

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040180**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.04.27**

**(21)** Номер заявки  
**201792366**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.04.25**

**(51)** Int. Cl. **C08B 37/00** (2006.01)  
**A61K 39/09** (2006.01)  
**C12P 19/04** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКА И ПРОЧИХ ПРИМЕСЕЙ И КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ МИКРООРГАНИЗМОВ**

---

**(31)** 2161/CHE/2015

**(32)** 2015.04.28

**(33)** IN

**(43)** 2018.03.30

**(86)** PCT/IN2016/000107

**(87)** WO 2016/174683 2016.11.03

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БАЙОЛОДЖИКАЛ И ЛИМИТЕД (IN)**

**(72)** Изобретатель:  
**Матур Рамеш Венкат, Кандималла  
Вивек Бабу, Мантена Нарендер Дев,  
Датла Махима, Редди Мутхиала  
Венкатесвара, Кхаран Кантан (IN)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WO-A2-2008035372  
WO-A1-9939739

N. SUAREZ ET AL.: "Production of Capsular Polysaccharide of Streptococcus pneumoniae Type 14 and Its Purification by Affinity Chromatography", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 67, no. 2, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 969-971, XP055297396, US ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.67.2.969-971.2001, the whole document

Craig A. Laferriere ET AL.: "Streptococcus pneumoniae Type 14 Polysaccharide-Conjugate Vaccines: Length Stabilization of Opsonophagocytic Conformational Polysaccharide Epitopes", Infection and Immunity, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 2441-2446, XP055262003, UNITED STATES, Retrieved from the Internet: URL: <http://iai.asm.org/content/66/6/2441.full.pdf> [retrieved on 2016-04-01], the whole document

---

**(57)** Изобретение относится к способу отделения белка и прочих примесей от капсульных полисахаридов микроорганизмов. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделению капсульных полисахаридов микроорганизмов в чистой форме после удаления белка и прочих примесей.

---

**040180**

**B1**

**040180**  
**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу отделения белка и прочих примесей от капсульных полисахаридов микроорганизмов. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделению капсульных полисахаридов микроорганизмов в чистой форме после удаления белка и прочих примесей.

### Уровень техники

Вакцины имитируют определенные заболевания, таким образом, заставляя организм запускать механизм защиты для индукции иммунного ответа, который обеспечивает борьбу организма с патогеном. Процесс производства вакцин в частности является чрезвычайно важным на каждой стадии в отношении определения их безопасности для применения у людей. Полисахариды представляют собой углеводы, которые используют во многих вариантах промышленных применений, например, в загустителях, гелеобразующих средствах, эмульгаторах и системах доставки многих коммерческих препаратов. Капсульные полисахариды, которые присутствуют на клетках микроорганизмов, также можно использовать в качестве компонента для иммунизации. При иммунизации при помощи очищенных капсульных полисахаридов в составленной композиции они предотвращают развитие заболеваний, вызываемых такими микроорганизмами как *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* тип b и *Salmonella typhi* путем индуцирования соответствующего иммунного ответа.

Конъюгированные вакцины запускают развитие усиленных иммуногенных ответов, включая такие у детей и людей с ослабленным иммунитетом, а также в популяции людей старшего возраста. Полисахарид, конъюгированный с такими белками, как CRM<sub>197</sub>, столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин, прочие поверхностные белки, является хорошо зарекомендовавшим себя и высоко иммуногенным. Пневмовакс 23 (*Pneumovax 23*) представляет собой комбинацию неконъюгированного полисахарида, полученного от различных серотипов пневмококков, Превенар 13 (*Prenvar 13*) в свою очередь представляет собой тринадцативалентный конъюгированный полисахарид 13 серотипов пневмококка. Конъюгаты белков и полисахаридов эффективно применяют в качестве профилактических средств для лечения менингита, бактериемии, пневмонии, эпиглоттита и т.д.

Все подобные иммуногенные препараты или вакцины, апробированные для применения в отношении человека, требуют использования высокоочищенных форм полисахаридов. Капсульные полисахариды присутствуют на наружной поверхности бактериальной клетки. В процессе отделения полисахаридов от клетки имеет место высвобождение таких клеточных компонентов, как нуклеиновая кислота, белки, клеточная стенка и т.д. Процесс выделения/очистки полисахарида включает множество стадий, варьирующих от стадии хроматографии, фильтрации, обработки детергентами, растворителями, энзимами для гидролиза нуклеиновой кислоты, белка, полисахарида и т.д.

При приготовлении мультивалентных конъюгированных пневмококковых вакцин, действие которых направлено на предотвращение развития инвазивных заболеваний, вызываемых микроорганизмом *Streptococcus pneumoniae*, некоторые серотипы *Streptococcus pneumoniae* выращивают в оптимизированной по составу питательной среде для получения требуемых полисахаридов, необходимых для производства вакцины. Клетки выращивают в крупных ферментерах, при этом в конце ферментации индуцируется лизис путем добавления дезоксихолата натрия (DOC) или альтернативного лизирующего средства. Лизатный бульон далее собирают для последующей очистки и извлечения капсульных полисахаридов, которые окружают бактериальные клетки. Несмотря на то, что клеточный лизат, производимый при помощи данного процесса, содержит целевые полисахариды, также он содержит большое количество клеточного детрита, включая белок, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и прочие примеси.

В следующих ссылках раскрыты различные способы отделения белка и прочих примесей от капсульных полисахаридов.

В заявке IPC OM000237738D (2014) раскрыта очистка пневмококковых полисахаридных антигенов, в которой на хроматографической стадии используют Capto™ adhere, мультимодальный анионный обменник, который был разработан для замещения стандартной вредной стадии экстракции фенолов.

В заявке 1572/MUM/2010 раскрыт способ очистки для отделения белковых примесей от полисахаридных антигенов, который включает: а) получение сырого бактериального полисахарида из лизированного бульона; б) подвергание сырого полисахарида процессам концентрации и диафильтрации; в) обработку раствора, включающего полисахарид, нуклеазой; г) обработку обработанного нуклеазой раствора полисахарида смесью детергента и физиологического раствора; д) коррекцию pH между 6,1 и 6,3 и инкубирование смеси при температуре от 2 до 8°C в течение периода времени от 10 до 14 ч; е) подвергание полисахаридного раствора центрифугированию с последующей диафильтрацией; ж) проведение хроматографии раствора, где указанный процесс приводит к уменьшению содержания белка.

В заявке US 4242501 раскрыт способ получения очищенного капсульного полисахарида, который включает одно или два осаждения спиртом.

В заявке US 5714354 описан способ очистки пневмококкового полисахарида без применения спирта при помощи катионных детергентов.

В заявке US 5847112 раскрыт способ получения измельченных капсульных полисахаридов *Streptococcus pneumoniae* серотипа 6B, имеющих пониженную полидисперсность, который включает уменьшение размера сырого капсульного полисахарида серотипа 6B путем подвергания капсульного полисахарида

да обработке с измельчением, выбираемой из группы, состоящей из термической обработки, ультразвуковой обработки, химического гидролиза, обработки эндолитическими ферментами и физического измельчения.

В заявке WO 2006/082527 A2 раскрыт процесс очистки капсульного полисахарида *S. agalactiae*, при котором сахарид изначально обрабатывают водной смесью спирта и соли кальция, после чего подвергают осаждению при помощи катионного детергента.

В заявке WO 2008/045852 A2 описан процесс очистки пневмококкового полисахарида серотипа 3, при котором используют нагревание и процесс осаждения при низком pH.

В заявке WO 2012/127485 A1 раскрыт способ очистки пневмококковых полисахаридов без использования спирта и цетилтриметиламмония бромид (СТАВ), в котором применяют хроматографическое разделение C-Рs от полисахаридов (PnPs) на основании различий в их суммарных поверхностных зарядах.

Тем не менее, в перечисленных выше ссылках на известный уровень техники раскрыты хроматография, осаждение при низком pH, спиртовое осаждение, процессы без использования спирта и т.д. для удаления примесей, которые являются длительными и требуют нескольких стадий обработки. Некоторых из них демонстрируют минимальное уменьшение количества примесей с последующими трудностями в удалении растворимых белков для соответствия требованиям для очищенных полисахаридов и, таким образом, существует высокая нагрузка при удалении загрязняющего растворимого белка в частности для определенных серотипов. Фенол является токсичным, а методы хроматографии требуют больше технических составляющих и использования дорогостоящих смол, что делает процесс неэкономичным с финансовой точки зрения. Таким образом, существует потребность в разработке улучшенных способов удаления белковых примесей из сложных клеточных лизатов.

Авторы настоящего изобретения на протяжении предпринимаемых ими продолжительных попыток разработать простой, эффективный способ, масштаб которого можно было бы легко увеличить, обнаружили, что в случае, если раствор, содержащий полисахарид и прочие примеси, подвергают действию  $\text{SiO}_2$ , конечный раствор будет высокообогащенным полисахаридами при пониженном содержании белка и прочих примесей.

#### **Цель изобретения**

Целью настоящего изобретения является разработка улучшенного способа очистки полисахаридов при снижении содержания белка и прочих примесей, масштаб которого можно легко увеличить.

Другой целью настоящего изобретения является разработка улучшенного простого и эффективного способа очистки полисахарида.

#### **Сущность изобретения**

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу выделения полисахарида практически в чистой форме, который включает подвергание действию или контактирование раствора, включающего полисахарид, белок, нуклеиновую кислоту, компоненты клеточной стенки и прочие примеси, с  $\text{SiO}_2$  (диоксид кремния), а также выделение полисахарида из смеси белка, нуклеиновой кислоты, полисахарида клеточной стенки и прочих материалов, полученных из клетки.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1: Сравнительное содержание белковых примесей различных пневмококковых серотипов перед обработкой  $\text{SiO}_2$  и после обработки.

Фиг. 2: Результаты электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДНС-ПААГ, SDS-PAGE) для пневмококкового полисахарида серотипа 18С; снижение содержания белка перед обработкой  $\text{SiO}_2$  и после обработки.

Фиг. 3: Результаты электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДНС-ПААГ, SDS-PAGE) для пневмококкового полисахарида серотипа 23F; снижение содержания белка перед обработкой  $\text{SiO}_2$  и после обработки.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к способу выделения полисахарида, где источником полисахарида являются бактерии, дрожжевые грибы, нитчатые грибы, клетки водорослей или растений и т.п., который включает подвергание раствора, включающего полисахарид, воздействию  $\text{SiO}_2$  и в случае необходимости других средств. Конечный раствор после воздействия  $\text{SiO}_2$  и разделения остается обогащенным полисахаридом и содержит пониженное количество одной или более примесей, таких как белок, нуклеиновая кислота, полисахарид клеточной стенки и прочие материалы, полученные из клеток.

Полисахариды, полученные в соответствии с настоящим изобретением, находятся в практически чистой форме.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способам уменьшения содержания или удаления белковых примесей из комплексного клеточного лизата или фильтрата *Streptococcus pneumoniae*, включающего один или более серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F и 33F полисахаридов.

В варианте осуществления используемый  $\text{SiO}_2$  находится в различных формах/имеет различный размер частиц, например, находится в форме мелкодисперсных частиц в диапазоне от 0,01 до 200 мкм,

предпочтительно находится в диапазоне от 3 до 40 мкм. Количество используемого SiO<sub>2</sub> может варьироваться от 0,5 до 20% (мас./об.). Используемый SiO<sub>2</sub> может быть в случае необходимости приготовлен путем нагревания свыше 60°C и охлаждения по меньшей мере в течение одного часа перед использованием. Используемый SiO<sub>2</sub> может быть пирогеенизированным или депирогеенизированным.

В еще одном варианте осуществления прочие средства, используемые для процесса очистки полисахарида, можно выбирать из хлорида натрия, сульфата аммония и тому подобных, в концентрации по меньшей мере 0,1% (мас./об.), или органических растворителей, таких как спирты, в концентрации по меньшей мере 2% (об.%). Другое средство можно использовать для дополнительного уменьшения содержания примесей и обогащения раствора полисахаридом.

В другом варианте осуществления pH раствора можно поддерживать в диапазоне от кислотного до щелочного, предпочтительно от 3,0 до 9,0. pH можно корректировать, используя кислоты, такие как уксусная кислота, фосфорная, муравьиная кислота, соляная кислота и тому подобные, а также щелочи, такие как гидроксид натрия, калия или аммония и тому подобные.

В другом варианте осуществления контакт или воздействие SiO<sub>2</sub> на раствор, включающий полисахарид и прочие примеси, осуществляют при температуре в диапазоне от 15 до 60°C в течение периода времени от 10 мин до 16 ч.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение включает обработку полисахаридного раствора активированным углем для удаления цвета и прочих примесей. Данную обработку проводят перед воздействием SiO<sub>2</sub> или после воздействия SiO<sub>2</sub>.

Полисахариды, очищенные при помощи способов, описанных в настоящем изобретении, можно использовать для различных вариантов применения, например, в косметической, пищевой, фармацевтической и биофармацевтической промышленности.

В рамках изобретения, термин "практически чистая форма" относится к полисахаридному лизату или фильтрату, из которого было удалено по меньшей мере 30% белка по сравнению с концентрацией белка в лизате или фильтрате до воздействия SiO<sub>2</sub>. Способы количественного определения концентрации белка в клеточном лизате или фильтрате хорошо известны в области техники и включают, например, биохимические способы, такие как метод Брэдфорда, метод определения белка при помощи бицинхониновой кислоты (BCA), метод Лоури, методы анализа, такие как электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДНС-ПААГ), хроматография и электрофорез (см., например, Deutscher, M. P. (ed.), Guide to Protein Purification, San Diego: Academic Press, Inc. (1990)).

Изобретение также относится к способу очистки капсульного сахара от бактерий, где (a) выход способа составляет по меньшей мере 10% и (b) относительная чистота сахара составляет приблизительно 30%.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу выделения полисахарида в чистой форме, который включает:

- i) воздействие на раствор, включающий полисахарид, белок, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и прочие примеси, SiO<sub>2</sub>,
- ii) выделение полисахаридного раствора в чистой форме и
- iii) отделение частиц кремния от полисахарида при помощи фильтрации или при помощи центрифугирования.

Концентрация полисахарида, полученного способом согласно настоящему изобретению, может составлять от 0,1 до более 10 мг/мл.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу выделения полисахарида в чистой форме, который включает:

- i) получение полисахаридного раствора, включающего полисахарид, белок, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и прочие примеси,
- ii) обработку полисахаридного раствора детергентом для удаления нуклеиновой кислоты и прочих примесей,
- iii) получение суспензии SiO<sub>2</sub> в воде или буфере,
- iv) добавление суспензии SiO<sub>2</sub> к полисахаридному раствору, полученному на стадии (i), и
- v) выделение полисахаридного раствора в чистой форме.

Буферы, используемые в настоящем изобретении для выделения полисахарида, включают натрий-фосфатный буфер, калий-фосфатный буфер, Трис-буфер и т.д.

Белки имеют гидрофильные поверхности и гидрофобные карманы. При инкубировании полисахаридных составов с диоксидом кремния белковые примеси связываются с диоксидом кремния и отделяются от полисахарида при помощи гидрофильного или гидрофобного механизма, или при помощи механизма простой адсорбции.

Детергенты, используемые в настоящем изобретении, включают СТАВ (цетилтриметиламмония бромид), цетримония хлорид, бензетония хлорид и т.д.

Термины "подвергается воздействию" или "контактирует" означают инкубирование полисахаридного состава с другими компонентами для обработки, например, для удаления примесей с целью получе-

ния чистого полисахарида.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу выделения полисахарида в чистой форме, который включает:

- i) получение полисахаридного раствора, включающего пневмококковый капсульный полисахарид, белок, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и прочие примеси, где pH раствора поддерживается в диапазоне от 3,0 до 9,0,
- ii) в случае необходимости добавление другого реагента,
- iii) в случае необходимости обработку раствора активированным углем,
- iv) получение суспензии SiO<sub>2</sub> с частицами, размеры которых варьируются от 0,01 до 200 мкм, в воде или буфере,
- v) добавление суспензии SiO<sub>2</sub> к полисахаридному раствору, полученному на стадии (i), при температуре в диапазоне от 15 до 60°C в течение периода времени от 10 мин до 20 ч,
- vi) в случае необходимости обработку раствора активированным углем,
- vii) в случае необходимости добавление другого реагента и
- viii) выделение полисахаридного раствора в чистой форме.

Прочие реагенты можно выбирать из хлорида натрия, сульфата аммония, спирта и т.п., а также из смеси вышеперечисленных веществ.

Очищенный капсульный полисахарид по изобретению можно использовать в качестве иммуногена с дальнейшей модификацией или без нее с целью применения для иммунизации. С целью иммунизации предпочтительно конъюгировать сахарид с молекулой-носителем, такой как белок.

Предпочтительные белки-носители представляют собой бактериальные токсины или анатоксины, такие как дифтерийный анатоксин или столбнячный анатоксин или мутантный дифтерийный токсин CRM<sub>197</sub> и т.д.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, включающей капсульный полисахарид, полученный в соответствии с настоящим изобретением, в конъюгации с белком-носителем, выбираемым из дифтерийного анатоксина или столбнячного анатоксина или CRM<sub>197</sub>.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, включающей капсульные полисахариды от одного или более серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с белком-носителем CRM<sub>197</sub>.

Некоторые широко распространенные товарные наименования SiO<sub>2</sub> (диоксида кремния), имеющегося в продаже, которые представляют собой Aerosil®, Aeroperl®, можно использовать в настоящем изобретении.

Полисахаридный раствор, включающий полисахарид, белок, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и прочие примеси, можно изготавливать при помощи любых способов, известных в области техники.

Выделение капсульного полисахарида в чистой форме после воздействия или контактирования с SiO<sub>2</sub>, проводится при помощи стандартных способов.

Настоящее изобретение более конкретно иллюстрируется на основании примеров, приведенных далее. Тем не менее, следует понимать, что примеры не ограничивают настоящее изобретение каким-либо образом.

#### Пример 1.

В ферментативном бульоне *Streptococcus pneumoniae* клеточный лизис проводят путем добавления дезоксихолата (от 0,005 до 2%). После добавления дезоксихолата ферментативный бульон подвергают центрифугированию при 10000-15000 g и производят сбор надосадочной жидкости. pH надосадочной жидкости корректируют при помощи кислот, таких как ортофосфорная кислота, соляная кислота и т.д. до pH 4-6 и инкубируют в течение периода времени от 3 ч до ночи. pH некоторых серотипов снова корректируют до нейтральных значений и нагревают до 60°C в течение периода времени от 10 до 150 мин. После центрифугирования полисахарида при 10000-15000g осадок удаляют. Дополнительно очищают надосадочную жидкость путем пропускания ее через глубинный фильтр или фильтр от 0,22 до 0,45 мкм. Проводят концентрирование фильтрата в 4-15 раз на ультрафильтрационной мембране от 30 до 300 кДа. Буфер, в котором находится концентрат, заменяют 4-12 объемами фосфатного буфера. К концентрированному полисахариду с замененным буфером добавляют СТАВ, т.е. от 0,2 до 5%, инкубируют в течение периода времени от 2 ч до ночи при температуре от 4 до 40°C. Хлорид натрия добавляют к некоторым полисахаридам перед добавлением СТАВ в диапазоне от 0,05 до 2 моль.

После обработки СТАВ осадок разделяют при помощи процесса центрифугирования при 10000-15000g. Надосадочную жидкость пропускают через угольную колонку/фильтры. Активированный диоксид кремния добавляют к отфильтрованному через уголь полисахариду в диапазоне от 3 до 10% (мас./об.) и добавляют NaCl в количестве от 0,5 до 3 моль. Приготовление полисахарида включает воздействие на него диоксидом кремния в течение периода времени от 2 до 26 ч при температуре от 5 до

40°C. Диоксид кремния отделяют от полисахаридного раствора при помощи центрифугирования/тканевой фильтрации/мешочного фильтра. Фильтрат пропускают через глубинный фильтр, угольный фильтр и фильтр от 0,22 до 5 мкм. Отфильтрованный полисахарид концентрируют и подвергают диафильтрации на мембране от 10 до 500 кДа. Буфер, в котором находится концентрат полисахарида, заменяют на фосфатный буфер или воду для инъекции (WFI). Очищенный полисахаридный состав пропускают через 0,22 мкм фильтр и собираются в пакет ПВД (полиэтилен высокого давления) под LAFU. Очищенный полисахарид хранят при температуре > - 20°C.

Таблица 1. Удаление белка различных пневмококковых полисахаридов

Серотип	Серотип 1		Серотип 6А		Серотип 7F		Серотип 19А	
	Пневмококка		Пневмококка		Пневмококка		Пневмококка	
	До обработ	После обработ						
	ки	ки	ки	ки	ки	ки	ки	ки
Полисахарид (мг/мл)	1,9	1,77	2,82	2,62	3,6	2,72	2,67	2,5
Белок (мг/мл)	0,34	BDL	0,26	BDL	0,26	0,05	0,59	BDL
Белок % (на мг)	17,89	BDL	9,22	BDL	7,22	1,84	22,10	BDL

BDL: ниже предела обнаружения

Данный вариант осуществления описывает влияние депирогенизации на удаление примесей из полисахаридного состава. Как отображено в табл. 2, белковые примеси удаляются как депирогенизированным, так и пирогеенизированным SiO<sub>2</sub>. Таким образом, для удаления примесей можно использовать как депирогенизированный, так и пирогеенизированный SiO<sub>2</sub>.

Таблица 2. Влияние депирогенизации аероерл® на удаление белка из различных пневмококковых полисахаридов

Серотип 6В Пневмококка	Описание	До обработки	После обработки
Пирогеенизированный SiO <sub>2</sub>	Белок (мг/мл)	0,21	BDL
	Белок % (на мг PS)	9,86	BDL
	Полисахарид (мг/мл)	2,13	1,27
Депирогенизированный SiO <sub>2</sub>	Белок (мг/мл)	0,23	BDL
	Белок % (на мг PS)	8,07	BDL
	Полисахарид (мг/мл)	2,85	1,5

BDL: ниже предела обнаружения

Условия: Аероерл® 5% (мас./об.), NaCl 1 моль, инкубирование при комнатной температуре в течение 1 ч.

Можно использовать Aerosil® концентрацией в диапазоне от 0,1 до 10% или более высоких концентраций. Белок полностью удаляется путем обработки SiO<sub>2</sub> в течение периода времени от 1 до более 17 ч. Удаление примесей можно улучшить путем добавления NaCl к суспензии SiO<sub>2</sub>.

Таблица 3. Влияние концентрации Aerosil® на удаление белка полисахарида пневмококка серотипа 6В.

No п/п	Параметр	Перед обработкой	После обработки	После обработки	После обработки	После обработки
		Aerosil	2% Aerosil	3% Aerosil	4% Aerosil	5% Aerosil
1	Белок (мг/мл)	0,23	BDL	BDL	BDL	BDL
2	Белок % (на мг PS)	8,07	BDL	BDL	BDL	BDL
3	PS (мг/мл)	2,85	1,1	1,05	0,96	0,89

BDL: ниже предела обнаружения

Условия: NaCl 1 моль; инкубирование при комнатной температуре в течение 1 ч.

Данный вариант осуществления также подтверждает, что депирогенизированный аероерл® может эффективно удалять белок в присутствии NaCl в диапазоне от 0,1 до 2,5 моль или выше. Можно исполь-

зывать частицы SiO<sub>2</sub> в диапазоне размеров от 0,1 мкм до сотен микрон.

Таблица 4. Влияние концентрации аэрогеля на удаление белка полисахарида пневмококка, серотип 6В

№ п/п	Параметр	Перед	После	После	После	После
		обработкой Aerosil	обработки 2% Aerosil	обработки 3% Aerosil	обработки 4% Aerosil	обработки 5% Aerosil
1	Белок (мг/мл)	0,23	BDL	BDL	BDL	BDL
2	Белок % (на мг PS)	8,07	BDL	BDL	BDL	BDL
3	PS (мг/мл)	2,85	1,68	1,62	1,52	1,49

BDL: ниже предела обнаружения

Условие: NaCl 1 моль, инкубирование при комнатной температуре в течение 1 ч.

Ферментативный бульон содержит определенное количество загрязняющих веществ. Эти загрязняющие вещества можно удалить при помощи ряда действий, таких как центрифугирование, осаждение, хроматография и т.д.

Настоящее изобретение осуществляется в небольших масштабах (50-100 мл) и полупромышленных масштабах (15 л). В случае обоих объемов полисахарида загрязняющие вещества эффективно удаляются различными формами SiO<sub>2</sub> (табл. 5 и фиг. 1). Обработку SiO<sub>2</sub> можно проводить на различных стадиях очистки полисахарида. Далее частицы SiO<sub>2</sub> можно отделять при помощи простого центрифугирования или фильтрации или при помощи любого другого метода, такого как физическое осаждение, осаждение давлением и т.д.

Таблица 5. Уменьшение содержания белковых примесей при помощи применения аэрогеля в полисахаридах пневмококка

Серотип	Серотип 1 Пневмококка		Серотип 6В Пневмококка	
	Перед обработкой Aerosil	После обработки Aerosil	Перед обработкой Aerosil	После обработки Aerosil
Белок (мг/мл)	0,21	BDL	0,23	BDL
Белок % (на мг PS)	9,86	BDL	8,07	BDL
PS (мг/мл)	2,13	1,88	2,85	1,52

BDL: ниже предела обнаружения

Условия: Аэрогель: 5% (мас./об.), NaCl 1 моль, инкубирование при комнатной температуре в течение 1 ч

Таблица 6А. Удаление белковых примесей капсульного полисахарида различных серотипов Пневмококка

Серотип	Серотип 6А Пневмококка		Серотип 7F Пневмококка		Серотип 9V Пневмококка		Серотип 14 Пневмококка	
	Перед	После	Перед	После	Перед	После	Перед	После
Белок (мг/мл)	0,88	0,14	1,15	0,21	0,86	0,07	0,67	0,01
Белок % (на мг PS)	9,64	1,72	12,43	2,69	9,83	0,86	12,91	0,30
Полисахарид (мг/мл)	9,13	8,15	9,25	7,81	8,75	8,11	5,19	3,38

Перед: Перед обработкой аэрогелем;

После: После обработки аэрогелем

Условие: Аэрогель 5% (мас./об.), NaCl 1 моль, инкубирование при комнатной температуре в течение 1 ч.

Таблица 6В. Удаление белковых примесей капсульного полисахарида различных серотипов Пневмококка

Серотип	Серотип 18С Пневмококка		Серотип 19А Пневмококка		Серотип 19F Пневмококка		Серотип 23F Пневмококка	
	Перед	После	Перед	После	Перед	После	Перед	После
Белок (мг/мл)	0,89	BDL	0,48	0,1	0,67	0,11	0,1	BDL
Белок % (на мг PS)	17,66	BDL	5,63	1,46	10,11	1,81	3,30	BDL
Полисахарид (мг/мл)	5,04	4,48	8,52	6,85	6,63	6,09	3,03	2,51

BDL: ниже предела обнаружения

Перед: Перед обработкой aeroperl;

После: После обработки aeroperl

ND: Не обнаружено

Условие: Aeroperl 5% (мас./об.) / NaCl 1 моль, инкубирование при комнатной температуре в течение 1 ч.

Предел загрязняющих веществ был установлен для очищенного полисахарида каждого серотипа с целью уменьшения риска развития нежелательных явлений, связанных с введением вакцины. Одним из загрязняющих веществ является полисахарид клеточной стенки (CWPS). Настоящее изобретение взяло на себя заботу о CWPS. CWPS удаляется при комнатной температуре при помощи простого смешивания с последующим разделением SiO<sub>2</sub> и полисахаридного образца. Время контакта полисахаридного образца с SiO<sub>2</sub> может варьироваться от 10 мин до более 18 ч (табл. 7).

Таблица 7. Удаление полисахарида клеточной стенки (CWPS) от полисахаридов пневмококка различных серотипов

Серотип	Серотип 19А Пневмококка		Серотип 19F Пневмококка	
	Перед обработкой Aerosil	После обработки Aerosil	Перед обработкой Aerosil	После обработки Aerosil
CWPS (мг/мл)	0,484	0,031	0,108	0,038
CWPS % (на мг PS)	12,94	1,40	3,45	1,65
Полисахарид (мг/мл)	3,74	2,22	3,13	2,3

Условия: Aerosil 5% (мас./об.), NaCl 1 моль;

инкубирование при комнатной температуре в течение 1 ч.

Удаление белковых примесей можно визуализировать при помощи ДНС-ПААГ. Содержание белковых примесей полисахарида пневмококка серотипов 18С и 23F было снижено до предела спецификации. Как отображено на фиг. 2 и 3, полное удаление белка можно наблюдать на линии 2 и 3. Результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8. Концентрация белка перед и после обработки aeroperl® (фиг. 2 и 3)

Серотипы Пневмококковог о полисахарида	Перед обработкой aeroperl®			После обработки aeroperl®		
	PS мг/мл	Белок мг/мл	Белок %/мг PS	PS, мг/мл	Белок мг/мл	Белок %/мг PS
23F	3,03	0,1	3,30	2,4	BDL	BDL
18С	4,49	0,33	7,35	4,79	0,02	0,42

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки капсульного полисахарида в практически чистой форме из бактерий, выбранных из *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* типа b и *Salmonella typhi*, который включает:

- i) получение раствора лизированных бактериальных клеток;
- ii) сбор супернатанта, содержащего капсульный полисахарид, белок, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и прочие примеси, полученного после центрифугирования раствора лизирован-

ных клеток;

iii) получение суспензии  $\text{SiO}_2$  в воде или буфере;

iv) добавление суспензии  $\text{SiO}_2$  к супернатанту, полученному со стадии (ii) с получением раствора полисахарид- $\text{SiO}_2$ ; и

v) выделение капсульного полисахарида из раствора полисахарид- $\text{SiO}_2$  в чистой форме.

2. Способ очистки по п.1, в котором лизис клеток осуществляют путем добавления дезоксихолата в концентрации, составляющей от 0,005 до 2%.

3. Способ очистки по п.1, где размер частиц  $\text{SiO}_2$  составляет от 0,01 до 200 мкм, предпочтительно составляет от 3 до 40 мкм.

4. Способ очистки по п.1, где количество  $\text{SiO}_2$  варьирует от 0,5 до 20% (мас./об.).

5. Способ очистки по п.1, где лизат или фильтрат *Streptococcus pneumoniae* включает один или более серотипов, выбранных из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F и 33F.

6. Способ очистки по п.1, где подвергание действию или контактирование раствора, включающего полисахарид и прочие примеси, с  $\text{SiO}_2$  проводят при температуре, варьирующей от 15 до 60°C в течение периода времени от 10 мин до 16 ч.

7. Иммуногенная композиция для предотвращения заболевания, опосредованного *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* типа b и *Salmonella typhi*, включающая конъюгат капсульного полисахарида, полученного по п.1, с белком-носителем, выбранным из дифтерийного анатоксина или столбнячного анатоксина или CRM<sub>197</sub>.

8. Способ очистки пневмококкового капсульного полисахарида в чистой форме, который включает стадии:

i) получение раствора лизированных пневмококковых клеток;

ii) сбор супернатанта, включающего пневмококковый капсульный полисахарид, белок, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и прочие примеси, полученного после центрифугирования раствора лизированных клеток, где pH раствора поддерживается в диапазоне от 3,0 до 9,0;

iii) в случае необходимости добавление другого реагента;

iv) в случае необходимости обработка раствора активированным углем;

v) получение суспензии  $\text{SiO}_2$  с частицами, размеры которых варьируют от 0,01 до 200 мкм, в воде или буфере;

vi) добавление суспензии  $\text{SiO}_2$  к раствору, полученному на стадии (ii), при температуре в диапазоне от 15 до 60°C в течение периода времени от 10 мин до 20 ч с получением раствора полисахарид- $\text{SiO}_2$ ;

vii) в случае необходимости обработка раствора активированным углем;

viii) в случае необходимости добавление другого реагента и

ix) выделение полисахаридного раствора в чистой форме,

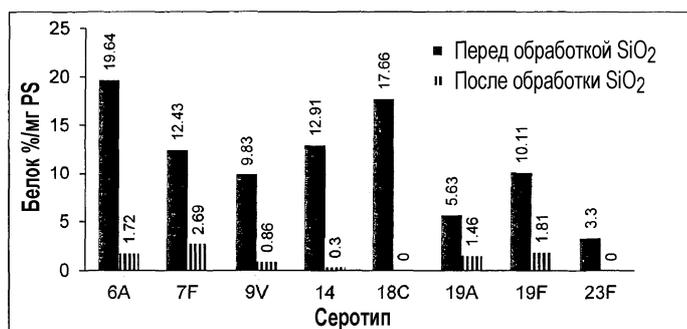
причем другой реагент выбирают из хлорида натрия, сульфата аммония и спирта.

9. Способ очистки по п.8, где лизат или фильтрат *Streptococcus pneumoniae* включает один или более серотипов, выбранных из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F и 33F.

10. Способ очистки по п.8, в котором лизис клеток осуществляют путем добавления дезоксихолата в концентрации, составляющей от 0,005 до 2%.

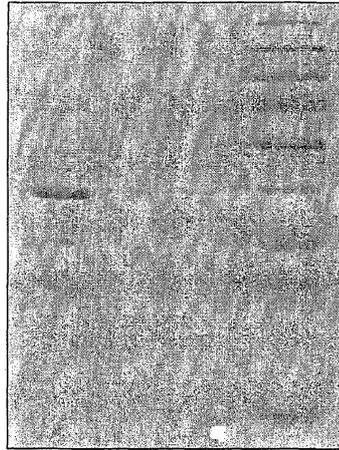
11. Способ очистки по п.8, где контактирование или воздействие на раствор, включающий полисахарид и прочие примеси,  $\text{SiO}_2$  проводят при температуре в диапазоне от 15 до 60°C в течение периода времени от 10 мин до 16 ч.

12. Иммуногенная композиция для предотвращения заболеваний, опосредованных *Streptococcus pneumoniae*, включающая конъюгат капсульного полисахарида, полученного по п.8, с белком-носителем, выбранным из дифтерийного анатоксина или столбнячного анатоксина или CRM<sub>197</sub>.



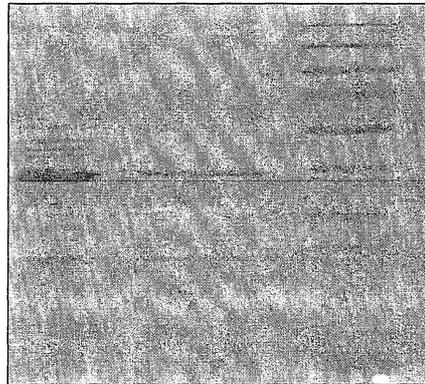
Фиг. 1

1 2 3



Фиг. 2

1 2 3



Фиг. 3

