

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101155833 B

(45) 授权公告日 2011. 04. 20

(21) 申请号 200680011379. X

A61K 39/09 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 03. 31

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/669, 546 2005. 04. 08 US

EP 0024493 A, 1981. 03. 11, 全文.

EP 0072513 A, 1983. 02. 23, 全文.

EP 0002404 A, 1979. 06. 13, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 10. 08

WO 8201995 A, 1982. 06. 24, 全文.

CN 1429276 A, 2003. 07. 09, 全文.

CN 1318103 A, 2001. 10. 17, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/012134 2006. 03. 31

审查员 褚战星

(87) PCT申请的公布数据

W02006/110352 EN 2006. 10. 19

(73) 专利权人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 布赖恩·巴勒尔 李初顺

贾森·阿诺德·洛特温

马克·爱德华·鲁彭

帕梅拉·休·芬克·沙博诺

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 刘国伟

(51) Int. Cl.

C08B 37/00 (2006. 01)

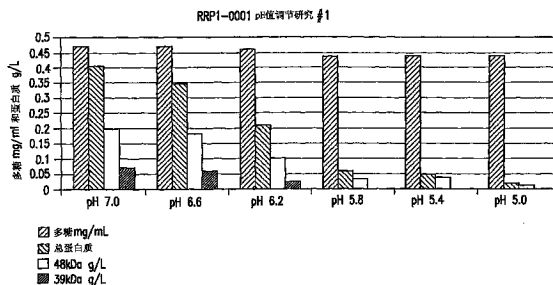
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 6 页

(54) 发明名称

通过 pH 操作将污染物与肺炎链球菌多糖分离

(57) 摘要

本发明描述一种在纯化之前降低复杂细胞肺炎链球菌 (Streptococcus pneumoniae) 溶解产物肉汤中的蛋白质含量且保持其中的荚膜多糖含量的方法。细胞溶解后利用 pH 值的降低产生始终符合蛋白质规格的纯化多糖和纯化过程中的较高多糖回收产量。



1. 一种在纯化之前降低复杂细胞肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 溶解产物肉汤中的蛋白质含量且保持其中荚膜多糖含量的方法, 所述方法包含以下步骤:

(a) 使选定肺炎链球菌 (*S.pneumoniae*) 血清型在大豆基培养基中生长, 其包括:

(i) 向含有所述大豆基培养基的第一个容器接种所述选定血清型的菌种储备物, 且培育所述第一个容器直到生长要求得到满足,

(ii) 向含有所述大豆基培养基的第二个容器接种来自步骤 (i) 的培养物, 同时在所述第二个容器中维持稳定的 pH 值和温度, 和

(b) 用阴离子型或阳离子型洗涤剂溶解步骤 (a) 中所产生的细菌细胞, 从而产生含有可溶性蛋白质、细胞碎片、核酸和多糖的溶解产物;

(c) 搅拌所述细胞溶解产物历时足以确保完全溶解和多糖释放的时间;

(d) 将所述细胞溶解产物的 pH 值降低到 4.5 与小于 5.5 之间以使所述洗涤剂和大部分所述可溶性蛋白质沉淀析出;

(e) 在不搅拌的情况下将步骤 (d) 中所形成的溶液和沉淀保持历时足以使所述沉淀沉降的时间; 和

(f) 通过离心和 / 或过滤加工所述溶液和沉淀,

由此溶液中的所述荚膜多糖得以保留且所述可溶性蛋白质得以有效减少。

2. 一种在纯化之前降低复杂细胞肺炎链球菌溶解产物肉汤中的蛋白质含量且保持其中荚膜多糖含量的方法, 所述方法包含以下步骤:

(a) 在大豆基培养基中使选定肺炎链球菌血清型从开始容器到生产规模容器以递增体积扩大且在细胞生长期间维持稳定的 pH 值和温度;

(b) 用阴离子型或阳离子型洗涤剂溶解步骤 (a) 中所产生的细菌细胞, 从而产生含有可溶性蛋白质、细胞碎片、核酸和多糖的溶解产物;

(c) 搅拌所述细胞溶解产物历时足以确保完全溶解和多糖释放的时间;

(d) 将所述细胞溶解产物的 pH 值降低到 4.5 与小于 5.5 之间以使所述洗涤剂和大部分所述可溶性蛋白质沉淀析出;

(e) 在不搅拌的情况下将步骤 (d) 中所形成的溶液和沉淀保持历时足以使所述沉淀沉降的时间; 和

(f) 通过离心和 / 或过滤加工所述溶液和沉淀, 由此溶液中的所述荚膜多糖得以保留且所述可溶性蛋白质得以有效减少。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述选定肺炎链球菌血清型为 1、4、5、6A、6B、7F 或 19A。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中步骤 (a) 中的所述 pH 值通过氢氧化钠、碳酸钠或其组合的碱馈入维持。

5. 一种在纯化之前降低复杂细胞肺炎链球菌溶解产物肉汤中的蛋白质含量且保持其中荚膜多糖含量的方法, 所述方法包含以下步骤:

(a) 使选自血清型 1、4、6A、6B 和 7F 组成的群组的肺炎链球菌血清型在大豆基培养基中从开始容器到生产规模容器以递增体积扩大, 且在细胞生长期间维持稳定的 pH 值和温度, 所述 pH 值用氢氧化钠维持;

(b) 用阴离子型或阳离子型洗涤剂溶解步骤 (a) 中所产生的细菌细胞, 从而产生含有

可溶性蛋白质、细胞碎片、核酸和多糖的溶解产物；

(c) 搅拌所述细胞溶解产物历时足以确保完全溶解和多糖释放的时间；

(d) 将所述细胞溶解产物的 pH 值降低到 4.5 与小于 5.5 之间以使所述洗涤剂 and 大部分所述可溶性蛋白质沉淀析出；

(e) 在不搅拌的情况下将步骤 (d) 中所形成的溶液和沉淀保持历时足以使所述沉淀沉降的时间；和

(f) 通过离心和 / 或过滤加工所述溶液和沉淀，

由此溶液中的所述荚膜多糖得以保留且所述可溶性蛋白质得以有效减少。

6. 一种在纯化之前降低复杂细胞肺炎链球菌溶解产物肉汤中的蛋白质含量且保持其中荚膜多糖含量的方法，所述方法包含以下步骤：

(a) 使肺炎链球菌血清型 5 在补充有碳酸氢钠的大豆培养基中从开始容器到生产规模容器以递增体积扩大，且在细胞生长期间维持稳定的 pH 值和温度，所述 pH 值用氢氧化钠维持；

(b) 用阴离子型或阳离子型洗涤剂溶解步骤 (a) 中所产生的细菌细胞，从而产生含有可溶性蛋白质、细胞碎片、核酸和多糖的溶解产物；

(c) 搅拌所述细胞溶解产物历时足以确保完全溶解和多糖释放的时间；

(d) 将所述细胞溶解产物的 pH 值降低到 4.5 与小于 5.5 之间以使所述洗涤剂 and 大部分所述可溶性蛋白质沉淀析出；

(e) 在不搅拌的情况下将步骤 (d) 中所形成的溶液和沉淀保持历时足以使所述沉淀沉降的时间；和

(f) 通过离心和 / 或过滤加工所述溶液和沉淀，由此溶液中的所述荚膜多糖得以保留且所述可溶性蛋白质得以有效减少。

7. 一种在纯化之前降低复杂细胞肺炎链球菌溶解产物肉汤中的蛋白质含量且保持其中荚膜多糖含量的方法，所述方法包含以下步骤：

(a) 使肺炎链球菌血清型 19A 在补充有碳酸氢钠的大豆培养基中从开始容器到生产规模容器以递增体积扩大，且在细胞生长期间维持稳定的 pH 值和温度，所述 pH 值用碳酸钠维持；

(b) 用阴离子型或阳离子型洗涤剂溶解步骤 (a) 中所产生的细菌细胞，从而产生含有可溶性蛋白质、细胞碎片、核酸和多糖的溶解产物；

(c) 搅拌所述细胞溶解产物历时足以确保完全溶解和多糖释放的时间；

(d) 将所述细胞溶解产物的 pH 值降低到 4.5 与小于 5.5 之间以使所述洗涤剂 and 大部分所述可溶性蛋白质沉淀析出；

(e) 在不搅拌的情况下将步骤 (d) 中所形成的溶液和沉淀保持历时足以使所述沉淀沉降的时间；和

(f) 通过离心和 / 或过滤加工所述溶液和沉淀，由此溶液中的所述荚膜多糖得以保留且所述可溶性蛋白质得以有效减少。

8. 根据权利要求 1、2、5、6 或 7 中任一权利要求所述的方法，其中所述洗涤剂为脱氧胆酸钠。

通过 pH 操作将污染物与肺炎链球菌多糖分离

技术领域

[0001] 本发明涉及从用于生产肺炎球菌多糖 (pneumococcal polysaccharide) 的肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *S.pneumoniae*) 血清型的细胞溶解产物中去除过量可溶性蛋白质的方法。

背景技术

[0002] 用于疫苗产品的各肺炎链球菌血清型的荚膜多糖通过使有机体在复杂液体培养基中生长产生。有机体群体通常从菌种小瓶到菌种瓶按比例增加且经由一个或一个以上具有递增体积的菌种发酵罐传代直到达到生产规模发酵体积。生长周期的终点可通过数种方法中的一种确定, 此时通过添加有助于细胞壁分解和在细胞达到稳定期时引起细胞溶解的自溶素 (autolysin) 释放的洗涤剂使细胞溶解。然后, 收集溶解产物肉汤用于下游 (纯化) 加工。所述纯化包括数个管柱色谱和渗滤步骤以回收包围细菌细胞的荚膜多糖。当将多糖与诸如 CRM₁₉₇ 的高分子量蛋白质接合且调配为含有具有多种血清型的接合物的疫苗时, 在将其注入诸如婴儿和幼儿的目标群体时, 其有助于给予免疫性 (对肺炎链球菌)。

[0003] 已设定各血清型的纯化多糖中蛋白质含量的规格以降低因疫苗导致的不利结果的危险。举例来说, 在当前销售的 7 价肺炎球菌接合物 (7vPnC) 疫苗 (Prevnar[®]) 中, 纯化血清型 4 多糖中蛋白质含量的规格为以干重计不大于 3% 且纯化血清型 6B 多糖中蛋白质含量的规格为以干重计不大于 2%。

[0004] 在一些情况下, 已证明难以移除在整个纯化过程后仍存在的残余蛋白质。通过改变细胞溶解产物的纯化过程解决这一问题所做的努力仅获得中等成果。

[0005] 因此, 决定在这一过程的上游侧着手解决这一问题。确定主要污染蛋白质为细胞生长和完整性的关键。因此, 可用于降低总蛋白质的剩余选择由改变生长和 / 或收集条件组成。

[0006] 发酵过程相当简单。将细胞 (菌种) 在具有大豆基培养基的瓶中扩大, 然后经由一或两个菌种发酵罐传代, 且最终传代至生产规模发酵罐中。在各步骤中, 严密监测温度和 pH 值, 其中 pH 值通过添加碱性物质 (20% 碳酸钠) 加以控制。当生长达到某一点时, 通过引入起始细胞溶解过程的诸如脱氧胆酸钠 (DOC) 的洗涤剂结束操作。一段保持时间后, 将溶解产物肉汤的 pH 值调节到 6.6 以使脱氧胆酸盐和细胞膜复合物沉淀。将这一物质保持直到可通过离心和过滤加工以移除固体。

[0007] 然而, 大量蛋白质仍溶解于澄清溶解产物中, 从而使得纯化多糖中的残余蛋白质含量超出规格。因此, 对在发酵或纯化过程中降低数种肺炎球菌血清型中的可溶性蛋白质含量存在需要。

发明内容

[0008] 本发明通过提供一种在纯化之前降低复杂细胞肺炎链球菌溶解产物肉汤中的蛋

白质含量且保持其中荚膜多糖含量的方法满足这一需要。这一方法包含以下步骤：

[0009] (a) 使选定肺炎链球菌血清型在大豆基培养基中生长，其包括：

[0010] (i) 向含有大豆基培养基的第一个容器接种选定血清型的菌种储备物，且培育第一个容器直到生长要求得到满足，和

[0011] (ii) 向含有大豆基培养基的第二个容器接种来自步骤 (i) 的培养物，同时在第二个容器中维持稳定的 pH 值和温度，和

[0012] (b) 用洗涤剂溶解步骤 (a) 中所产生的细菌细胞，从而产生含有可溶性蛋白质、细胞碎片、核酸和多糖的溶解产物；

[0013] (c) 搅拌细胞溶解产物历时足以确保完全溶解和多糖释放的时间；

[0014] (d) 将细胞溶解产物的 pH 值降低到小于 5.5 以使洗涤剂和大部分可溶性蛋白质沉淀析出；

[0015] (e) 在不搅拌的情况下将步骤 (d) 中所形成的溶液和沉淀保持历时足以使沉淀沉降的时间；和

[0016] (f) 通过离心和 / 或过滤加工溶液和沉淀，由此溶液中的荚膜多糖得以保留且可溶性蛋白质得以有效减少。

[0017] 选择作为本发明的这一实施例的例示性非限制性肺炎链球菌血清型为 1、4、5、6A、6B、7F 和 19A。在本发明的一特定实施例中且视步骤 (a) 中所生长的血清型而定，通过氢氧化钠、碳酸钠或其组合的碱馈入维持步骤 (a) 中的发酵 pH 值。在另一实施例中，将步骤 (d) 中的 pH 值降低到 4.5 与小于 5.5 之间。在又一实施例中，洗涤剂为脱氧胆酸钠。

[0018] 本发明也涉及一种在纯化之前降低复杂细胞肺炎链球菌溶解产物肉汤中的蛋白质含量且保持其中荚膜多糖含量的方法。这一方法包含以下步骤：

[0019] (a) 在大豆基培养基中使选定肺炎链球菌血清型从开始容器到生产规模容器以递增体积扩大且在细胞生长期间维持稳定的 pH 值和温度；

[0020] (b) 用洗涤剂溶解步骤 (a) 中所产生的细菌细胞，从而产生含有可溶性蛋白质、细胞碎片、核酸和多糖的溶解产物；

[0021] (c) 搅拌细胞溶解产物历时足以确保完全溶解和多糖释放的时间；

[0022] (d) 将细胞溶解产物的 pH 值降低到小于 5.5 以使洗涤剂和大部分可溶性蛋白质沉淀析出；

[0023] (e) 在不搅拌的情况下将步骤 (d) 中所形成的溶液和沉淀保持历时足以使沉淀沉降的时间；和

[0024] (f) 通过离心和 / 或过滤加工溶液和沉淀，由此溶液中的荚膜多糖得以保留且可溶性蛋白质得以有效减少。

[0025] 选择作为本发明的这一实施例的例示性非限制性肺炎链球菌血清型为 1、4、5、6A、6B、7F 和 19A。在本发明的一特定实施例中且视步骤 (a) 中所生长的血清型而定，通过氢氧化钠、碳酸钠或其组合的碱馈入维持步骤 (a) 中的发酵 pH 值。在另一实施例中，将步骤 (d) 中的 pH 值降低到 4.5 与小于 5.5 之间。在又一实施例中，洗涤剂为脱氧胆酸钠。

[0026] 在又一实施例中，当血清型为血清型 5 或 19A 时，用碳酸氢钠补充大豆基培养

基。

[0027] 本发明允许从细胞溶解产物中移除大量过量蛋白质污染物，从而产生供纯化用的较洁净产物（无细胞肉汤（Cell Free Broth）或 CFB），这一产物通常将获得比使用先前发酵和回收法可能的多糖回收率和总多糖产量高的多糖回收率和总多糖产量。

附图说明

[0028] 图 1 为肺炎链球菌型 4 的展示在用乙酸使 pH 值降低时，以每升溶解产物的克数计可溶性蛋白质显著减少的 SDS-PAGE 凝胶。39 kDa 和 48 kDa 组分为细胞壁表面蛋白。也展示多糖产量。

[0029] 图 2 为 pH 值向下调节到 pH 5 的肺炎链球菌型 6B 的结果图，其展示由 SDS-PAGE 所测定的蛋白质降低和用折射率 (RI) 检测器由 HPLC-SEC 所测定的多糖 (Ps) 产量。

[0030] 图 3 为 pH 值向下调节到 pH 5 的肺炎链球菌型 1 的结果图，其展示由 SDS-PAGE 所测定的蛋白质降低和用 RI 检测器由 HPLC-SEC 所测定的多糖产量。

[0031] 图 4 为 pH 值向下调节到 pH 4.1 的肺炎链球菌型 5 的结果图，其展示由 SDS-PAGE 所测定的蛋白质降低和用 RI 检测器由 HPLC-SEC 所测定的多糖产量。

[0032] 图 5 为两种不同发酵操作的 pH 值向下调节到 pH 4.5 的肺炎链球菌型 6A 的结果图，其展示由 SDS-PAGE 所测定的蛋白质降低和用 RI 检测器由 HPLC-SEC 所测定的多糖产量。

[0033] 图 6 为 pH 值向下调节到 pH 4.8 的肺炎链球菌型 7F 的结果图，其展示由 SDS-PAGE 所测定的蛋白质降低和用 RI 检测器由 HPLC-SEC 所测定的多糖产量。

具体实施方式

[0034] 肺炎链球菌为通常成对（双球菌）出现，但以短链或单细胞形式出现的革兰氏阳性柳叶形球菌。其在血液琼脂板上容易生长为反光菌落，且除非无氧生长（此时其展示 B 溶血现象），否则其显示 α 溶血现象。其对可在细胞自身的酶自溶素存在下分解细胞壁的胆汁盐敏感。所述有机体为兼性厌氧菌且不易生长，因为其具有复杂营养需求。

[0035] 大部分肺炎球菌血清型细胞具有作为包围各细胞的多糖鞘的荚膜。这一荚膜在人类中为病毒性的决定子，因为其通过阻止抗体附着于细菌细胞而干扰吞噬作用。当前存在 90 种已鉴别的血清型，其中 23 种血清型引发约 90% 的侵袭性疾病。虽然作为疫苗的多糖鞘在具有已发育或未受损伤的免疫系统的个体内可给予合理程度的免疫性（对肺炎链球菌），但具有多糖的接合蛋白质使也处于受肺炎球菌感染的最大危险中的婴儿和年长者产生免疫反应。重要的是能够从溶解（杀死）的细菌中分离出这一荚膜多糖且移除尽可能多的细胞碎片。如本文所述，这一移除在一系列发酵过程变化中实现。

[0036] 3 个已大大改良下游加工的主要变化如下：(1) 可能时将发酵碱馈入由碳酸钠改为氢氧化钠；(2) 在脱氧胆酸盐保持间隔期间，在发酵罐中维持搅拌；和 (3) 在脱氧胆酸盐溶解产物保持后，将 pH 值降低到小于 5.5。

[0037] 最初的发现为通过将 pH 值降低到小于 5.5，在后续加工（纯化）之前，可从细胞溶解产物中移除 50-90% 的不想要的可溶性蛋白质。虽然其为极重要的方法提高，但在

发酵操作期间使用大量碳酸钠维持设定点的 pH 值导致在用乙酸将 pH 值调节到 5.0 时,引起严重的发泡问题。也发现调节后难以维持稳定的 pH 值,因为溶液中存在的多种形式的碳酸盐。此导致着眼于在发酵肉汤中不会产生碳酸盐堆积的替代碱馈入。因为在接种之前已使用氢氧化钠调节培养基和菌种瓶的 pH 值,所以选择氢氧化钠。高达 100L 发酵的研究表明其为可行的替代物,以光密度 (OD) 计生长仅略微降低。这一碱也解决发泡问题。除氢氧化钠外,也可使用其他碱,且在已确定诸如血清型 5 和 19A 的有机体需要某种形式的碳酸盐来维持生长的情况下可使用碳酸氢钠作为补充物。如果使用碳酸钠作为(诸如)血清型 19A 的主要碱馈入,那么溶解后 pH 值调节(到小于 5.5 的 pH 值)需要减缓的多小时受控酸添加以避免发泡。

[0038] 最终,基于实验室观察,确定如果在不搅拌的情况下进行脱氧胆酸盐保持(如在先前方案中),那么胶状沉淀会沉降在发酵罐壁和 pH 值探针上。当调节 pH 值时,此产生不可靠的原位 pH 值读数。搅拌步骤阻止这一沉淀形成且使 pH 探针的完整性得以维持。

[0039] 因此,在本发明中,使选定肺炎链球菌血清型在包含(例如)经酶消化的大豆基产物、氯化钠、磷酸二氢钾、氯化钙和选定氨基酸的无菌培养基中从开始菌种小瓶以递增体积扩大。在液体培养基中使用具有硫酸镁的右旋糖作为碳源来维持生长。所述培养基中也可补充有特定血清型或方法所需要的其他添加剂。培养在诸如菌种瓶的第一个容器中开始,在基于对流的培育箱中的生长一段时间后,使用所述第一个容器给诸如菌种发酵罐的第二个容器接种,所述第二个容器转而又可用于给(必要时)至少一个诸如生产发酵罐的逐渐增加的更大容器接种,直到达到生产规模。在一实施例中,使选定肺炎链球菌血清型从开始菌种小瓶到菌种瓶到 20L 发酵罐到 200L 发酵罐到 2000L 生产发酵罐以递增体积扩大。就光密度、温度和 pH 值严密监测生长参数以确定何时将培养物转移到下一发酵规模中以及何时终止分批操作。

[0040] 当细菌进入稳定期时,通过添加诸如阴离子型或阳离子型洗涤剂的洗涤剂迫使生产发酵罐中的细胞溶解。所述洗涤剂的代表性实例包括脱氧胆酸钠、N-月桂基肌氨酸、鹅脱氧胆酸钠和皂角苷。在 7°C 与 13°C 之间的温度下搅拌细胞溶解产物历时足以确保完全细胞死亡,例如 8 小时与 24 小时之间的时间后,方法的第二阶段为用诸如 50% 乙酸的酸溶液将细胞溶解产物的 pH 值降低到小于 pH 5.5。实际 pH 值降低随血清型变化,目的为能够低于稳固生产方法所需的一致基础上的最终纯化蛋白质规格。在本发明的一特定实施例中,将 pH 值降低到 4.5 与小于 5.5 之间。

[0041] pH 值降低步骤引起原先可溶性蛋白质的“盐析”(沉淀)。此为当蛋白质达到其等电点时,蛋白质众所周知的化学效应。使这一步骤在本发明中独特的是其在高度复杂的细胞溶解产物肉汤中用作纯化步骤。肉汤定义为“复合体”,因为其含有培养基组分、DNA、蛋白质、多糖、RNA 和其他细胞碎片。

[0042] 除乙酸外,也展示所主张的方法也可用硫酸和磷酸起作用,且这些酸为一部分的 Hofmeister 系列后应以不同功效起作用。Hofmeister 系列为多种阴离子和阳离子的组合且其具有使蛋白质混合物沉淀析出的能力。溶液中这些化合物(Hofmeister 系列)的最终浓度决定多种蛋白质的最终溶解度。

[0043] 在不搅拌的情况下,在 15°C 与 25°C 之间的温度下保持一段足以使沉淀沉降且从

而有助于连续离心过程的诸如 12 小时与 24 小时之间的时间后，先前可溶的蛋白质的极大部分（和可能一些其他先前可溶的污染物组分）以固体沉淀形式析出溶液，其中保留在溶液中的多糖产物几乎未损失或降解。

[0044] 然后，经由连续离心机或通过标准瓶离心加工这一具有沉淀的溶液。收集含有多糖的上清液且在转移用于下游浓缩和纯化之前经由颗粒物和微米过滤器过滤。

[0045] 使用本发明的方法的结果描绘在以下各图中。图 1 展示使用乙酸将 pH 值从 6.8 降低到 5.0，肺炎链球菌血清型 4 的细胞溶解产物肉汤中所观察到的蛋白质减少的代表性 SDS-PAGE 凝胶。最左泳道为用作蛋白质重量参考的分子量标记。样品泳道 1 (“C”) 为 pH 值未经调节的对照。数字展示两个主要蛋白质污染物带 (48 kDa 和 39 kDa) 以及整个泳道中的总蛋白质的近似值 (溶解肉汤中 g/L)。也展示提供用于 HPLC-SEC 分析的样品等分试样中所含有的总多糖产量。泳道 2-8 展示 pH 值经调节的样品的相同信息。泳道 9-11 为用于由基本线性回归分析确定蛋白质产量的 BSA 标准物。Ps 分析不对 pH 6.8 的样品进行。在这一特定血清型中，存在一些适度的多糖 (Ps) 损失，但速率比经由降低 pH 值导致的蛋白质损失的速率低得多。

[0046] 图 2 为说明当细胞溶解产物的 pH 值降低到 5.0 时肺炎链球菌血清型 6B 的细胞溶解产物中蛋白质的减少以及多糖产量稳定性的区块图。这一血清型未见多糖的损失。相反，总蛋白质减少超过一半。

[0047] 图 3 为说明当细胞溶解产物的 pH 值降低到 5.0 时肺炎链球菌血清型 1 的细胞溶解产物中蛋白质的减少以及多糖产量稳定性的区块图。几乎观察不到多糖浓度的变化。相反，总蛋白质减少超过 90%。

[0048] 图 4 为说明当细胞溶解产物的 pH 值降低到 4.1 时肺炎链球菌血清型 5 的细胞溶解产物中蛋白质的减少以及多糖产量稳定性的区块图。在极低 pH 值之前几乎观察不到多糖浓度的变化，其归因于由酸添加量引起的稀释效应。相反，在 pH 4.5 下，总蛋白质减少超过 75%。

[0049] 图 5 为说明当细胞溶解产物的 pH 值降低到 4.5 时肺炎链球菌血清型 6A 的细胞溶解产物中蛋白质的减少以及多糖产量稳定性的两种不同发酵操作的区块图。几乎观察不到多糖浓度的变化。这一图也展示当使用 NaOH 而不是 Na₂CO₃ 时，多糖浓度得以维持而蛋白质浓度降低。

[0050] 图 6 为说明当细胞溶解产物的 pH 值降低到 4.8 时肺炎链球菌血清型 7F 的细胞溶解产物中蛋白质的减少以及多糖产量稳定性的区块图。几乎观察不到多糖浓度的变化。相反，在 pH 4.8 下，总蛋白质减少超过 80%。

[0051] 下表 1 表示使用本发明的方法后，最终纯化多糖的一些蛋白质减少和多糖获得量。

[0052] 表 1. 数种肺炎链球菌血清型的蛋白质浓度和多糖产量

[0053]

血清型	蛋白质规格	原始方法		本发明的方法	
		蛋白质浓度	Ps 产量	蛋白质浓度	Ps 产量
1	≤2.0%	11.7%	11.2g	< 0.8%	15 ~ 20g
5	≤7.5%	10.2%	6.0g	< 6.5% *	8 ~ 13g
7F	≤5.0%	0.2%	19.2g	0.2%	53 g
6A	≤2.0%	NA	NA	0.3%	21.6g

[0054] * 发酵过程展示 DOC 溶解物质的 80% 的蛋白质减少，但其他蛋白质移除不如纯化过程期间高效。

[0055] 上述发酵过程变化用于在纯化加工之前大大降低溶解产物肉汤的蛋白质含量。在无需显著修改用于多糖回收的当前纯化过程的情况下，其使纯化产物符合蛋白质规格。这些变化的意外效益为即使如由 OD 所测定生长略有下降，但总纯化多糖产量提高 25-100%。其为可大大增加肺炎球菌多糖产量的发酵 / 回收过程的稳固改良。

[0056] 以上揭露内容大体上描述本发明。通过参考以下特定实例可获得更完全的理解。仅出于说明的目的描述这些实例且不希望这些实例限制本发明的范畴。实例

[0057] 实例 1

[0058] 肺炎链球菌血清型 1、6A 和 7F 的细胞溶解产物中的蛋白质减少

[0059] 制备母液和工作细胞库

[0060] 肺炎链球菌血清型 1 是获自美国典型微生物菌种保藏中心 (American Type Culture Collection), ATCC, 菌株 6301。肺炎链球菌血清型 6A 和 7F 是获自纽约州立大学 (the State University of New York) 的 Gerald Shiftman 博士。产生数代菌种储备物以使菌株扩大且移除动物来源的组分 (F1 代、F2 代和 F3 代)。再生产两代菌种储备物。附加第一代由 F3 小瓶制备，且随后的代由附加第一代的小瓶制备。将菌种小瓶以作为冷冻保护剂的合成甘油冷冻储藏 (< -70°C)。除冷冻小瓶外，也为 F4 代制备冷冻干燥小瓶。就细胞库制备来说，使所有培养物在大豆基培养基中生长。在冷冻之前，通过离心浓缩细胞，移除用过的培养基，且将细胞小球再悬浮于含有诸如合成甘油的冷冻保护剂的新鲜培养基中。

[0061] 发酵和回收

[0062] 使用来自工作细胞库的培养物给含有大豆基培养基 (表 2) 的菌种瓶接种。在不搅拌的情况下，将瓶在 36°C ± 2°C 下培育直到生长要求得到满足。使用菌种瓶给含有大豆基培养基的菌种发酵罐接种。用 3N NaOH 将 pH 值维持在约 7。达到目标光密度后，使用菌种发酵罐给含有大豆基培养基生产发酵罐接种。用 3N NaOH 维持 pH 值。终止生长后或当达到发酵罐的工作体积时，终止发酵。将适当量的无菌 12% 脱氧胆酸钠添加到培养物中以获得于肉汤中的 0.12% - 0.13% 浓度，溶解细菌细胞且释放细胞结合的多糖。

溶解后，在 7°C 与 13°C 之间的温度下将发酵罐内含物搅拌 8 小时与 24 小时之间的时间间隔以确保出现完全细胞溶解和多糖释放。在这一保持时间期间的搅拌阻止溶解产物沉积物沉降到发酵罐壁和 pH 探针上，从而得以维持 pH 探针的完整性。接着，用 50% 乙酸将溶解培养物肉汤的 pH 值调节到约 pH 5.0。在不搅拌的情况下，在 15°C 与 25°C 之间的温度下保持 12 小时与 24 小时之间的时间间隔的时间后，极大部分先前可溶的蛋白质以固体沉淀形式析出溶液，其中保留在溶液中的多糖几乎未损失或分解。然后，将具有沉淀的溶液通过连续流动离心，接着深度过滤和 0.45 μm 微过滤澄清。

[0063] 在较小规模情况下，上述方法也产生血清型 4 和 6B (图 1 和 2) 的总蛋白质的明显减少，此表明就这两种血清型来说，这一方法在较大规模的情况下会起作用。(肺炎链球菌血清型 4 和 6B 也是获自纽约州立大学的 Gerald Schiffman 博士。)

[0064] 表 2. 大豆基培养基的组成

[0065]

组分	基线浓度	低浓度	高浓度
HySoy	28g/L	18g/L	38g/L
NaCl	3.5g/L	3.5g/L	3.5g/L
KH ₂ PO ₄	0.7g/L	0.7g/L	0.7g/L
CaCl ₂ · H ₂ O	0.018g/L	0.018g/L	0.018g/L
L- 半胱氨酸, HCl	0.21g/L	0.21g/L	0.21g/L

[0066] 实例 2

[0067] 肺炎链球菌血清型 5 的细胞溶解产物中的蛋白质减少

[0068] 肺炎链球菌血清型 5 是获自纽约州立大学 (the State University of New York, Brooklyn, New York) 的 Gerald Schiffman 博士。关于细胞库系统的制备，请参见实例 1。

[0069] 发酵和回收

[0070] 使用来自工作细胞库的培养物给含有上述大豆基培养基 (表 2) 的菌种瓶接种，所述培养基补充有 10mM 浓度的无菌 NaHCO₃ 溶液。在不搅拌的情况下，将瓶在 36°C ± 2°C 下培育直到满足生长要求。使用菌种瓶给含有大豆基培养基的菌种发酵罐接种，其中培养基中 NaHCO₃ 浓度为 10mM。用 3N NaOH 将 pH 值维持在约 7.0。达到目标光密度后，使用菌种发酵罐给含有大豆基培养基的生产发酵罐接种，其中培养基中的 NaHCO₃ 浓度为 10mM。用 3N NaOH 维持 pH 值。生长终止后或当达到发酵罐的工作体积时，终止发酵。将适当量的无菌 12% 脱氧胆酸钠添加到培养物中以获得于肉汤中的 0.12% - 0.13% 浓度，溶解细菌细胞且释放细胞结合的多糖。溶解后，在 7°C 与 13°C 之间的温度下将发酵罐内含物搅拌在 8 小时与 24 小时之间的一段时间以确保出现完全细胞溶解和多糖释放。在这一保持时间期间的搅拌阻止溶解产物沉积物沉降到发酵罐壁和 pH 探针上，从而得以维持 pH 探针的完整性。接着，用 50% 乙酸将溶解培养物肉汤的 pH 值调

节到约 pH 4.8。在不搅拌的情况下，在 15°C 与 25°C 之间的温度下保持在 12 小时与 24 小时之间的一段时间的时间后，极大部分先前可溶的蛋白质以固体沉淀形式析出溶液，其中多糖几乎未损失或分解而保留在溶液中。然后，将具有沉淀的溶液通过连续流动离心并接着深度过滤和 0.45 μm 微过滤而澄清。

[0071] 应了解上述讨论和实例仅仅给出某些实施例的详细描述。因此，对所属领域的技术人员来说显而易见的是，在不背离本发明的精神和范畴的情况下，可产生多种修改和等效物。

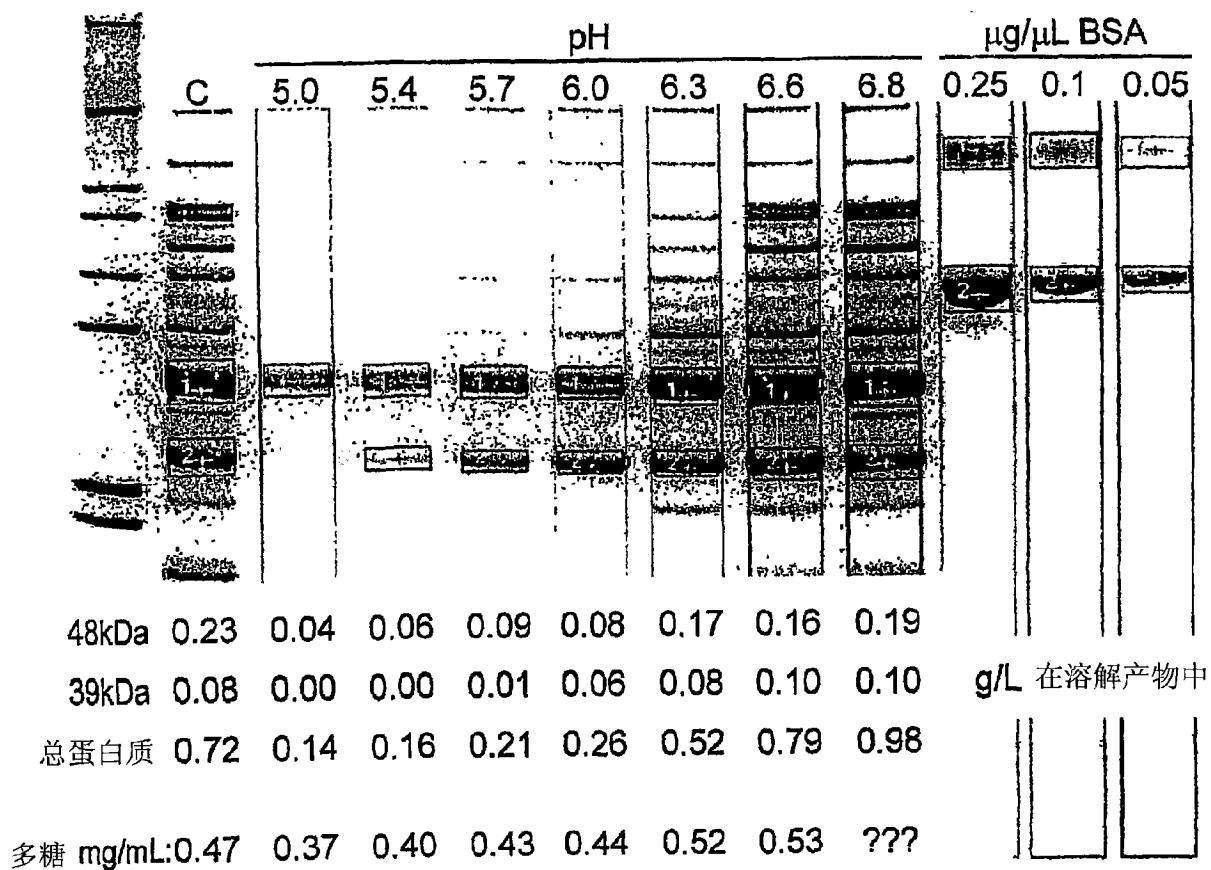


图1

RRP6B-0013

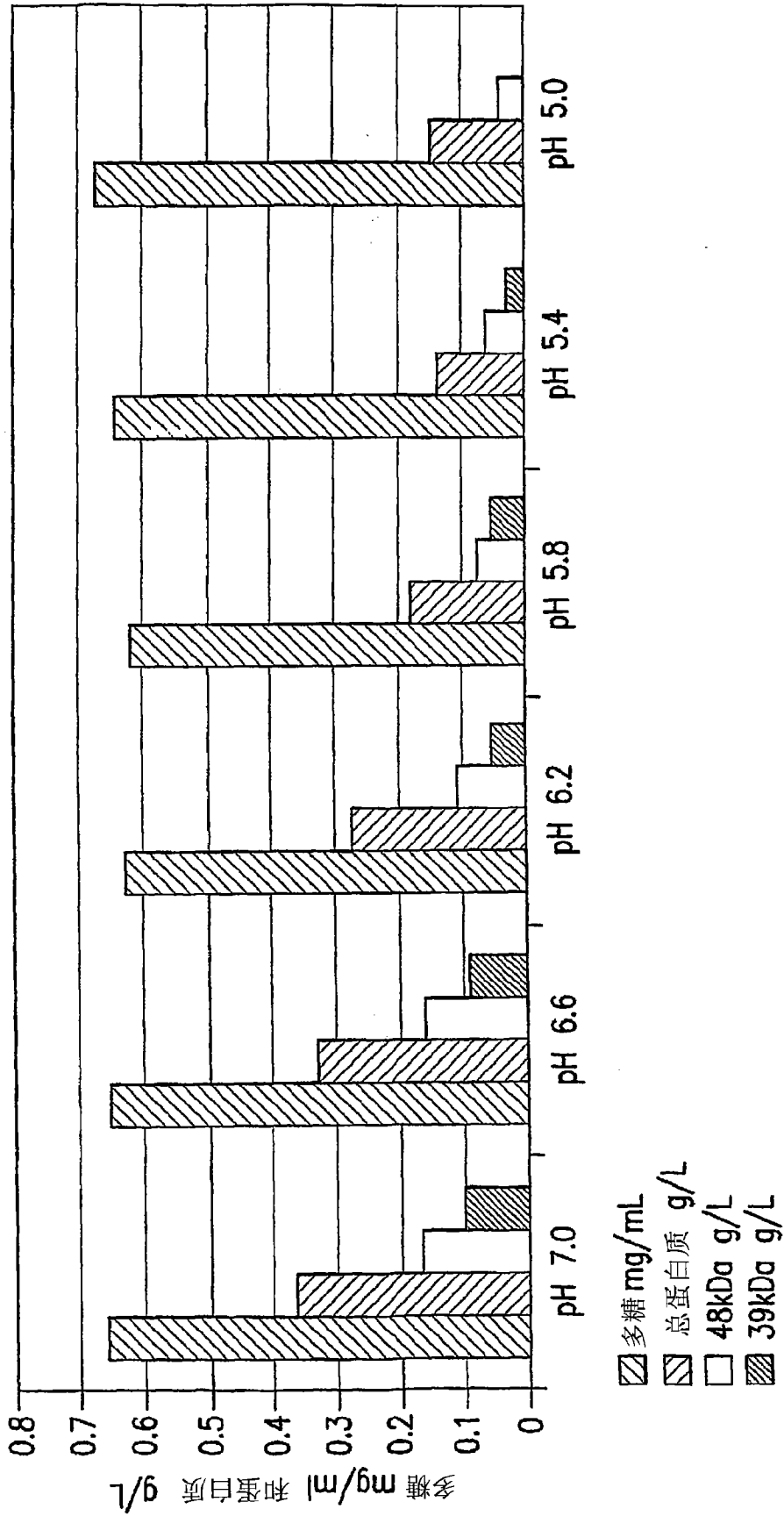
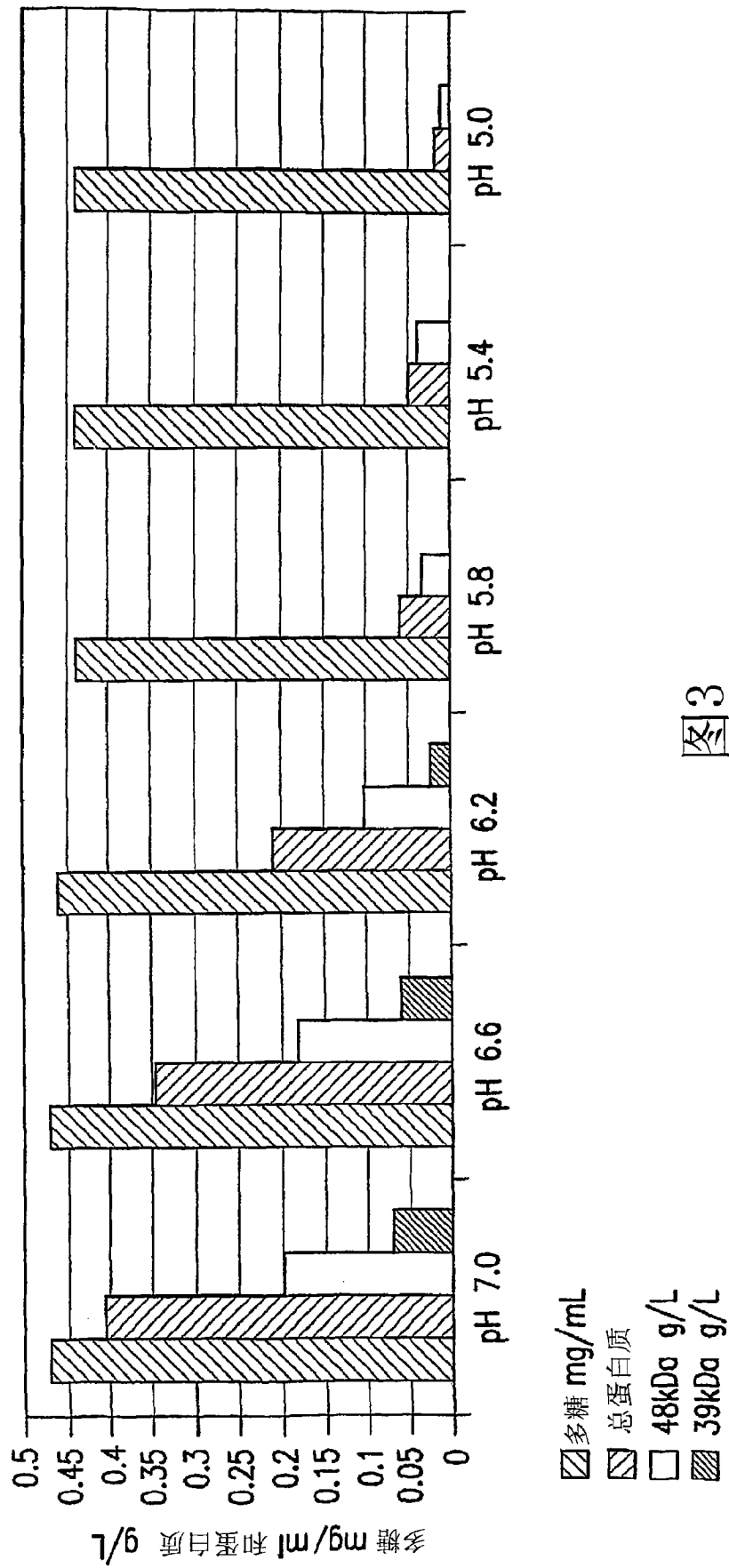


图2

RRP1-0001 pH值调节研究 #1



RRP5-0005 pH值研究

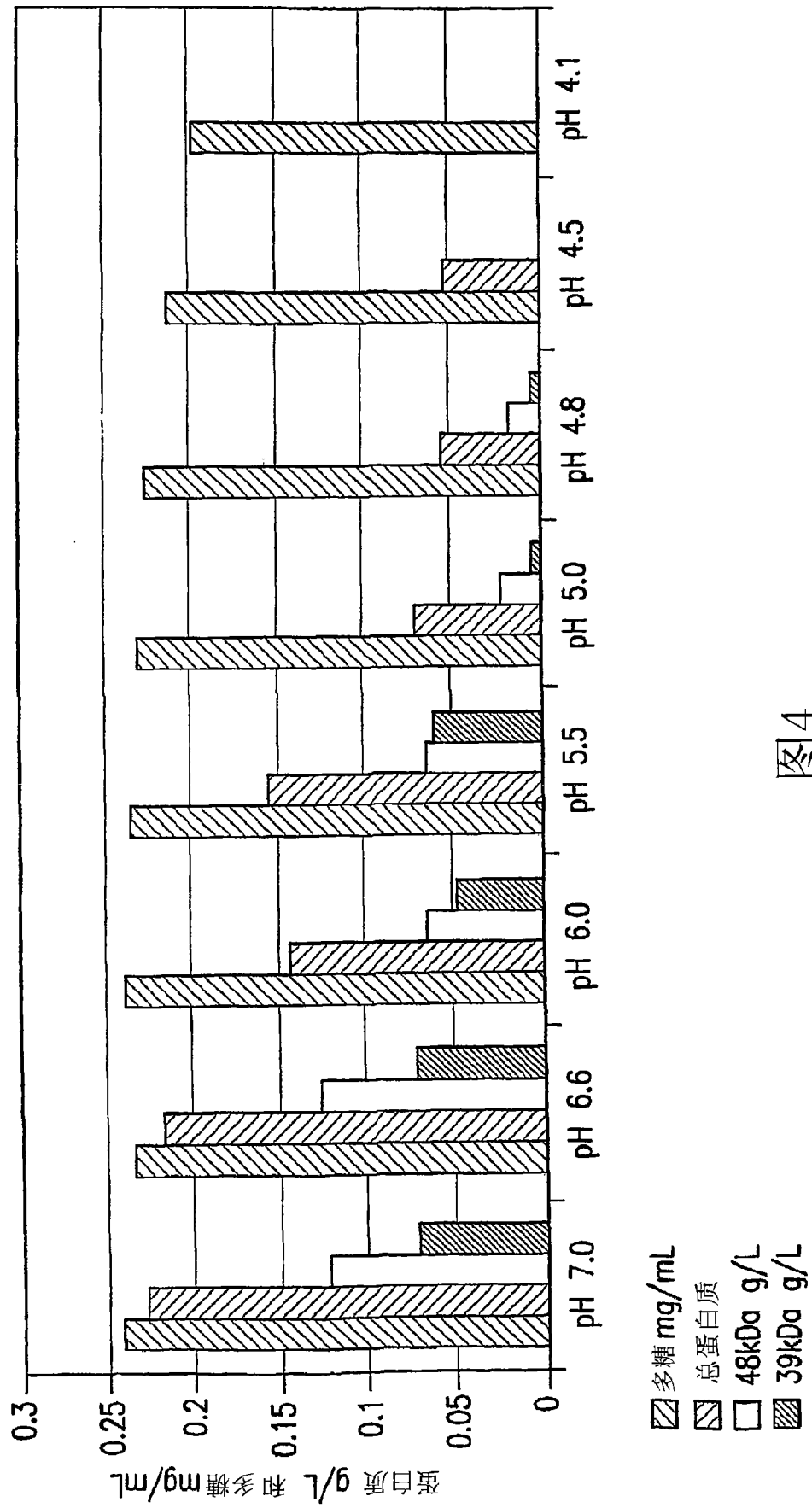


图4

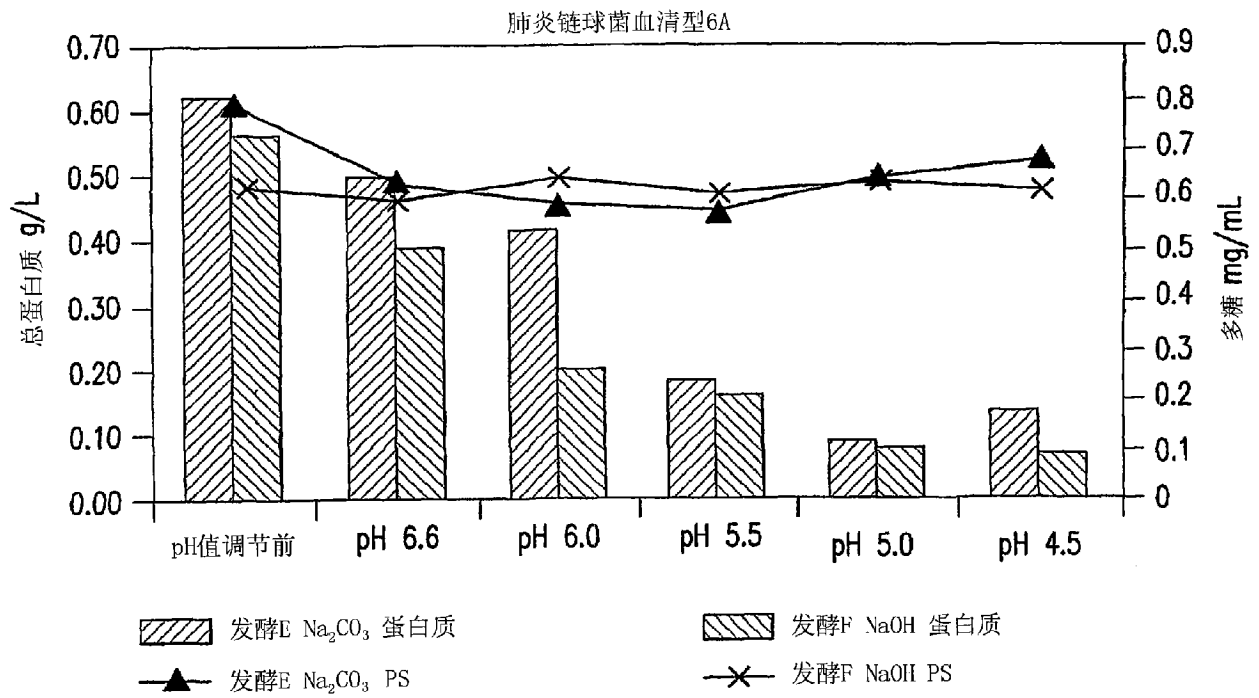


图5

RRP7F-0007 多糖和蛋白质

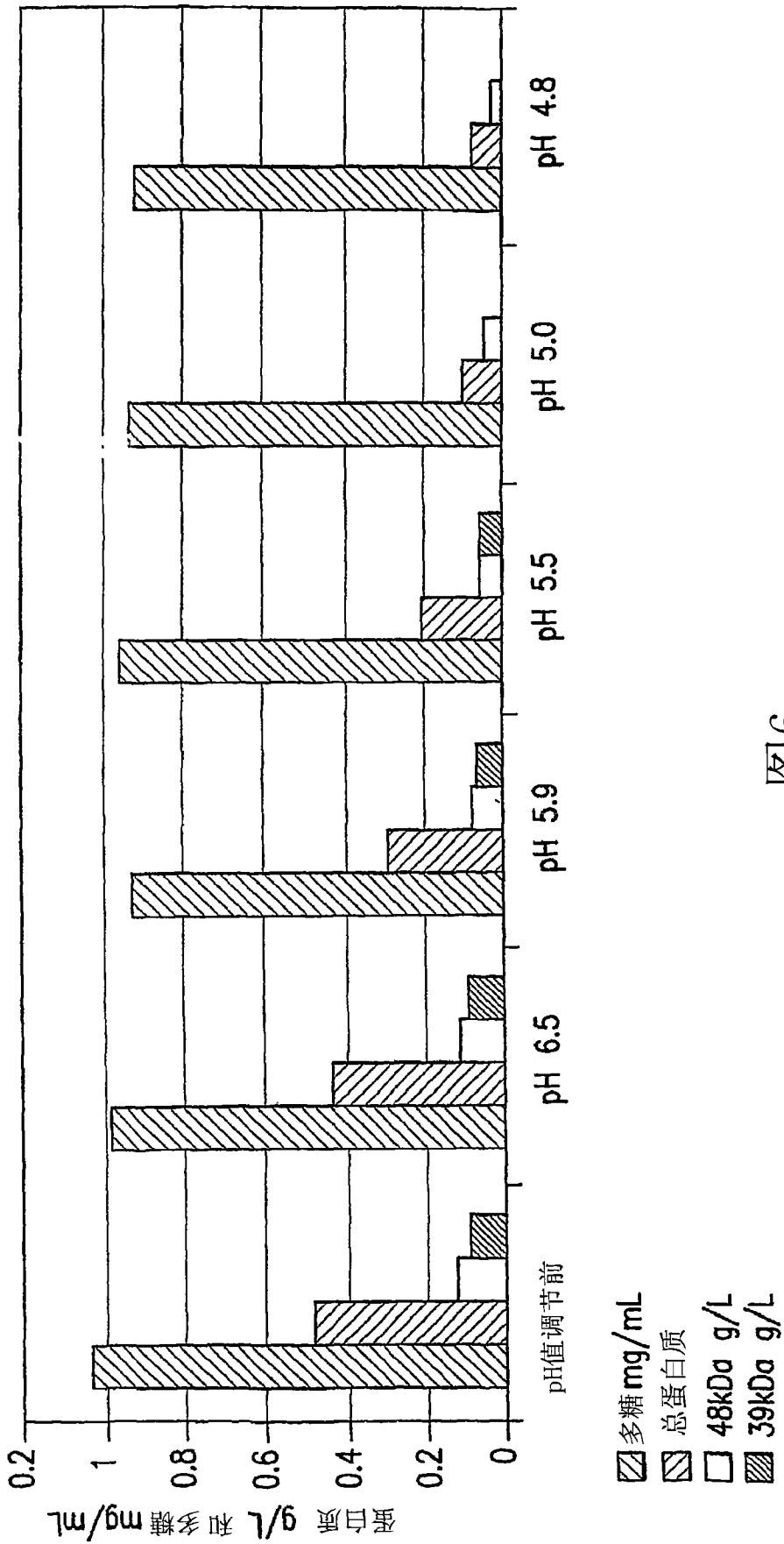


图6