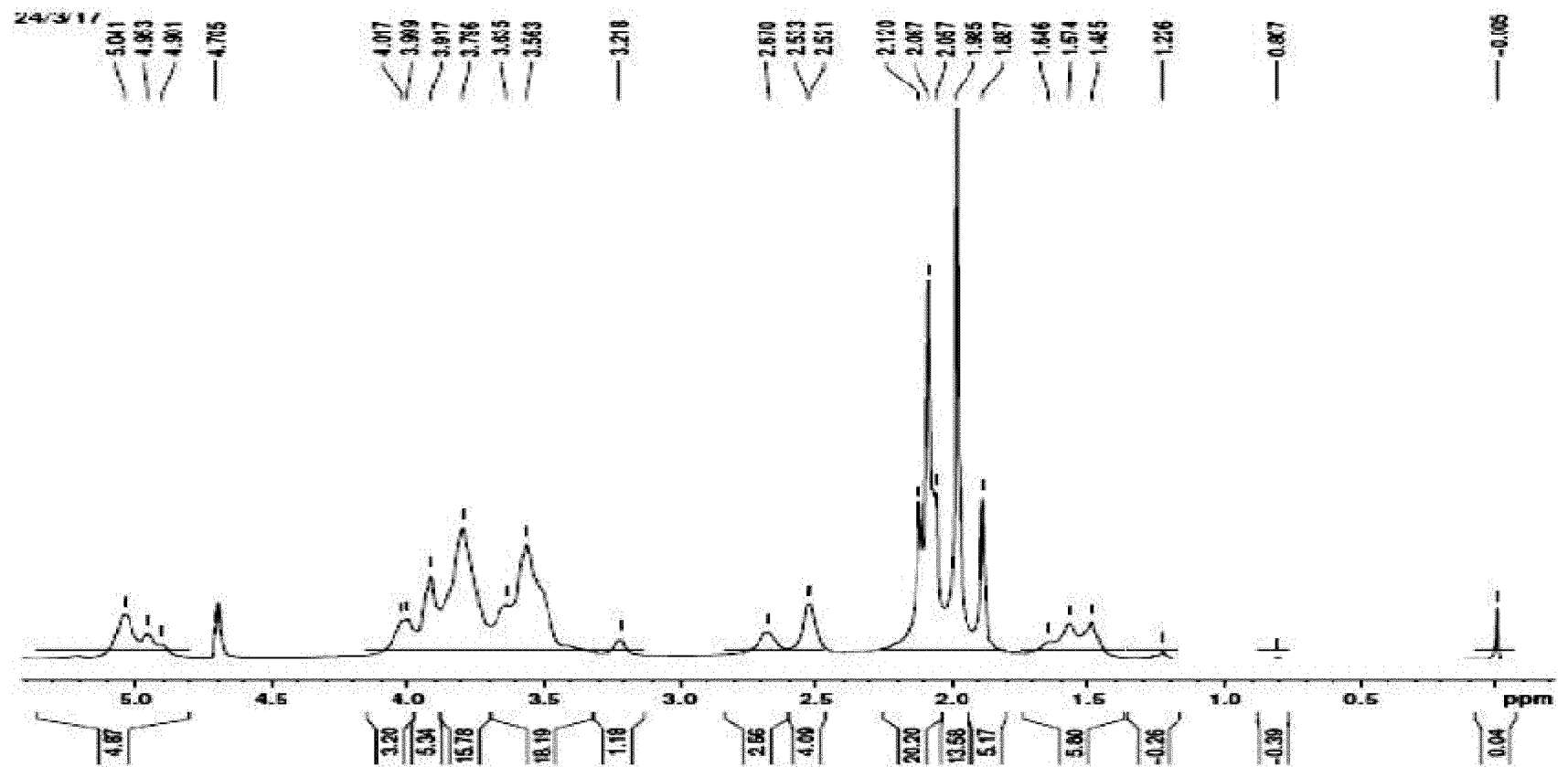
56. Иммуногенная композиция по п.п. 54-55, где указанная композиция содержит:

а) по меньшей мере, один полисахарид-белковый конъюгат;

б) сахарозу в концентрации приблизительно 3% мас./об. ; и

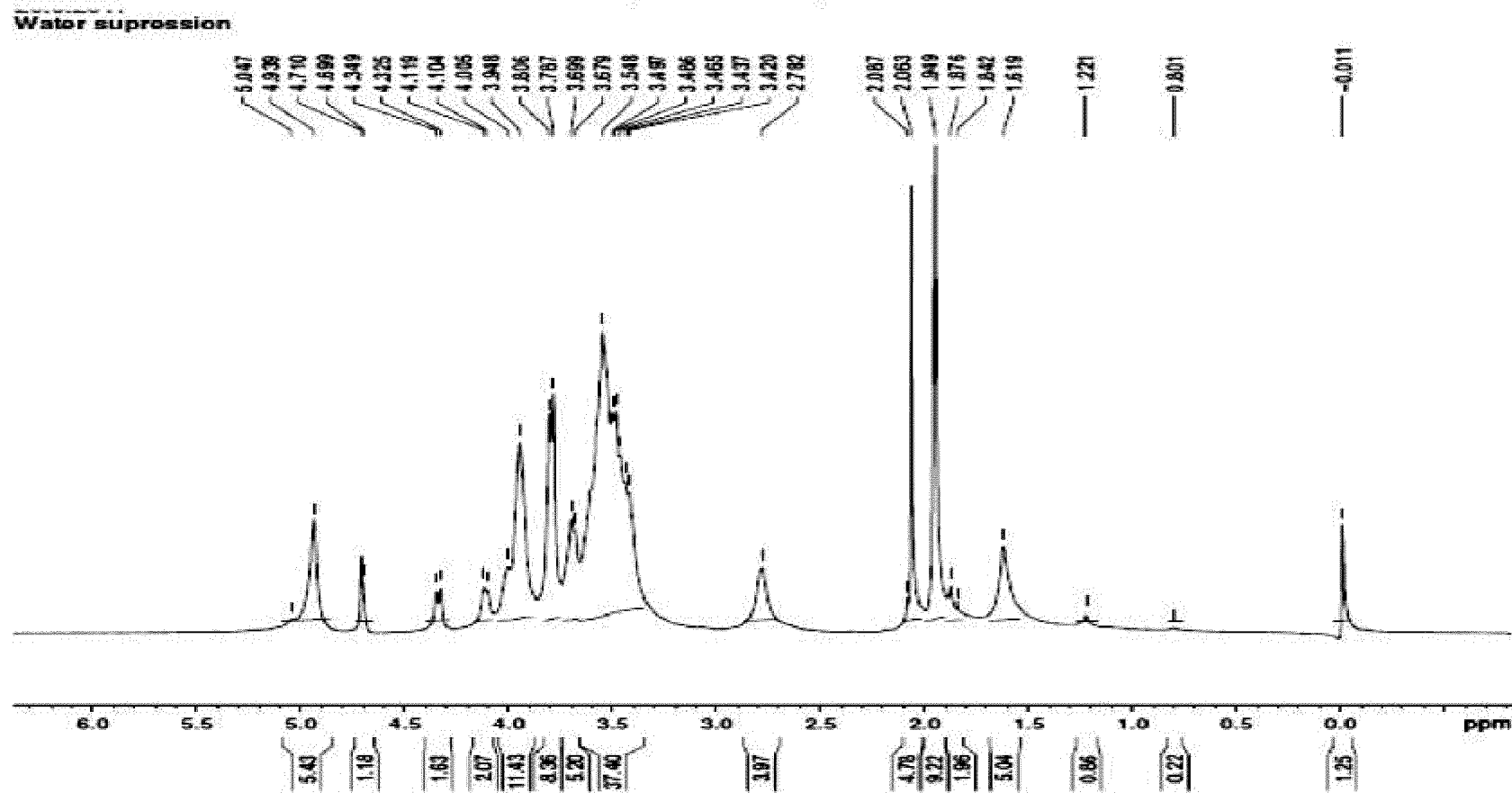
с) цитрат натрия в концентрации приблизительно 0,5% мас./об., где полисахарид очищен способом по любому из предыдущих пунктов.

ЯМР-спектры полисахарида Мен-С



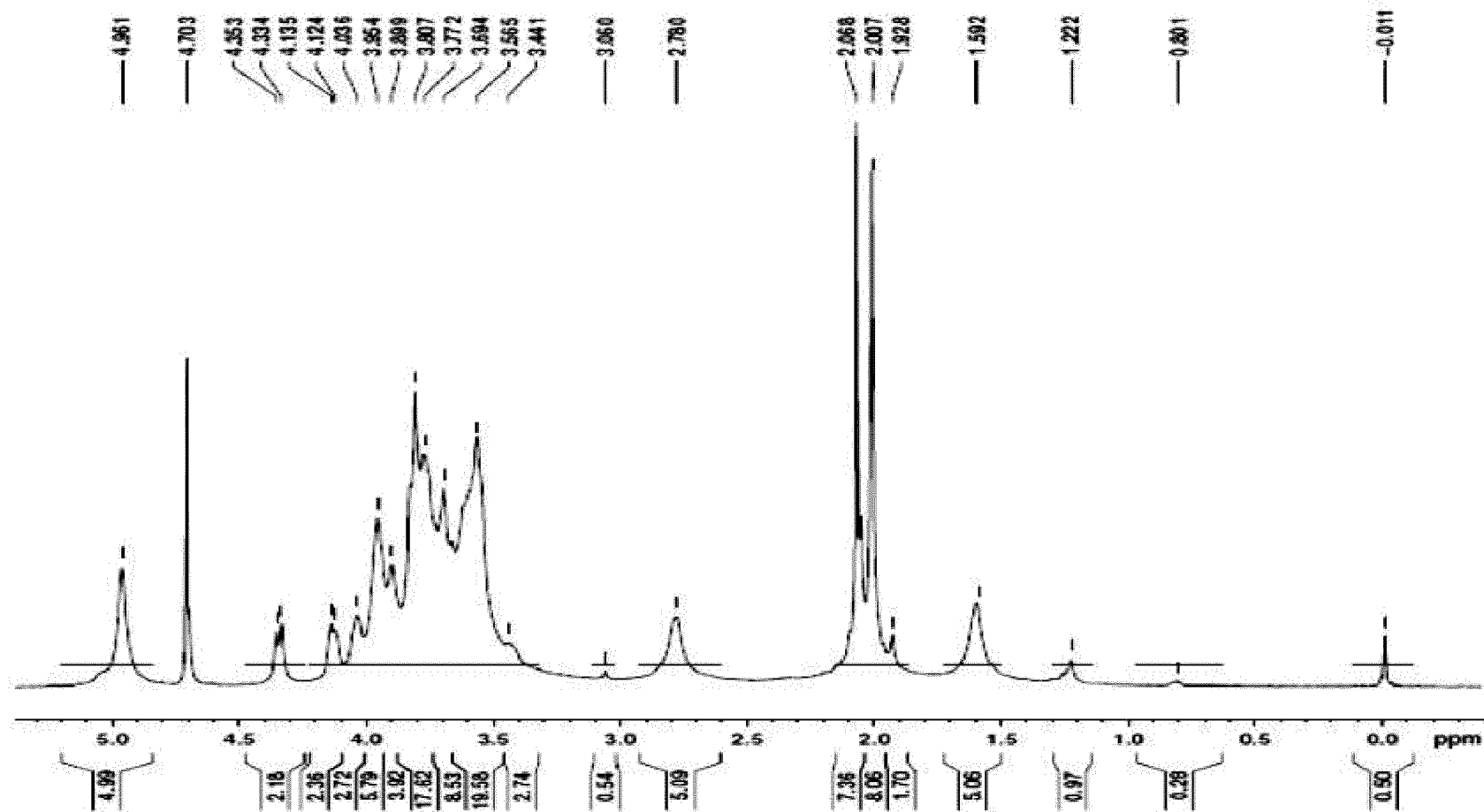
Фиг. 1

ЯМР-спектры полисахарида Men-Y



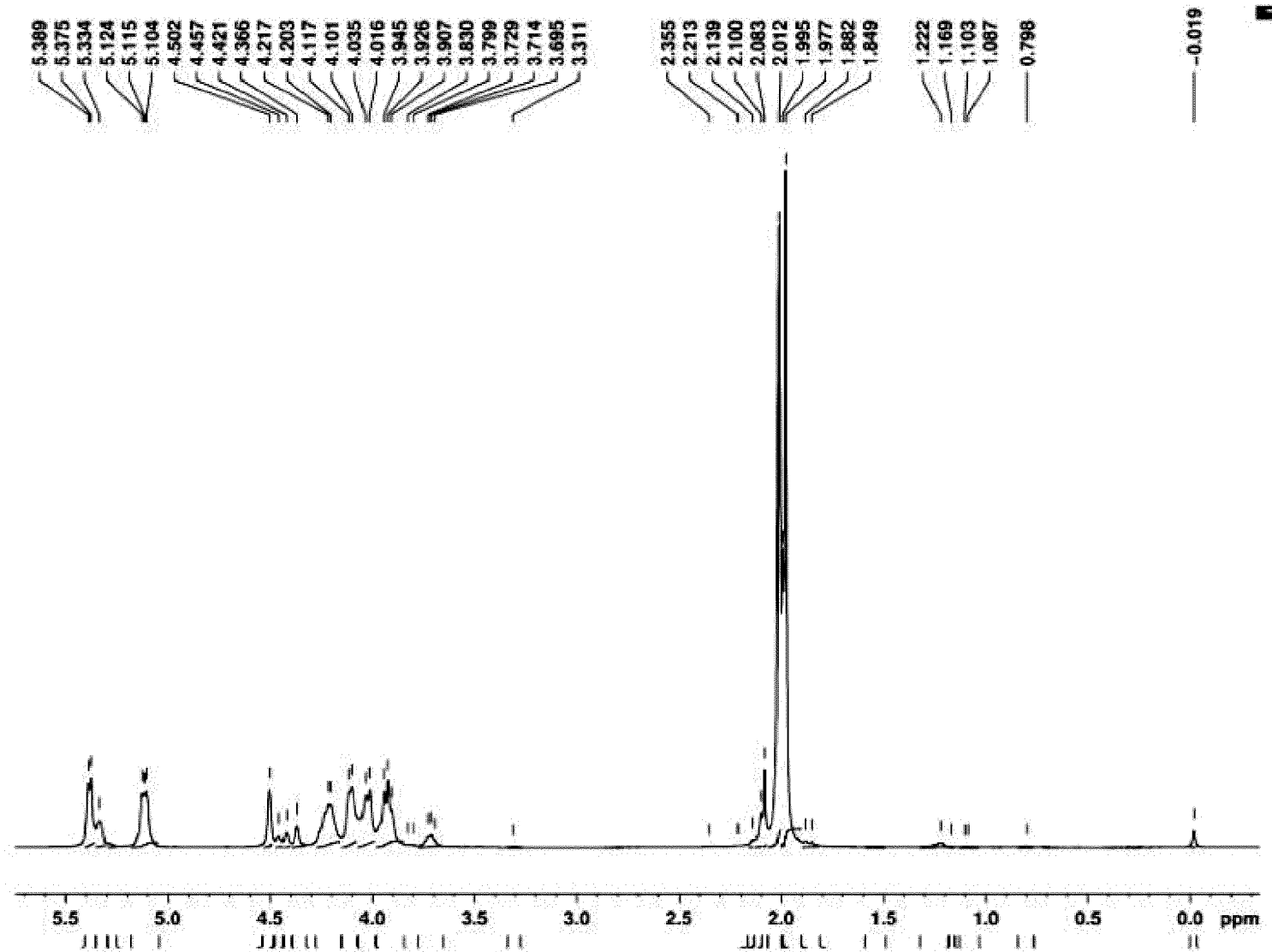
Фиг. 2

ЯМР-спектры полисахарида Men-W



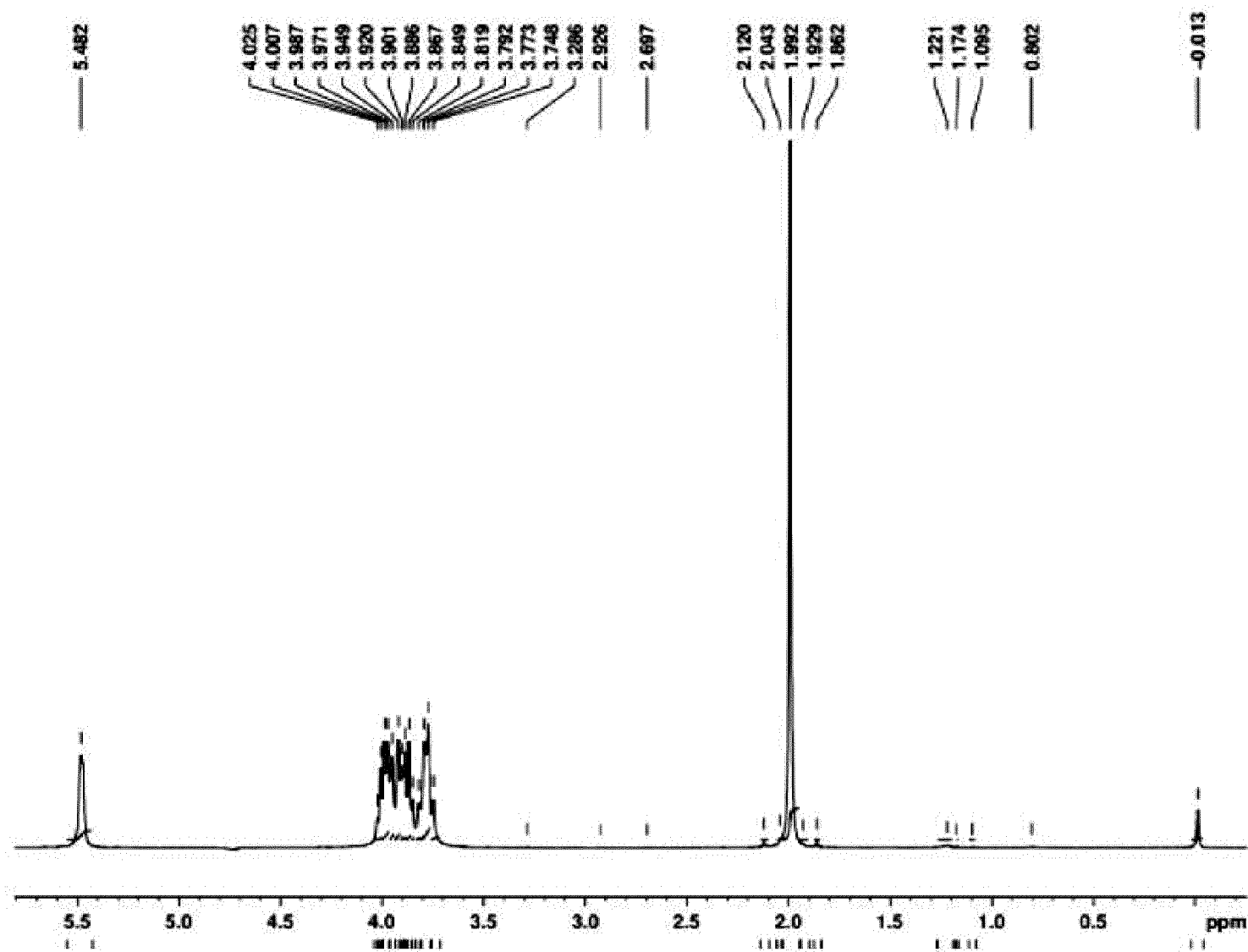
Фиг. 3

ЯМР-спектры полисахарида Мен-А



Фиг. 4

ЯМР-спектры полисахарида Мен-Х



Фиг. 5