



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 362**

51 Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06755433 .7**
96 Fecha de presentación : **21.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1877538**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Procedimiento de producción de cepas de *Staphylococcus aureus* superproductoras.**

30 Prioridad: **25.04.2005 FR 05 04115**

73 Titular/es: **Sanofi Pasteur
2, avenue Pont Pasteur
69367 Lyon Cédex 07, FR**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2010

72 Inventor/es: **Rokbi, Bachra y
Lafont, Céline**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2010

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 341 362 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de cepas de *Staphylococcus aureus* superproductoras.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de cepas superproductoras de *Staphylococcus aureus* y a su utilización en un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares.

10 Los polisacáridos capsulares de *Staphylococcus aureus*, en particular los polisacáridos de los serotipos 5 y 8, se describen en la bibliografía como componentes de interés para la fabricación de una vacuna destinada a proteger contra las infecciones debidas a *Staphylococcus aureus*.

15 Las cepas T5 y T8 están microcapsuladas y, por tanto, producen pequeñas cantidades de polisacáridos capsulares de interés. Las cantidades de polisacáridos capsulares que deben estar incluidos en una vacuna son importantes debido al hecho del deficiente sistema inmunitario de las poblaciones objetivo (véase, por ejemplo, Fattom, A. *et al.* (1995) Vaccine 13, 1288-1293).

Por tanto, en el marco de un desarrollo industrial de una vacuna de este tipo es importante poder producir grandes cantidades de polisacáridos capsulares T5 y T8.

20 Es bajo esta óptica que los inventores han dado a conocer un nuevo procedimiento que permite aumentar sustancialmente la capacidad de secreción de polisacárido capsular de las cepas de *Staphylococcus aureus*. Los inventores proporcionan, por tanto, un procedimiento de producción que permite obtener polisacárido capsular de *Staphylococcus aureus* en grandes cantidades.

25 Según un primer aspecto, la presente invención se refiere, por tanto, a un procedimiento de producción de cepas superproductoras de *Staphylococcus aureus*, que comprende:

(a) el cultivo de una cepa de *Staphylococcus aureus* en un medio de cultivo M1 que, por litro de medio de cultivo, comprende:

- 30
- 5 a 100 g de peptona vegetal,
 - 0,5 a 20 g de extracto de levadura,
 - 35 • 1 a 30 g de azúcar,
 - 1 a 200 mg de una sal de hierro seleccionada del grupo consistente en FeCl₃ y FeSO₄,
 - 40 • 1 a 700 mg de una sal de magnesio seleccionada del grupo consistente en MgCl₂ y MgSO₄,
 - 0,1 a 500 mg de CaCl₂,
 - 0 a 50 mg de ZnCl₂,
 - 45 • 10 a 250 g de NaCl, preferentemente 58,5 g/l, y

cuyo pH está comprendido en un intervalo de valores que va de 6,2 a 7,5, y

50 (b) eventualmente la recuperación de las cepas a partir del medio de cultivo.

Según un modo particular del procedimiento de producción de cepas superproductoras, el medio de cultivo M1 de la etapa (a) comprende peptona de trigo.

55 Según un modo de realización ventajoso del procedimiento de producción de cepas superproductoras, el medio de cultivo M1, por litro de medio de cultivo, comprende:

- 60
- 30 g de peptona de trigo,
 - 5 g de extracto de levadura,
 - 1 g de D-glucosa H₂O,
 - 120 mg de FeCl₃.6H₂O,
 - 65 • 400 mg de MgCl₂.6H₂O,
 - 10 mg de CaCl₂.2H₂O,

ES 2 341 362 T3

- 58,5 g de NaCl
- 5 mg de ZnCl_2 ,
- 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 6 g de NH_4Cl y pH=6,5

Según otro modo de realización ventajoso el medio M1 contiene por litro:

130 g de peptona de trigo, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H_2O , 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 58,5 g de NaCl, 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 6 g de NH_4Cl , pH=6,5

Según un modo de realización particular, el procedimiento de producción de cepas superproductoras comprende una etapa de precultivo en un medio de precultivo M0 que comprende:

- 3 a 50 g de peptona vegetal,
- 0,5 a 20 g de extracto de levadura,
- 1 a 30 g de azúcar,
- 1 a 200 mg de una sal de hierro seleccionada del grupo consistente en FeCl_3 y FeSO_4 ,
- 1 a 700 mg de una sal de magnesio seleccionada del grupo consistente en MgCl_2 y MgSO_4 ,
- 0,1 a 50 mg de CaCl_2 ,
- 0 a 50 mg de ZnCl_2 ,
- 2 a 50 g de NaCl, preferentemente 6 g/l, y

cuyo pH está comprendido en un intervalo de valores que va de 6,2 a 7,5.

Según un modo particular de realización del procedimiento de producción de cepas superproductoras, la etapa de precultivo utiliza un medio de precultivo M0 que, por litro, comprende 3,87 g de peptona de trigo.

Según otro modo de realización del procedimiento de producción de cepas superproductoras, la etapa de precultivo utiliza un medio de precultivo M0 que, por litro, comprende 30 g de peptona de trigo.

Según un modo de realización ventajoso del procedimiento de producción de cepas superproductoras, la etapa de precultivo utiliza un medio de precultivo M0 gelosado que contiene: 3,87 g de peptona de trigo, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H_2O , 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 g de NaCl, 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g de NH_4Cl , 15 g/l de agar y pH=6,5.

Según otro modo de realización ventajoso del procedimiento de producción de cepas superproductoras, la etapa de precultivo utiliza un medio de precultivo M0 líquido que contiene: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H_2O , 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 g de NaCl, 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g de NH_4Cl , y pH=6,5.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona por tanto un procedimiento de producción de polisacáridos capsulares que comprende:

- el cultivo de una cepa de *Staphylococcus aureus* en un medio de cultivo M1 tal como el definido anteriormente,
- la inactivación del cultivo así producido, y
- la recuperación de los polisacáridos capsulares.

Según un modo de realización del procedimiento de producción de polisacáridos capsulares, la etapa de cultivo utiliza un medio de cultivo M1 que comprende peptona de trigo.

ES 2 341 362 T3

Según un modo de realización, el procedimiento de producción de polisacáridos capsulares comprende una etapa de precultivo tal como fue definida anteriormente en relación con el procedimiento de producción de cepas superproductoras.

5 La presente invención tiene igualmente por objeto un medio de cultivo M1 adaptado a la superproducción de polisacárido capsular de *Staphylococcus aureus* que comprende:

- 5 a 100 g de peptona vegetal,
- 10 • 0,5 a 20 g de extracto de levadura,
- 1 a 30 g de azúcar,
- 15 • 1 a 200 mg de una sal de hierro seleccionada del grupo consistente en FeCl_3 y FeSO_4 ,
- 1 a 700 mg de una sal de magnesio seleccionada del grupo consistente en MgCl_2 y MgSO_4 ,
- 0,1 a 500 mg de CaCl_2 ,
- 20 • 0 a 50 mg de ZnCl_2 ,
- 10 a 250 g de NaCl, preferentemente 58,5 g/l, y

25 cuyo pH está comprendido en un intervalo de valores que va de 6,2 a 7,5, y de preferencia se refiere a un medio de cultivo M1 que, por litro y ventajosamente, consiste en: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H_2O , 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5,8 g de NaCl, 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g de NH_4Cl y pH=6,5.

30 La presente invención se va a describir con más detalle en la descripción siguiente en referencia a la figura 1 que proporciona una representación del protocolo de recuperación de los polisacáridos.

Los inventores han descubierto, de manera sorprendente, que el medio de cultivo M1 induce un aumento sustancial de la capacidad de secreción de polisacárido capsular de las cepas de *Staphylococcus aureus*. Dicho aumento se puede poner de manifiesto por medición de la cantidad de polisacárido capsular producida, por el método ELISA tal como se describe en el ejemplo 2,4 siguiente. Dichas cepas de *Staphylococcus aureus* que presentan una capacidad de producción acrecentada se denominan en el marco de la presente invención como cepas superproductoras.

35 Por tanto, en el marco de la presente invención por “cepas superproductoras” se entiende una cepa de *Staphylococcus aureus* que después de su cultivo en el medio M1 produce una cantidad tal de polisacáridos capsulares en mg/l, que determinada por el método ELISA descrito en el ejemplo 2.4, es al menos 3 veces, preferentemente 5 veces y ventajosamente 10 veces superior a la producida por cultivo de la misma cepa de partida en el medio de Poutrel (véase Poutrel, B *et al.* (1995). Clin Diagn Lab Immunol 2, 166-171 para una descripción del medio o del ejemplo 1.1 siguiente) en las mismas condiciones de cultivo.

45 En el caso de una cepa recombinante, por “cepas superproductoras” se entiende una cepa de *Staphylococcus aureus* recombinante que después de su cultivo en el medio de cultivo M1 produce una cantidad de polisacárido capsular en mg/l que, determinada por el método ELISA descrito en el ejemplo 2.4, es al menos 2 veces superior que la producida por cultivo de la misma cepa de partida en el medio TSB (véase ejemplo 1.5 para una descripción del medio) en las mismas condiciones de cultivo.

50 Los inventores han puesto de manifiesto, de forma sorprendente, que el procedimiento de producción de cepas superproductoras era aplicable a las cepas de *Staphylococcus aureus* T5 y a las cepas T8. Los inventores observaron igualmente que el procedimiento según la invención era igualmente aplicable a las cepas recombinantes que fueron modificadas genéticamente para superproducir su polisacárido capsular. Los inventores han demostrado este aspecto aplicando el procedimiento según la invención a la cepa CYL770 modificada genéticamente para producir polisacárido capsular T8 en grandes cantidades. La cepa, después de su cultivo en el medio M1, aumenta su capacidad de secreción de polisacárido capsular por un factor 2, tal como se describe en los ejemplos siguientes.

60 Por tanto, en el marco de la presente invención, por “cepas de *Staphylococcus aureus*” se entiende cualquier cepa de *Staphylococcus aureus* que exprese una cápsula o microcápsula que comprenda un polisacárido de serotipo T5 y/o T8. Como ejemplos no limitativos de cepas apropiadas se pueden citar las cepas Newman (T5), Reynolds (T5), Lowenstein (T5), Becker (T8), Wright (T8) y CYL770 (T8) y CYL1892 (T5).

65 Estas cepas son disponibles de diversos institutos o diversas colecciones, se puede citar en particular la colección del Instituto Pasteur (CIP): Reynolds CIP 103313, Becker CIP 103314 o la ATCC: Wright ATCC9525, Lowenstein ATCC 49521. En el marco de la presente invención se utilizan preferentemente las cepas CYL770 (T8) y Reynolds (T5). La cepa CYL770 es una cepa Becker modificada genéticamente para producir las mayores cantidades de polisacárido capsular T8. Esta cepa se puede utilizar ventajosamente como cepa de partida en el procedimiento de producción

de cepas superproductoras según la invención, así como en el procedimiento de producción de polisacárido según la invención. Una descripción de la cepa CYL770 se da en el artículo de Luong, T.T et Lee, C. Y (2002), Infect. Immun. 70: 3389-3395. La cepa CYL1892 designa la cepa de *S. aureus* recombinante, obtenida a partir de una cepa Reynolds (CIP 103313) en la cual el promotor del operón *cap5* fue reemplazado por el promotor constitutivamente fuerte del operón *cap1* de la cepa M de *S. aureus* según el procedimiento descrito por Luong et Lee (2002, Infect. Immun. 70: 3389-3395) con las modificaciones siguientes: las secuencias homólogas fueron reemplazadas por secuencias equivalentes homólogas de la cepa Reynolds, el plásmido pCL52.2 fue reemplazado por el plásmido pCL10 que contiene un origen de replicación termosensible y que comprende un marcador *cat* (cloroanfenicol acetil transferasa que confiere una resistencia al cloroanfenicol). Brevemente, un fragmento de ADN de aproximadamente 1 kb que contiene el ORF *cap5* de la cepa Reynolds fusionado a un fragmento de aproximadamente 250 bp que contiene el promotor *Pcap 1* se construye por cabalgamiento, por la técnica de PCR. Un fragmento de ADN de aproximadamente 1 kb que contiene la secuencia aguas arriba del gen *cap5A* se amplifica por PCR a partir del genoma de la cepa Reynolds. Los dos fragmentos se clonan a continuación en el plásmido pCL10 que porta un origen de replicación sensible a la temperatura y que porta un marcador *cat*, de manera que el promotor *Pcap5* sea reemplazado por el promotor *Pcap1*. El plásmido así constituido se somete a continuación a electroforesis en una cepa RN4220, después se introduce por transducción en la cepa Reynolds con ayuda del bacteriófago 52. La sensibilidad del origen de replicación a la temperatura del plásmido permite a continuación favorecer la recombinación homóloga bloqueando su replicación y aplicando una selección por el cloroanfenicol.

Por “polisacárido capsular” en el marco de la presente invención se entienden los polisacáridos capsulares T5 y/o T8 de las cepas de *Staphylococcus aureus*, así como los fragmentos de ellos derivados.

Por “medio de cultivo” en el marco de la presente invención se entiende un medio exento de proteína de origen animal.

Por “proteína de origen animal” se entienden las proteínas obtenidas a partir de materia de origen animal, así como cualquier producto derivado, tales como los productos procedentes del tratamiento químico de las proteínas animales. Se entienden igualmente los productos de la hidrólisis parcial o total de esas proteínas animales tales como las peptonas, los polipéptidos, los péptidos o los aminoácidos de ellos derivados.

El procedimiento de producción de una cepa superproductora según la invención comprende (a) una etapa de cultivo de una cepa de *Staphylococcus aureus*.

Según un modo de realización, la etapa de cultivo utiliza un medio de cultivo M1 que comprende:

- 5 a 100 g de peptona vegetal,
- 0,5 a 20 g de extracto de levadura,
- 1 a 30 g de azúcar,
- 1 a 200 mg de una sal de hierro seleccionada del grupo consistente en FeCl_3 y FeSO_4 ,
- 1 a 700 mg de una sal de magnesio seleccionada del grupo consistente en MgCl_2 y MgSO_4 ,
- 0,1 a 50 mg de CaCl_2 ,
- 0 a 50 mg de ZnCl_2 ,
- 10 a 250 g de NaCl, preferentemente 58,5 g/l, y

cuyo pH está comprendido en un intervalo de valores que va de 6,2 a 7,5.

La fuente de nitrógeno proteico en el medio M1 utilizado es aportada principalmente por una peptona vegetal.

Por “peptona vegetal” en el marco de la presente invención se entienden las peptonas seleccionadas del grupo compuesto por: peptona de trigo y peptona de guisante. Las peptonas vegetales están generalmente en forma de hidrolizados obtenidos por tratamiento enzimático o químico de las proteínas extraídas generalmente de partes de la planta que contienen los mayores contenidos en proteínas tales como, por ejemplo, el germen de trigo. Preferentemente se utilizan plantas que no fueron modificadas genéticamente. En el caso de tratamientos químicos, el extracto proteico es sometido a la acción del ácido clorhídrico en caliente y a presión. A continuación, el hidrolizado se neutraliza con sosa y después se libera de los subproductos sólidos. En el caso de tratamientos enzimáticos, el extracto proteico se digiere habitualmente con papaína. Las peptonas obtenidas están constituidas principalmente por una mezcla de aminoácidos y pequeños péptidos cuyo PM es ≤ 1 KD. Los péptidos cuyo PM es > 1 KD representan menos del 30% de la mezcla. Los preparados comerciales referenciados bajo los nombres (Hy-Pea 7404 de Quest ref. 5710565, peptona de trigo E1 de Organotechnie ref. 19559) son ejemplos de hidrolizados de peptonas vegetales utilizables en el marco de la presente invención.

ES 2 341 362 T3

La concentración de peptona vegetal utilizada en el medio M1 se selecciona teniendo en cuenta el contenido en nitrógeno proteico de la peptona y teniendo en cuenta la concentración en extracto de levadura. Este contenido se calcula por el método de Kjeidahl. Para mayores detalles se puede consultar por ejemplo el artículo de Lynch J.M. *et al.*, J. AOAC Int (1999) 82 (6): 1389-98. Habitualmente, los contenidos en nitrógeno proteico de las peptonas vegetales seleccionadas están comprendidos entre 8% y 15% (peso/peso). En este intervalo de valores, la concentración en peptona vegetal utilizable es de 5 a 100 g por litro de medio de cultivo, preferentemente de 20 a 50 g/l y, en particular, 30 g/l.

La fuente de nitrógeno proteico utilizada en el medio M1 se aporta igualmente por el extracto de levadura. Los contenidos en nitrógeno proteico en los extractos de levadura son generalmente de 9 a 13% (peso/peso). El extracto de levadura se utiliza en una concentración de 0,5 a 20 g/l de medio de cultivo y, en particular, a una concentración de 5 g/l. El nitrógeno proteico del medio de cultivo puede ser aportado igualmente en forma de sales minerales, como ejemplo se pueden citar las sales de amonio tales como el cloruro o sulfato. Estas sales minerales se pueden utilizar a concentraciones que se ajustarán en función de los aportes suministrados por otras fuentes de nitrógeno.

Las concentraciones en fuentes de nitrógeno proteico se ajustan de tal manera que el contenido en nitrógeno proteico total no conduzca a un hipercatabolismo nitrogenado que pueda ser responsable de la acumulación de desechos tóxicos en el transcurso del cultivo. Por otra parte, para evitar la aparición de un efecto inhibitor sustancial de un exceso de vitaminas aportadas por el extracto de levadura, este último no se utiliza más que como fuente secundaria de nitrógeno proteico y, de preferencia, a una concentración de 5 g/l.

Según un modo de realización ventajoso, el medio de cultivo M1 comprende, por litro de medio, 30 g de peptona, preferentemente de peptona de trigo y 5 g de extracto de levadura.

El medio de cultivo comprende igualmente una fuente de azúcar.

Por “fuente de azúcar” en el marco de la presente invención se entiende cualquier fuente de azúcar de origen no animal, metabolizable por la bacteria, tal como fructosa, ribosa, xilosa, fucosa o glucosa. Se pueden utilizar concentraciones del orden de 1 a 30 g/l de medio de cultivo. Por ejemplo, para la glucosa se utiliza ventajosamente una concentración de 1 g/l.

El medio de cultivo M1 comprende igualmente sales minerales y, en particular, al menos sales, preferentemente cloruros, de hierro, magnesio, calcio, cinc y de sodio en las cantidades siguientes:

- 1 a 200 mg de una sal de hierro seleccionada del grupo consistente en FeCl_3 y FeSO_4 y en particular 120 mg de FeCl_3 , por litro de medio de cultivo;
- 1 a 700 mg de una sal de magnesio seleccionada del grupo consistente en MgCl_2 y MgSO_4 y en particular 400 mg de MgCl_2 , por litro de caldo de cultivo;
- 0,5 a 50 mg de CaCl_2 y en particular 10 mg de CaCl_2 , por litro de caldo de cultivo;
- 0 a 50 mg de ZnCl_2 y en particular 5 mg de ZnCl_2 , por litro de caldo de cultivo; y
- 10 a 250 g de NaCl, preferentemente 58,5 g por litro de caldo de cultivo.

Las sales minerales de Fe, Ca y Mg se utilizan normalmente en forma hidratada. En el marco de la presente invención, en los medios de cultivo se utilizaron las sales hidratadas siguientes: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

El medio M1 presenta un pH inicial comprendido en un intervalo de valores que va de 6,2 a 7,5, de preferencia un pH de 6,5, por lo que cualquier sal mineral clásicamente utilizada por su poder tampón y que permita obtener un pH dentro del intervalo de valores indicado anteriormente puede ser utilizada si fuera necesario. Para la determinación del pH, la medición del pH se efectúa con ayuda de un pH-ímetro a la temperatura ambiente.

El medio M1 puede comprender igualmente agentes reguladores de la presión osmótica tal como glicerofosfato y/o glicina-betaína a concentraciones de 1 a 10 mM para la glicina-betaína y 50 a 100 mM para el glicerofosfato, el cual puede ser añadido ventajosamente cuando la concentración de NaCl sea superior a 1 M (50 g/l).

El medio de cultivo M1 utilizado corresponde preferentemente a un medio líquido. No obstante, se puede presentar en forma sólida. La forma sólida o gelosada se obtiene por adición al medio líquido de una sustancia gelificante, habitualmente agar a una concentración de 10 a 30 g por litro de medio de cultivo.

Según un modo de realización ventajoso, el medio de cultivo M1 comprende, y preferentemente consiste en, por litro: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H_2O , 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 58,5 g de NaCl, 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 6 g de NH_4Cl , y presenta un pH de 6,5.

ES 2 341 362 T3

La etapa de cultivo se puede realizar inseminando el medio M con un inóculo, por ejemplo con una DO680 nm inicial de 0,2 e incubación a 37°C, por ejemplo durante un tiempo de aproximadamente 48 a 72 horas en una atmósfera que contiene o no CO₂ en una concentración de 5 a 10% (para el tipo 5 sin CO₂ y, en el caso de la utilización de la cepa Becker, con CO₂). El volumen de cultivo puede variar en función de las necesidades. Se pueden utilizar volúmenes de 400 mL a 20 L o volúmenes superiores, por ejemplo de 30 L a 100 L. Preferentemente se mantiene una relación del volumen de medio de cultivo respecto al volumen del recipiente de cultivo de 20% (V/V). Para grandes volúmenes, la oxigenación se controla y regula en el transcurso del cultivo por un ajuste de la presión de oxígeno y una agitación apropiada.

En función de las necesidades, la etapa de cultivo puede comprender cultivos sucesivos en volúmenes crecientes con objeto de aumentar la biomasa y la cantidad de polisacáridos producidos.

Según un modo de realización ventajoso, el procedimiento de producción de cepas superproductoras comprende una etapa de precultivo en un medio de precultivo M0 que, por litro, comprende:

- 1 a 30 g de peptona vegetal,
- 0,5 a 20 g de extracto de levadura,
- 1 a 30 g de azúcar,
- 1 a 200 mg de una sal de hierro seleccionada del grupo consistente en FeCl₃ y FeSO₄,
- 1 a 700 mg de una sal de magnesio seleccionada del grupo consistente en MgCl₂ y MgSO₄,
- 0,1 a 50 mg de CaCl₂,
- 0,1 a 50 mg de ZnCl₂,
- 0 a 50 g de NaCl, preferentemente 6 g/l, y

cuyo pH está comprendido en un intervalo de valores que va de 6,2 a 7,5.

Para las definiciones de los diferentes componentes podemos remitir a las definiciones dadas anteriormente en relación con el medio de cultivo M1.

Por el contrario, en el marco de la etapa de precultivo se utilizan preferentemente 3,87 o 30 g de peptona, en particular peptona de trigo, por litro de medio de precultivo. La concentración de NaCl en el medio M0 es preferentemente de 6 g por litro. El medio de precultivo M0 en la etapa de precultivo es preferentemente bien un medio gelosado que comprende 3,87 g de peptona de trigo por litro o bien un medio líquido que comprende 30 g de peptona de trigo por litro.

Según un modo de realización ventajoso, la etapa de precultivo se emplea para el cultivo de la cepa en un medio de precultivo M0 que comprende y, de preferencia, consiste en, por litro: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H₂O, 120 mg de FeCl₃.6H₂O, 400 mg de MgCl₂.6H₂O, 10 mg de CaCl₂.2H₂O, 6 g de NaCl, 5 mg de ZnCl₂, 6,8 g de (NH₄)₂SO₄ y 6 g de NH₄Cl, pH=6,5.

Según otro modo de realización ventajoso, la etapa de precultivo se emplea para el cultivo de la cepa en un medio de precultivo M0 líquido o gelosado y que comprende y, de preferencia, consiste en: 3,87 g de peptona de trigo o 30 g/l para el medio M0 líquido, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H₂O, 120 mg de FeCl₃.6H₂O, 400 mg de MgCl₂.6H₂O, 10 mg de CaCl₂.2H₂O, 6 g de NaCl, 5 mg de ZnCl₂, 6,8 g de (NH₄)₂SO₄ y 6 g de NH₄Cl, pH=6,5.

La etapa de precultivo permite una amplificación del inóculo. Ésta se puede realizar por inseminación del medio de precultivo M0 con una cepa de *Staphylococcus aureus*, por ejemplo a razón de 1.10⁷ CFUe incubación a 37°C durante un tiempo que puede variar por ejemplo entre 5 a 20 horas, en una atmósfera que contiene o no 5 a 10% en vol. de CO₂ (sin CO₂ para el T5 y en presencia de CO₂ en el caso de utilizar la cepa Becker). Con objeto de aumentar la biomasa, la etapa de precultivo puede comprender sucesivos precultivos en volúmenes crecientes de medio M0. A continuación, el precultivo sirve para inseminar el medio líquido M1. Para hacer esto, se puede utilizar una cantidad de inóculo tal que la DO680 nm inicial sea de 0,2. El volumen de cultivo en la etapa de precultivo puede variar normalmente de 400 mL a 20 L. Preferentemente, se mantiene una relación de volumen del medio de precultivo en relación al volumen del recipiente inferior o igual a 20%.

Después de la etapa de cultivo las cepas así producidas se pueden recuperar por centrifugación y conservar en forma de liofilizados o de congelados después de la adición de glicerol al 20% o se pueden utilizar directamente para inseminar un mayor volumen de medio de cultivo o también se pueden utilizar directamente en el procedimiento de producción de polisacárido capsular según la presente invención.

ES 2 341 362 T3

Según un modo de realización ventajoso, el procedimiento de producción como el definido anteriormente corresponde a un procedimiento de producción de una cepa Reynolds superproductora.

Según otro modo de realización ventajoso, el procedimiento de producción como el definido anteriormente corresponde a un procedimiento de producción de una cepa CYL770 superproductora.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere por tanto a un procedimiento de producción de polisacárido capsular, que comprende:

- (a) el cultivo de una cepa de *Staphylococcus aureus* tal como la definida anteriormente, en un medio de cultivo M1 tal como el definido anteriormente,
- (b) la inactivación del cultivo así producido, y
- (c) la recuperación del polisacárido capsular.

La etapa (a) de cultivo del procedimiento de producción de polisacárido capsular se puede realizar en las mismas condiciones que las descritas anteriormente en relación con la etapa (a) del procedimiento de producción de cepas superproductoras e, igualmente, puede estar precedido por una etapa de precultivo tal como la descrita anteriormente.

El cultivo resultante de la etapa (a) es sometido a continuación a una etapa de inactivación.

La etapa de inactivación se puede realizar por tratamiento del cultivo con una mezcla de fenol/etanol (V/V) a razón de 2% en volumen final, después agitación, por ejemplo con ayuda de una barrita imantada, a temperatura ambiente durante 6 horas a 48 horas, en función de la biomasa a tratar. La inactivación se controla mediante un ensayo de mortalidad. Para ello, 100 microlitros del cultivo tratado se extienden sobre una gelosa Columbia 2% NaCl y, en paralelo, 100 microlitros del cultivo tratado se inyectan en caldo de tripticasa de soja con adición de 1/30 de suero de caballo. Los cultivos se incuban durante 48 h a 37°C en posición estática, los tapones de los frascos de caldo permanecen sueltos. La inactivación de los cultivos se puede controlar por un método que comprende una etapa de amplificación en medio TSB (sin adición de suero) bajo agitación a 37°C durante 16 a 18 h, después una placa de Petri de gelosa Columbia 2% NaCl se inyecta con 150 µl del cultivo así amplificado. La propia placa se dispone a 37°C durante 16 a 18 h y se observa. Una ausencia de colonias atestigüa el éxito de la inactivación de la colonia tratada. La ausencia de bacterias viables se traduce por una ausencia de gérmenes después de 24 horas de incubación a 37°C. Una vez establecida la mortalidad del cultivo se recupera el polisacárido capsular. La etapa de recuperación comprende una extracción del polisacárido a partir de las células. Se han descrito en la bibliografía diferentes técnicas de extracción y se pueden utilizar en el marco de la presente invención. Se puede hacer referencia, por ejemplo, a los artículos de Lee J.C. Infect. Immun. 1993; 67: 1853-1858; Dassy B. *et al* J. Gen. Microbiol. 1991; 137: 1155-1162. Un método de extracción por tratamiento en autoclave a 121°C se describe en el ejemplo 2.3. Una técnica de extracción que utiliza lisostafina se describe en el ejemplo 2.5.

En el caso de la cepa CYL770, la mayor parte del polisacárido es secretada en el sobrenadante de cultivo y, por tanto, puede ser recuperado directamente a partir de éste último. Para hacer esto a partir del cultivo, se centrifuga el medio y el sedimento celular se elimina.

El polisacárido capsular resultante se puede purificar a continuación, si fuera necesario. Se han descrito en la bibliografía diferentes técnicas de purificación que pueden ser utilizadas en el marco de la presente invención. Se puede hacer referencia, por ejemplo, a los artículos de Lee J.C. *et al* 1987; 55: 2191-2197; Fattom A. *et al.*, Infect. Immun. 1990; 58: 2367-2374. Una técnica de purificación se describe en el ejemplo 2.5.

El análisis de la composición molar en monosacárido y el análisis por RMN del protón a 500 MHz muestran que se obtiene un polisacárido cuya estructura es conforme a la descrita en la bibliografía, con una tasa de O-acetilación superior al 70% y una tasa de pureza de al menos 70%. Los productos residuales están presentes en el producto final a razón de aproximadamente 0,5 a 3% (p/p) de residuales de naturaleza proteica y menos de 0,1% (p/p) de ácidos nucleicos residuales y menos de 5% (p/p) de ácido lipoteicoico y ácido teicoico residuales.

La cantidad de polisacárido capsular obtenido se puede evaluar por la técnica ELISA tal como se describe en el ejemplo 2.4.

Por tanto, el procedimiento de producción de polisacárido según la invención se puede utilizar ventajosamente para producir polisacárido T5, de preferencia a partir de una cepa Reynolds tal como CIP 103313, y de polisacárido T8, de preferencia a partir de la cepa CYL770.

El medio M0 tal como el definido anteriormente es un medio adaptado al cultivo de *Staphylococcus aureus*.

En el marco de la presente invención, por “medio adaptado al cultivo de *Staphylococcus aureus*” se entiende un medio que permite obtener por una parte un aumento de la biomasa por un factor de al menos 10, tal como se determinó por la medida de la densidad óptica a 680 nm y, por otra parte, una viabilidad tal que la relación DO/CFU sea de al menos 1 unidad de DO=10⁸CFU/ml. Para determinar esta relación DO/CFU, la suspensión bacteriana cuya densidad

óptica ha sido medida con ayuda de un espectrofotómetro se diluye en tampón PBS utilizando diluciones en razón 10. El número de CFU contenidos en estas diluciones se evalúa después de la inseminación de estos últimos en una placa de Petri que contiene un medio nutritivo (tal como gelosa Colombia). Después de una incubación de 24 h a 37°C, se cuentan las bacterias viables pudiendo ser establecida así la correspondencia entre el número de bacterias viables expresado en Unidad que forman colonias (CFU) y la densidad óptica (DO).

Según otro aspecto, la presente invención se refiere también al medio de cultivo M1 tal como fue definido anteriormente, adaptado a la superproducción de polisacárido capsular de *Staphylococcus aureus*.

En el marco de la presente invención, por “medio adaptado a la superproducción de polisacárido capsular” se entiende a un medio que conduce a un aumento de la capacidad de secreción de polisacárido capsular de una cepa de *Staphylococcus aureus*, que se traduce por una producción tal de polisacárido capsular, determinada por un ensayo ELISA como el definido en el ejemplo 2.4, al menos 3 veces, de preferencia al menos 5 veces y en particular al menos 10 veces superior que la producida por el cultivo de la misma cepa de partida en las mismas condiciones de cultivo, pero en el medio de Poutrel.

En el caso de cepas recombinantes, se considera que el medio se adapta a la superproducción de polisacárido capsular si conduce a un aumento de la capacidad de secreción de polisacárido capsular de una cepa de *Staphylococcus aureus* recombinante, que se traduce en una producción tal de polisacárido capsular, determinada por un ensayo ELISA como el definido en el ejemplo 2.4, al menos 2 veces superior a la producida por el cultivo de la misma cepa de partida en las mismas condiciones de cultivo, pero en el medio TSB.

La presente invención se va a describir ahora de forma más detallada en los ejemplos siguientes, los cuales se dan a título puramente ilustrativo de la invención y, en ningún caso, se pueden considerar como limitativos del alcance de ésta última.

Ejemplo 1

Preparación de los medios de cultivo

En un primer tiempo, se preparan las soluciones madre de cada uno de los componentes. Para hacer esto, los componentes se pesan en una balanza de precisión y se disuelven en agua ultrafiltrada (salvo indicación contraria). Las soluciones así obtenidas se filtran a continuación sobre esteripup 0,22 micras y se conservan a +4°C al abrigo de la luz. Las soluciones madre de peptonas de trigo, de extracto de levadura y de FeCl₃ se preparan extemporáneamente.

1.1- Medio de Poutrel

El medio de Poutrel se prepara como se indica en el artículo de Poutrel *et al.*, (Poutrel, B *et al.* (1995). Clin Diagn Lab Immunol 2, 166-171) por mezcla de las diferentes soluciones madre. A continuación, el pH se ajusta en 7 por adición de NaOH al 30%, después el medio se filtra sobre 0,22 micras.

La composición final en g/l de medio es: L-cistina: 0,24 g/L; ácido L-aspártico 2,4 g/L; ácido L-glutámico: 2,4 g/L; L-prolina: 2,4 g/L; L-arginina: 0,36 g/L; L-glicina: 2,4 g/L; L-histidina: 0,48 g/L; L-lisina HCl: 0,6 g/L; L-serina 2,4 g/L; L-valina: 0,48 g/L; L-tirosina: 0,18 g/L; L-treonina: 2,4 g/L; L-alanina: 2,4 g/L; L-isoleucina: 0,6 g/L; L-leucina: 0,6 g/L; L-fenilalanina: 0,2 g/L; L-triptófano: 0,06 g/L; L-metionina: 0,18 g/L; D-glucosa: 10 g/L; ácido nicotínico: 11,94 mg/L; tiamina HCl: 0,6 mg/L; sulfato de amonio: 6,84 g/L; dihidrógenofosfato de potasio: 1,34 g/L; difosfato de sodio: 14,38 g/L; cloruro de calcio: 5 mg/L; cloruro de cobalto hexahidratado: 2,4 mg/L; sulfato de cobre: 0,5 mg/L; sulfato de manganeso: 5,6 mg/L; cloruro de sodio: 5,8 mg/L; cloruro de cinc: 3,4 mg/L; cloruro de hierro: 27 mg/L; sulfato de magnesio: 247 mg/L.

1.2- Los medios M0 gelosado, M0 líquido, M1

Para el medio M0 gelosado

En un primer tiempo, 150 ml de base gelosada se preparan por disolución de 3 g de agar en 150 mL de H₂O ultrafiltrada. La composición resultante se dispone al baño-maría en ebullición hasta la desaparición de los granos de agar (aproximadamente 30 min), después se esteriliza en autoclave durante 30 minutos a 116°C.

A continuación, se prepara el medio M0 gelosado por mezcla de las diferentes soluciones madre en el orden indicado en la composición siguiente), filtración de la mezcla resultante sobre esteripup 0,22 micras y adición de la mezcla así obtenida bajo 50 mL a la base gelosada, de manera a obtener un medio que contiene, en g por litro:

peptona de trigo: 3,87 g; extracto de levadura: 5 g; D-glucosa H₂O: 1 g; NaCl: 6 g; MgCl₂.6H₂O: 0,4 g; (NH₄)₂SO₄: 6,8 g; NH₄Cl: 6 g; FeCl₃.6H₂O: 120.10⁻³ g; ZnCl₂: 5.10⁻³ g; CaCl₂.2H₂O: 10.10⁻³ g. Se vierte en 8 placas de Petri.

La peptona de trigo utilizada corresponde a la peptona de trigo de Organotechnie (ref. 19559). El extracto de levadura utilizado corresponde al extracto de Beckton Dickinson (ref. 212750);

ES 2 341 362 T3

Para el medio M0 líquido

El medio M0 líquido se prepara por mezcladura de las diferentes soluciones madre en el orden indicado en la composición siguiente, y filtración de la mezcla resultante sobre estericup 0,22 micras, de manera a obtener un medio que contiene, en g por litro:

peptona de trigo: 30 g; extracto de levadura: 5 g; D-glucosa H₂O: 1 g; NaCl: 6 g; MgCl₂.6H₂O: 0,4 g; (NH₄)₂SO₄: 6,8 g; NH₄Cl: 6 g; FeCl₃.6H₂O: 120.10⁻³ g; ZnCl₂: 5.10⁻³ g; CaCl₂.2H₂O: 10.10⁻³ g, pH=6,5.

Para el medio M1

El medio M1 se prepara por mezcladura de las diferentes soluciones madre en el orden indicado en la composición siguiente, y filtración de la mezcla resultante sobre estericup 0,22 micras, de manera a obtener un medio que contiene, en g por litro:

peptona de trigo: 30 g; extracto de levadura: 5 g; D-glucosa H₂O: 1 g; NaCl: 58,5 g; MgCl₂.6H₂O: 0,4 g; (NH₄)₂SO₄: 6,8 g; NH₄Cl: 6 g; FeCl₃.6H₂O: 120.10⁻³ g; ZnCl₂: 5.10⁻³ g; CaCl₂.2H₂O: 10.10⁻³ g.

1.3- Gelosa Columbia 2% NaCl

Para 1 litro de medio se pesan 44 g de Columbia “Blood Agar Base” (Difco ref. 279240), después se añaden 500 mL de H₂O ultrafiltrada estéril. La mezcla obtenida se incuba al baño-maría a 100°C durante aproximadamente 30 minutos (hasta la disolución completa y obtención de una solución límpida). A continuación se añaden 500 ml de H₂O ultrafiltrada estéril.

La solución se reparte en frascos Schotts de 200 ml, después se esteriliza en autoclave a 116°C durante 30 minutos. Los medios se mantienen a continuación a 55°C (baño-maría) antes de ser vertidos en placas de Petri (250 mL/placa). Antes de verter en las placas, se añaden 13,3 mL de NaCl 30% (filtrado por 0,22 µm) por frasco de 200 mL para obtener una concentración final de 2% (=2 g/100 ml).

1.4- Tryptic Soy Agar (GTS)

Para 1 litro de medio se pesan 40 g de “Tryptic Soy Agar” (Difco ref. 236950), después se añaden 500 mL de H₂O ultrafiltrada estéril. La mezcla obtenida se incuba al baño-maría a 100°C durante aproximadamente 30 minutos (hasta la disolución completa y obtención de una solución límpida). A continuación se añaden 500 ml de H₂O ultrafiltrada estéril. La solución se reparte en frascos Schotts de 200 ml, después se esteriliza en autoclave a 116°C durante 30 minutos. Los medios se mantienen a continuación a 55°C (baño-maría) antes de ser vertidos en placas de Petri (250 mL/placa).

1.5- Caldo “Bacto Tryptic Soy” Broth (TSB)

Para 1 litro de medio se pesan 30 g de “Bacto Tryptic Soy” (Difco ref. 211825), después se añaden 500 mL de H₂O ultrafiltrada estéril. La mezcla obtenida se incuba al baño-maría a 100°C durante aproximadamente 30 minutos (hasta la disolución completa y obtención de una solución límpida). A continuación se añaden 500 ml de H₂O ultrafiltrada estéril. La solución se reparte en frascos Schotts de 200 ml, después se esteriliza en autoclave a 116°C durante 30 minutos. Los medios se mantienen a continuación a 55°C (baño-maría) antes de ser vertidos en placas de Petri (250 mL/placa).

Ejemplo 2

Evaluación de la producción de polisacárido capsular de tipo 5 (CP5) en diferentes concentraciones de cultivo

2.1- Cultivo de la cepa Reynolds

Se prepararon congelados de dos formas diferentes según que se los deseara disponer en condiciones exentas de compuestos de origen animal o en condiciones estándar. Para las condiciones estándar, un liofilizado de origen se recoge sobre una gelosa Colombia+2% NaCl. Esta última se cultiva durante 18 horas a 37°C con o sin CO₂ en función de la cepa. El cultivo se resiembró en una nueva placa de gelosa durante 4 horas a 37°C para obtener gérmenes en fase exponencial de crecimiento. El cultivo se recupera entonces en caldo tripticosa soja, al cual se ha añadido 20% de glicerol. En el caso en que se requieran condiciones exentas de compuestos de origen animal, el precultivo se realiza en medio M0 durante 18 horas a 37°C, después el inóculo sirve para inseminar un medio líquido M0. La congelación se efectúa igualmente después de la adición de glicerol al 20%.

Un congelado Reynolds de 100 µL obtenido por el primer método citado anteriormente se recoge en 900 µL de PBS.

Dos placas de Petri con medio M0 gelosado y dos placas de Petri con gelosa Columbia 2% NaCl, de napa, se inseminan con 150 µL de suspensión bacteriana por placa y se incuba 18-20 h a 37°C.

ES 2 341 362 T3

Las napas se raspan y se vuelven a suspender en 5 mL de PBS. Se mide la DO_{680} de las suspensiones, lo que permite determinar el volumen de precultivo necesario para inseminar los erlenmeyer de 50 mL a una $DO_{680\text{ nm}}=0,2$.

El precultivo sobre gelosa Columbia 2% NaCl se utiliza para inseminar un erlenmeyer con medio de Poutrel, y el precultivo en M0 gelosado (18-20 h a 37°C) se utiliza para inseminar un erlenmeyer con medio M0 líquido y un erlenmeyer con medio M1. Los volúmenes son variables en función de los ensayos, lo más frecuente de 50 mL. Para mantener una buena oxigenación, el volumen del medio es inferior o igual a 20% del volumen del erlenmeyer. Después de la verificación de las $DO_{680\text{ nm}}$ iniciales, los erlenmeyer se disponen bajo agitación (x 100 rpm) a 37°C.

El seguimiento de los cultivos se hace por medición de la DO a 680 nm a t_0 , t_{8h} , t_{24h} , t_{32} , t_{48} , t_{56h} , y t_{72h} , el pH inicial se mide, así como a las 72 h de cultivo. Los resultados obtenidos en los cultivos de 50 ml se indican en las tablas 1 y 2 siguientes.

TABLA 1

Cepa	Medio de precultivo	DO/CFU para $DO_{680}=1$	Variación tipo
Reynolds	gelosa Columbia 2% NaCl	5,3E+08	8,2E+07
Reynolds	M0 gelosado	4,2E+08	1,7E+08

TABLA 2

Medición de la DO 680 nm

Tiempo en horas	Poutrel	M0 líq.	M1
0	0,2	0,2	0,2
8	2,8	2,6	2,7
24	6,7	6,2	4,0
32	9,1	8,0	4,7
48	10,1	8,4	6,1
56	8,6	8,7	6,4
72	8,1	8,6	5,7
pH inicial	7	6,5	6,5
pH final	8,5	8,5	8,5

2.2- Inactivación del cultivo

A las 72 h los cultivos se reparten en 4 frascos Schott de 1 L que contiene cada uno 750 mL de cultivo.

Se añaden 15 mL de fenol/etanol (v/v) para 750 mL de cultivo, es decir 2% final, y se agita la mezcla con ayuda de una barrita imantada, a temperatura ambiente durante 48 h aproximadamente.

El ensayo de mortalidad se realiza de la forma siguiente:

100 μ L de cultivo tratado se extienden sobre gelosa Columbia 2% NaCl, y

100 μ L de cultivo tratado se inseminan en caldo trip casa soja + 1/30 de suero de caballo, después se incuba durante 48 h a 37°C (los tapones de los frascos de caldo trip casa soja se sueltan). Los cultivos así inactivados se utilizan para extraer el polisacárido y evaluar la cantidad producida, por ELISA.

2.3- Extracción del polisacárido producido

Los cultivos de 72 h inactivados se centrifugan a continuación durante 30 min a 3500 rpm a 4°C, los sobrenadantes de los cultivos se separan y se conservan a 4°C. Los sedimentos se recogen en 5 ml de PBS y se tratan en autoclave 60 min a 121°C, después se centrifugan 30 min a 25000 g+4°C. Se recupera el sobrenadante (extracto 1). Los sedimentos se recogen en 5 mL de PBS, se tratan en autoclave 60 min a 121°C y se centrifugan 30 min a 25000 g+4°C. El sobrenadante (extracto 2) se recupera. Los extractos 1 y 2 se reúnen y se tratan con 50 microgramos de proteinasa K 50/ml durante 1 h a 37°C, después se inactiva la proteína 20 minutos a 75°C.

2.4- Evaluación de la cantidad de polisacárido producido, por ELISA

Los sueros policlonales dirigidos contra la cápsula de tipo 5 o de tipo 8 fueron producidos según el método descrito por Karakawa *et al.*, J. C.in. Microbiol. 1985, sept.; 22(3):445-7. Los monoclonales utilizados fueron producidos por el protocolo tal como se describe por Hochkeppel *et al.*, J. Clin. Microbiol. 1987 mar; 25(3):526-30 y que nos fueron transmitidos por el Instituto Pasteur.

La cantidad de polisacárido capsular producido se determina por ELISA. Para hacer esto, se efectúa un ensayo ELISA de tipo emparejado sobre placas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). En un primer tiempo, se deposita en los pocillos un anticuerpo monoclonal anti-CP5 (1 microgramo por ml en un tampón carbonato de sodio 0,05 M, pH=9,6 (sigma) - 100 ng/pocillo), las placas se incuban toda la noche a 4°C. A continuación, se lavan las placas 4 veces con 300 mililitros de tampón PBS por pocillo (Eurobio) al que se añadieron 0,05% de Tween 20 (sigma) (PBS-Tween), después se saturaron durante una hora a 37°C con 250 mililitros por pocillo de PBS-Tween al que se añadió 1% (vol/peso) de BSA (Eurobio) (PBS-Tween-BSA). Las placas se lavan a continuación tres veces con la solución PBS-Tween.

Se efectuaron diluciones en serie por un factor 2 de los extractos de la etapa 2.3 por utilización de la solución PBS-Tween-BSA y se añadieron a razón de 100 microlitros por pocillo. Las placas se incuban durante 90 minutos a 37°C, después se lavan 4 veces con PBS-Tween. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-CP5 producidos según el protocolo de Karakawa (Karakawa *et al.*, 1985, J. Clin. Microbiol. 1985, sept.; 22(3):445-7) se diluyen en PBS-Tween-BSA (1/2000), después se añaden a los pocillos a razón de 100 microlitros por pocillo, y se incuban durante 90 minutos a 37°C. A continuación, las placas se lavan 4 veces con PBS-Tween. El conjugado IgG de cabra anti-conejo - peroxidasa (Southern biotech.), diluido en PBS-Tween-BSA (1/6000) se añade a razón de 100 microlitros por pocillo y se incuba durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavan 8 veces con 300 mililitros de PBS-Tween por pocillo y se añaden 100 microlitros por pocillo de una solución de sustrato TMB (TEBU), después se incuba a oscuras durante 15 min a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C).

La reacción enzimática se detiene por adición de 100 microlitros de H₃PO₄ 1 M (sigma) por pocillo.

Un lector de placa automático (Versamax) mide a continuación la densidad óptica a 450 nm. El valor del testigo se sustrae y la cantidad se evalúa por comparación con una curva patrón.

Los resultados se indican en la tabla 3 siguiente.

TABLA 3

Medio de cultivo	Precultivo	Vol. de cultivo (ml)	DO680 inicial	DO680 final	Dosificación ELISA CP5 (X ₃) (en el sedimento)	
					Media (microg/ml de cultivo)	Desviación tipo
Poutrel	Gel.Col. 2% NaCl	50	0,2	8,1	3,6	0,3
M0 líquido	M0 gelosado	50	0,2	8,6	9,7	1,2
M1	M0 gelosado	50	0,2	5,7	36,0	1,5

ES 2 341 362 T3

2.5- Extracción y purificación del polisacárido CP5

La cepa Reynolds se cultiva como se describe en el punto 2.1 según un protocolo que comprende un precultivo en medio M0 gelosado, después un cultivo en 400 ml de medio M1 en erlenmeyer. Los cultivos se reagrupan para obtener 3 litros de cultivo a partir de los cuales se extrae y purifica el polisacárido T5 producido.

El cultivo integro se inactiva por tratamiento con fenol/etanol (V/V 2% final), después se centrifuga 30 min a 25000 g. Se obtiene un sedimento de aproximadamente 10,9 de gérmenes inactivados húmedos, por litro de cultivo.

Los gérmenes se suspenden a razón de 0,5 g/ml de Tris 50 mM, MgSO₄ 2 mM, pH 7,5. Se añade una solución acuosa de lisostafina de 5 mg/ml de manera a obtener una concentración final de 100 µg/ml. Después de una incubación de 4 horas a 37°C bajo agitación magnética, se añade una solución de benzonasa de 5 U/ml final y la incubación se efectúa durante 2 horas a 37°C bajo agitación magnética.

Después de la centrifugación (25000 g, 30 min), los sobrenadantes de extracción se recogen, se agrupan y se ultrafiltran. El sobrenadante se diluye previamente a ¼ en H₂O para obtener un volumen suficiente para el sistema de ultrafiltración. La ultrafiltración se realiza en 2 casetes UF 50 kD en las condiciones siguientes: H₂O: 10 volúmenes; después Tris 50 mM pH 8,0: 3 volúmenes. El volumen del material retenido permanece constante en el curso de la ultrafiltración. El material retenido constituye lo que se denomina extracto CP5.

El extracto CP5 se incuba a 37°C bajo agitación en presencia de MgCl₂ (1 mM al final) y de benzonasa (5 U/ml final, es decir 40 U por gramo de gérmenes húmedos tratados). Después de 3 horas de incubación se añade la benzonasa en una concentración final de 5 U/ml, la incubación se continúa durante 3 horas. Se añade una solución acuosa de pronasa de 10 mg/ml, de manera a obtener una concentración final de 4 U/ml (es decir 30 U por gramo de gérmenes húmedos tratados), a la que se añadió CaCl₂ hasta una concentración final 1 mM. La mezcla se incuba entonces durante 15 horas a 37°C. Se efectúa una ultrafiltración 50 kD con el fin de eliminar los fragmentos de ácidos nucleicos y de proteínas sobre 2 casetes UF 50 kD en las condiciones siguientes: H₂O: 10 volúmenes; después Tris 50 mM pH 8,0: 3 volúmenes. El volumen del material retenido permanece constante en el curso de la ultrafiltración. Al material retenido anteriormente obtenido se añade MgCl₂ 1 mM al final, benzonasa 0,1 U/ml al final, y se incuba 3 horas bajo agitación magnética.

Se añade una solución acuosa de pronasa de 10 mg/ml a una concentración final de 0,1 U/ml, a la que se añadió CaCl₂ a una concentración final 1mM, después se incuba durante 2 horas a 37°C.

Se efectúa entonces una ultrafiltración sobre 2 casetes UF 30 KD en las condiciones siguientes: H₂O: 10 volúmenes; después Tris 50 mM pH 7,5: 3 volúmenes.

El material retenido presenta un precipitado / turbidez blanquecina que se elimina por centrifugación a 8000 g/30 min.

A continuación, se efectúa una etapa de purificación por cromatografía de intercambio de iones.

Ésta permite la eliminación de sustancias residuales, especialmente ácido teicoico (TA) y ácido lipoteicoico (LTA).

Se utilizan las condiciones siguientes: tres columnas Hi Trap Q HP de 5 ml se conectan en serie (ref: Amersham 17-1154-01); tampón de equilibrado: Tris 20 mM pH 7,5; caudal: 2 ml/min; inyección de la muestra en tampón de equilibrado.

Elución

- Tris 20 mM pH 7,5: 5 volúmenes de columna
- gradiente Tris 20 mM pH 7,5 NaCl 0-0,5 M: 10 volúmenes de columna
- Tris 20 mM, NaCl 0,5 M pH 7,5: 5 volúmenes de columna
- gradiente Tris 20 mM pH 7,5 NaCl 0,5-1 M: 5 volúmenes de columna
- Tris 20 mM, NaCl 1 M pH 7,5: 5 volúmenes de columna
- Tris 20 mM, pH 7,5: 5 volúmenes de columna

La elución se sigue por medición de la absorción a 206 y 280 nm. Un análisis por CZE permite identificar los diferentes componentes eluidos en el transcurso de la cromatografía.

ES 2 341 362 T3

El polisacárido CP5 se eluye en NaCl a una concentración comprendida entre 0,2 M y 0,3 M. En las condiciones cromatográficas utilizadas, éste se separa bien de las sustancias residuales. Especialmente el ácido teicoico que se eluye entre 0,36 M y 0,48 M en NaCl y el ácido lipoteicoico que se eluye entre 0,74 M y 0,86 M en NaCl. Las fracciones que contienen el CP5 se reúnen y se dializan a +4°C frente a 20 volúmenes de una solución acuosa de NaCl 0,5 M (2-3 baños) y después frente a 20 volúmenes de agua ultrafiltrada (3-4 baños). Así, se elimina el Tris.

El producto purificado se liofiliza y se conserva a -20°C.

A partir de 3 litros de cultivo, al final de la purificación se obtienen 74 mg de polisacárido capsular T5. Las características del producto se indican en la Tabla 4 siguiente.

TABLA 4

	Dosificación CP5	O-acetilo (CP en peso de polvo)	O-acetilo (CP dosificación CE)	proteínas	ADN
Método analítico	RMN	colorimetría			
Unidades	% en relación al peso de polvo	Mmoles/mg CP	Moles/mol UR	Mmoles/mg CP	Moles/ moles UR
Resultados	80%	1,32	0,87	1,65	1,08
				% P/P en relación a peso de polvo	% P/P en relación a peso de polvo
				2,7%	<0,1%

Ejemplo 3

Evaluación de la productividad de polisacáridos capsulares de tipo 8 (CP8) en diferentes condiciones de cultivo

La evaluación se realiza en las cepas Becker y CYL770.

3.1- Cultivo de la cepa Becker

Se prepararon congelados de dos formas diferentes según que se los deseara disponer en condiciones sin compuestos de origen animal o en condiciones estándar. Para las condiciones estándar, un liofilizado de origen se recoge sobre una gelosa Colombia+2% NaCl. Esta última se cultiva durante 18 horas a 37°C con o sin CO₂, en función de la cepa. El cultivo se resiembraba de nuevo sobre una nueva placa de gelosa durante 4 horas a 37°C para obtener gérmenes en fase exponencial de crecimiento. El cultivo se recupera entonces en caldo tripticase soja, al cual se ha añadido 20% de glicerol. En el caso en que se requieran condiciones exentas de compuestos de origen animal, el precultivo se realiza en medio M0 durante 18 horas a 37°C, después el inóculo sirve para resembrar un medio líquido M0. La congelación se efectúa igualmente después de la adición de glicerol al 20%.

Un congelado de 100 µL Becker preparado por el método del caldo tripticase soja se recoge en 900 µL de PBS. Tres placas de Petri con M0 gelosado y dos placas de Petri con gelosa Columbia 2% NaCl y una placa de Petri GTS se insembran en napa con 150 µL de suspensión bacteriana por placa. Las placas se incuban durante 18/20 h a 37°C + 5% de CO₂.

Las napsas se raspan y se vuelven a suspender en 5 mL de PBS.

Se mide la DO₆₈₀ de las suspensiones lo que permite determinar el volumen de precultivo necesario para insembrar los erlenmeyer de 50 mL a DO_{680 nm}=0,2.

El precultivo sobre gelosa Columbia 2% NaCl se utiliza para insembrar un erlenmeyer con medio de Poutrel, el precultivo en GTS se utiliza para insembrar un erlenmeyer con TSB, y el precultivo en medio M0 gelosado se utiliza para insembrar un erlenmeyer con medio M0 líquido y un erlenmeyer con medio M1.

Para mantener una buena oxigenación, el volumen del medio es inferior o igual a 20% del volumen del erlenmeyer.

ES 2 341 362 T3

Después de la verificación de las $DO_{680\text{ nm}}$ iniciales, los erlenmeyer se disponen bajo agitación x 100 rpm a 37°C.

Se realizan experiencias similares en los erlenmeyer que contienen 400 ml de cultivo.

5 3.2- Cultivo de la cepa CYL770

Para la cepa recombinante CYL770, el método para la preparación de los

10 congelados utiliza una resiembra del congelado inicial en medio TSB o en un medio M0 líquido. El cultivo se efectúa durante 5 horas a 37°C bajo agitación. La congelación se realiza después de la adición al medio de 20% de glicerol.

15 Un congelado de 1 ml de CYL770 así obtenido se recoge en 10 ml de medio M0 líquido, después se dispone en erlenmeyer de 50 ml y se incuba durante 18/20 h a 37°C bajo agitación x 100 rpm. Un segundo congelado CYL770 se recoge en 10 ml de medio TSB, después se dispone bajo agitación en las mismas condiciones que anteriormente.

Se mide la DO_{680} de los precultivos líquidos, que permite determinar el volumen de precultivo necesario para inseminar los erlenmeyer con 50 mL a $DO_{680\text{ nm}}=0,2$.

20 El precultivo en TSB permite inseminar un erlenmeyer con TSB y el precultivo en M0 líquido permite inseminar un erlenmeyer con medio M1. Para mantener una buena oxigenación, el volumen del medio es inferior o igual a 20% del volumen del erlenmeyer.

25 Después de la verificación de las $DO_{680\text{ nm}}$ iniciales, los erlenmeyer se disponen bajo agitación x 100 rpm a 37°C.

Se realizan experiencias similares en los erlenmeyer que contienen 400 ml de cultivo.

3.3- Seguimiento de los cultivos

30 El seguimiento de los cultivos se hace por medición de las DO a 680 nm a t_0 , t_{8h} , t_{24h} , t_{32} , t_{48} , t_{56h} , y t_{72h} .

Se mide el pH inicial, así como a las 72 h de cultivo. Los resultados de los cultivos en 50 ml se indican en la tabla 5 siguiente.

TABLA 5

Tiempo en horas	Becker				CYL770	
	Poutrel	M0 líquido	M1	TSB	TSB	M1
0	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
8	3,3	3,2	3,6	5,7	3,3	2,3
24	7,4	8,0	4,9	7,1	5,6	3,4
32	7,8	8,6	5,9	7,4	5,9	4,0
48	8,3	8,6	6,3	7,5	4,7	5,8
56	8,1	8,5	5,3	5,7	3,9	5,1
72	7,0	7,5	6,6	5,8	2,9	5,4
pH inicial	7	6,5	6,5	7	7	6,5
pH final	9	8,5	8,5	9	9	8,5

65 3.4- Inactivación de los cultivos

Los cultivos se inactivan según el mismo protocolo que el descrito en el punto 2.2 anterior. La extracción del polisacárido producido se realiza según el mismo protocolo que el descrito en el punto 2.3 anterior.

3.5- Evaluación de la cantidad de polisacárido producido, por ELISA

La evaluación de la cantidad de polisacárido producido se realiza utilizando el mismo ensayo ELISA que el descrito en el punto 2.4 anterior, salvo que los anticuerpos utilizados son anticuerpos anti-CP8 y el ensayo se realiza sobre extractos de los sedimentos y sobre el sobrenadante de cultivo. La absorción fue realizada con un ascitis que contiene el monoclonal K8-24 diluido a 1/20000, y el anticuerpo policlonal de conejo es un suero adsorbido diluido a 1/1000.

Los resultados obtenidos para los cultivos de 50 ml y de 400 ml se indican en la tabla 6 siguiente. Para los cultivos de 400 ml el análisis se hace cada vez en una sola muestra de 50 ml de un cultivo y, a continuación, se calcula la cantidad total y se indica en la tabla 6.

TABLA 6

			Dosificación ELISA del CP8 (X2)			
			Sedimento		Sobrenadante	
Cepa	Cultivo	Precultivo	Media (microg/ml de cultivo)	Desviación tipo	Media (microg/ml de cultivo)	Desviación tipo
Becker (50 ml)	Poutrel	Gel. Col.2% NaCl	1,3	0	1,8	0
	M0 liq.	M0 gel.	1,9	na	3,6	na
	M1	M0 gel.	14,0	1,6	43,2	2,2
	TSB	GTS	0	0	0	0
Becker (400 ml)	M1	M0 gel.	23,4		57,8	
CYL770 (50 ml)	M1	M0 liq.	8,7	0,5	534,2	75,2
	TSB	TSB	4,7	1,3	244	na
CYL770 (400 ml)	M1	M0 liq.	27,18	na	579,6	na
	TSB	TSB	3,6	na	216	na
na: no aplicable						

3.6- Recuperación y purificación del polisacárido (PS) producido

La recuperación del polisacárido T8 fue realizada a partir de cultivos en erlenmeyer de 400 ml de la cepa Becker en medio M1 utilizando un procedimiento tal como el descrito en el ejemplo 2 para la obtención del polisacárido T5.

La purificación del polisacárido T8 se realizó igualmente a partir de cultivos en erlenmeyer de 400 ml de la cepa CYL770 en medio M1 y de cultivos en medio TSB. Para hacer esto, se inactivaron 800 ml de cultivo por tratamiento con fenol/etanol según el procedimiento descrito anteriormente, después se centrifugó 30 min a 25000 g. Se obtuvieron 720 ml de sobrenadante.

A 500 ml de este sobrenadante se añadió una cantidad de acetato de sodio, de manera a obtener una concentración final de 4% en acetato de sodio. La suspensión se pone en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se añade una cantidad de etanol de manera a obtener una concentración final en etanol de 50%. La suspensión se agita entonces a temperatura ambiente durante 30 min, después se mantiene sin agitación una noche a +4°C.

Después de la centrifugación a 15000 g durante 30 min se recoge el sobrenadante. A este sobrenadante se añade acetato de sodio y etanol de manera a obtener una concentración final de 4% en acetato de sodio y de 85% en etanol. La suspensión se pone en agitación 30 min a temperatura ambiente, después se mantiene sin agitación una noche a 4°C. Después de la centrifugación a 15000 g durante 30 min se recoge el sedimento.

El sedimento así obtenido se recoge en 100 ml de agua ultrafiltrada (concentración por un factor 5 en relación al volumen de sobrenadante de cultivo centrifugado). Después de la agitación magnética hasta la disolución completa del sedimento a temperatura ambiente, la suspensión obtenida se dializa frente a 2 litros de agua ultrafiltrada con tres

ES 2 341 362 T3

cambios del baño por día, a temperatura ambiente, seguido de una etapa de una noche a 4°C. A continuación, a la suspensión así obtenida se añade Tris y MgCl_2 con el fin de obtener una concentración final en Tris de 50 mM y de MgCl_2 de 1 mM. Esta solución se incuba a 37°C en presencia de benzonasa (5 U/ml final) bajo agitación. Después de 3 horas de incubación, se añade benzonasa a una concentración final de 5 U/ml, y la incubación se continúa durante 3 horas.

Se añade una solución acuosa de pronasa de 10 mg/ml, de manera a obtener una concentración final de 4 U/ml, a la que se añadió CaCl_2 a una concentración final de 1 mM. Esta etapa se incuba ahora durante 15 horas a 37°C. Si aparece una turbidez/opalescencia visible, se efectúa una centrifugación a 8000 g durante 30 min. Se efectúa una ultrafiltración 30 kDa con el fin de eliminar los fragmentos de ácidos nucleicos y de proteínas en las condiciones siguientes: H_2O : 10 volúmenes; después Tris 20 mM pH 7,5: 3 volúmenes.

El volumen del material retenido permanece constante en el curso de la ultrafiltración y se obtiene una solución límpida, muy ligeramente coloreada.

Si el material retenido obtenido presenta una turbidez/opalescencia, ésta se elimina por centrifugación a 8000 g durante 30 min.

A continuación se efectúa una etapa de cromatografía de intercambio de iones para completar la eliminación de las sustancias residuales, especialmente ácido teicoico (TA) y ácido lipoteicoico (LTA) en las condiciones siguientes: gel Q sefrosa HP: columna Hi Trap Q HP de 20 ml; tampón de equilibrado: Tris 20 mM pH 7,5; caudal: 2 ml/min; inyección de la muestra en tampón de equilibrado. Inyección del equivalente de 125 ml de sobrenadante de cultivo para 20 ml de gel;

Elución

- Tris 20 mM pH 7,5: 5 volúmenes de columna
- gradiente Tris 20 mM pH 7,5 NaCl 0-0,5 M: 20 volúmenes de columna
- Tris 20 mM, NaCl 0,5 M pH 7,5: 5 volúmenes de columna
- Tris 20 mM, NaCl 1 M pH 7,5: 5 volúmenes de columna
- Tris 20 mM, pH 7,5: 5 volúmenes de columna

La elución se sigue por medición de la absorción a 206 y 280 nm. Un análisis por CZE permite identificar los diferentes componentes eluidos en el transcurso de la cromatografía.

Así, pudimos determinar que el polisacárido CP8 se eluye a una concentración de NaCl comprendida entre 0,2 M y 0,3 M. En las condiciones cromatográficas utilizadas, éste se separa bien de las sustancias residuales, cuya cantidad es ínfima después de esta etapa de cromatografía. Especialmente el ácido teicoico que se eluye entre 0,36 M y 0,48 M en NaCl y el ácido lipoteicoico que se eluye entre 0,74 M y 0,86 M en NaCl.

Las fracciones que contienen el CP5 se reúnen y se dializan a +4°C frente a 20 volúmenes de una solución acuosa de NaCl 0,5 M (2-3 baños) y después frente 20 volúmenes de agua ultrafiltrada (3-4 baños). La etapa con fuerte concentración de NaCl permite una buena eliminación del Tris.

El producto así purificado se liofiliza y se conserva a -20°C.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 7 siguiente.

ES 2 341 362 T3

TABLA 7

	Dosificación CP8	O-acetilo (CP en peso de polvo)		O-acetal (CP dosificación CE)		proteínas	ADN
Método analítico	CZE	colorimetría				Micro BCA directo	Picogreen
Unidades	% en relación al peso de polvo	Mmoles/mg CP	Moles/mol UR	Mmoles/mg CP	Moles/ moles UR	% P/P en relación a peso de polvo	% P/P en relación a peso de polvo
Becker (P005) sedimento M0 liq./M1	71%	0,93	0,61	1,31	0,86	2,2%	nd
CYL770 (P006) sobrenadante M0 liq./M1	85%	1,03	0,68	1,22	0,80	0,5%	<0,1%
CYL770 (P007) sobrenadante TSB/TSB	62%	1,08	0,71	1,75	1,14	3,5%	nd
nd = no determinado							

40 Ejemplo 4

Cultivo de la cepa de Staphylococcus aureus Reynolds tipo 5 en fermentadora de 5 litros

4.1- Cultivo en medio BTS + NaCl

El congelado de la cepa Reynolds preparada por el primer método del punto 2.1 se inocula a razón de 0,5% en vol. en dos erlenmeyer con obstáculos de 2 L (E1 y E2) que contiene cada uno 200 ml de medio caldo Triptona soja al que se añadió NaCl (55 g/L). Los erlenmeyer se incuban a 37°C durante 5±1 horas (E1) o 48 horas (E2) bajo una agitación de 175 rpm.

La fermentadora Braun de 30 litros que contiene 20 litros del mismo medio se inocula con 70 ml de precultivo (E1) estimado en aprox. $1,38 \cdot 10^{11}$ CFU (aprox. 5 h de cultivo y $DO_{600\text{ nm}}$ final en el erlenmeyer próxima a 4). El cultivo se realiza en las condiciones siguientes: temperatura: 37°C; duración de cultivo: 48± 2 horas; regulación del pH a 6,50 con NH_4OH 25% y H_3PO_4 10%; PO_2 30% (regulación en cascada: agitación 20 a 80%, aire de 20 (1 vvm) a 60% (3 vvm), enriquecimiento en oxígeno de 0 a 100%); presión: 100 mbar; regulación antiespuma por struktol 1/50.

El seguimiento del cultivo se realiza las primeras horas con tomas regulares, así como a 20±2 horas de cultivo, 24±2 horas de cultivo, 42±2 horas de cultivo para controlar la DO a 600 nm; determinar el peso seco; determinar la viabilidad; observar la morfología; dosificar la glucosa; dosificar el acetato y determinar la productividad en polisacárido por el ensayo ELISA en 6 sedimentos de $DO=50$, después 4±2 horas, 18±2 horas, 24±3 horas, 44±3 horas y 48±2 horas de cultivo.

Las células se recogen después de 48±2 horas de cultivo en vasos de centrifugación de 1L (12 vasos/20 L de cultivo) y se centrifugan 20 minutos a 7000 g a 4°C. El peso húmedo se determina después de eliminar el sobrenadante. Los sedimentos se conservan a ≤ -20°C hasta la etapa de inactivación de los gérmenes con fenol/etanol, seguida de la recuperación y purificación del polisacárido T5 según el procedimiento del ejemplo 2. El segundo erlenmeyer (E2) se observa durante 48 horas con el fin de seguir la productividad de la cápsula CP5 a las 10 h, 24 h y 48 h de cultivo.

ES 2 341 362 T3

4.2- Cultivo en medio Poutrel

El congelado de la cepa *Staphylococcus aureus* Reynolds tipo 5 preparado según el primer método del punto 2.1 se inocula a razón de 1% en vol. en dos erlenmeyer con obstáculos de 2 L (E1 y E2) que contiene cada uno 200 ml de medio Poutrel. Los erlenmeyer se incuban a 37°C durante 16±1 horas a una agitación de 175 rpm. Los precultivos se agrupan y se utilizan para inocular la fermentadora. El cultivo en la fermentadora B. Braun de 30 L que contiene 20 litros de medio Poutrel se realiza en las condiciones siguientes: temperatura: 37°C; duración de cultivo: 48± 2 horas; regulación del pH a 6,50 con NH₄OH 25% y H₃PO₄ 10%; PO₂ 30% (regulación en cascada: agitación 20 a 80%, aire de 20 (1 vvm) a 60% (3 vvm), enriquecimiento en oxígeno de 0 a 100%); presión: 100 mbar; regulación antiespuma por struktol 1/5.

El cultivo se observa las primeras horas, así como a 24±2 horas de cultivo y 30±2 horas de cultivo con tomas para controlar la DO a 600 nm; determinar el peso seco; determinar la viabilidad; observar la morfología; dosificar la glucosa; dosificar el acetato, dosificar los aminoácidos libres y determinar la productividad en polisacárido por el ensayo ELISA.

Las células se recogen después de 48±2 horas de cultivo. Se recogieron 2 L de recolección en un Schott de 2 L y se trataron con fenol/etanol (v/v) a una concentración final de 2% (v/v). Esta mezcla se pone en agitación durante 6 h±1 horas a 22°C±3°C. Después de eliminar el sobrenadante del resto de cultivo, los sedimentos bacterianos se recogen en un volumen mínimo de tampón PBS, después se tratan en autoclave para la inactivación y recuperación del polisacárido según el procedimiento descrito en el ejemplo 2 anterior.

El resto del cultivo se recoge en vasos de centrifugación de 1 L (12 vasos/18 L de cultivo) y se centrifuga 20 minutos a 7000 g a 4°C. El peso húmedo se determina después de eliminar el sobrenadante. 2 litros de sobrenadante se conservan a ≤ -20°C después de la filtración 0,45 µm y de 55 minutos en autoclave a 121°C.

Los 12 sedimentos se vuelven a suspender en un volumen mínimo de tampón PBS (aproximadamente 650 mL) con ayuda del Ultraturax. Las suspensiones se agrupan, homogeneizan y reparten equitativamente en 3 Schott de 500 mL (aproximadamente 300 mL/schott) antes del tratamiento en autoclave durante 55 min a 121°C. A continuación, las suspensiones del autoclave se agrupan y el polisacárido se recupera según el protocolo descrito en el ejemplo 2 anterior.

4.3- Cultivo en medio Columbia + NaCl

Un congelado de *Staphylococcus aureus* Reynolds tipo 5 preparado según el primer método del punto 2.1 se inocula a razón de 1% en vol. en dos erlenmeyer con obstáculos de 2 L que contiene cada uno 200 ml de medio Columbia + 20 g/l de NaCl (difco ref. 294420). Los erlenmeyer se incuban a 37°C durante 24±1 horas a una agitación de 175 rpm. Tras 24±1 horas, los precultivos se agrupan y se utilizan para inocular la fermentadora. El cultivo en la fermentadora de 30 L B. Braun que contiene 20 L del mismo medio se realiza en las condiciones siguientes: temperatura: 37°C; duración de cultivo: 24±2 horas; regulación del pH a 7,00 con NH₄OH 25% y H₃PO₄ 10%; PO₂ 30% (regulación en cascada: agitación 20 a 80%, aire de 20 (1 vvm) a 60% (3 vvm), enriquecimiento en oxígeno de 0 a 100%); presión: 100 mbar; regulación antiespuma por struktol 1/50.

El cultivo se observa regularmente por tomas regulares para controlar la DO a 600 nm; determinar el peso seco; determinar la viabilidad; observar la morfología; dosificar la glucosa; dosificar el acetato y determinar la productividad en polisacárido por el ensayo ELISA.

Las células se recogen a continuación después de 24±2 horas de cultivo. El cultivo final se transfiere a vasos de centrifugación de 1 L (12 vasos/20 L de cultivo) y se centrifuga 20 minutos a 7000 g a 4°C. El peso húmedo se determina después de eliminar el sobrenadante. Después de la centrifugación, los 12 sedimentos se suspenden en un volumen mínimo de tampón PBS comprendido entre 1 y 1,2 L con ayuda del Ultraturax. Las suspensiones se agrupan, homogeneizan y reparten equitativamente en frascos Schott de 500 mL después se tratan en autoclave durante 55 min a 121°C. A continuación, las suspensiones tratadas en autoclave se agrupan y el polisacárido se recupera según el protocolo descrito en el ejemplo 2 anterior.

4.4- Cultivo en medio M1

Un congelado de *Staphylococcus aureus* Reynolds tipo 5 preparado según el primer método descrito en el punto 2.1 anterior se recoge en tampón PBS 1C a razón de 1% mL de congelado por 9 mL de tampón para inseminar aproximadamente 10 placas con medio M0 gelosado, a razón de 150 µL/placa.

Las placas se incuban a 37°C durante 15 a 18 horas. Tras una incubación de 15-18 h a 37°C, las napas formadas se raspan antes de ser suspendidas en medio M1 para inocular dos erlenmeyer de composición idéntica (200 mL/2 L - E1 y E2) de manera a obtener una DO_{600 nm} inicial próxima a 0,2 en cada erlenmeyer. Los erlenmeyer se incuban a 37°C bajo agitación de 175 rpm durante aproximadamente 5 h (cultivo en fase exponencial E1) o 72 h (E2).

Una parte del cultivo de E1 (DO_{600 nm} próxima a 3) se utiliza para inocular la fermentadora B. Braun de 30L que contiene 20 L de medio M1, de manera a obtener una DO_{600 nm} inicial próxima a 0,02).

ES 2 341 362 T3

El cultivo se realiza en las condiciones siguientes: temperatura: 37°C; duración de cultivo: 72± 4 horas; regulación del pH a 6,50 con NH₄OH 25% y H₃PO₄ 10%; PO₂ 30% (regulación en cascada: agitación 20 a 80%, aire de 20 (1 vvm) a 60% (3 vvm), enriquecimiento en oxígeno de 0 a 100%); presión: 100 mbar; regulación antiespuma por struktol 1/50.

1 L de cultivo se recoge a continuación en vasos de centrifugación y se centrifuga 20 minutos a 7000 g a 4°C con el fin de determinar el peso húmedo después de eliminar el sobrenadante. Los residuos se conservan a ≤ -20°C.

El resto del cultivo se recoge en Nalgeno de 50 L y se inactiva con fenol/etanol (2% final v/v), y el polisacárido se recupera según el protocolo descrito en el ejemplo 2 anterior.

El conjunto de resultados obtenidos se indica en la tabla 8 siguiente.

TABLA 8

Medio	Columbia + NaCl	Poutrel	BTS+NaCl	M1
DO final	21	16	17	16
[CP5] extracción lisostafina	nd	6,6 mg/l	nd	130 mg/l
[CP5] extracción autoclave	0,2 mg/l	3,7 mg/l	3,5 mg/l	40 mg/l
Rendimiento específico (µg/DO)	0,01	0,23	0,21	2,5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de una cepa superproductora de *Staphylococcus aureus*, que comprende:

(a) el cultivo de una cepa de *Staphylococcus aureus* en un medio de cultivo M1 que, por litro de medio de cultivo, comprende:

- 5 a 100 g de peptona vegetal,
- 0,5 a 20 g de extracto de levadura,
- 1 a 30 g de azúcar,
- 1 a 200 mg de una sal de hierro seleccionada del grupo consistente en FeCl_3 y FeSO_4 ,
- 1 a 700 mg de una sal de magnesio seleccionada del grupo consistente en MgCl_2 y MgSO_4 ,
- 0,1 a 500 mg de CaCl_2 ,
- 0 a 50 mg de ZnCl_2 ,
- 10 a 250 g de NaCl , preferentemente 58,5 g/l, y

cuyo pH está comprendido en un intervalo de valores que va de 6,2 a 7,5, y

eventualmente la recuperación de las cepas así producidas a partir del medio de cultivo.

2. Un procedimiento de producción de una cepa superproductora según la reivindicación 1, en la cual el medio de cultivo M1 de la etapa (a) comprende peptona de trigo.

3. Un procedimiento de producción de una cepa superproductora según la reivindicación 1 o 2, en la cual el medio de cultivo M1, por litro de medio de cultivo, comprende:

- 30 g de peptona de trigo,
- 5 g de extracto de levadura,
- 1 g de D-glucosa H_2O ,
- 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
- 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
- 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
- 58,5 g de NaCl
- 5 mg de ZnCl_2 ,
- 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 6 g de NH_4Cl y pH=6,5.

4. Un procedimiento de producción según la reivindicación 3, en el cual el medio M1 consiste por litro en: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H_2O , 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 58,5 g de NaCl , 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g de NH_4Cl y pH=6,5.

5. Un procedimiento de producción de una cepa superproductora según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa de precultivo en un medio de cultivo M0 que comprende:

- 3 a 50 g de peptona vegetal,
- 0,5 a 20 g de extracto de levadura,
- 1 a 30 g de azúcar,

ES 2 341 362 T3

- 1 a 200 mg de una sal de hierro seleccionada del grupo consistente en FeCl_3 y FeSO_4 ,
- 1 a 700 mg de una sal de magnesio seleccionada del grupo consistente en MgCl_2 y MgSO_4 ,
- 0,1 a 50 mg de CaCl_2 ,
- 0 a 50 mg de ZnCl_2 ,
- 2 a 50 g de NaCl , preferentemente 6 g/l, y

cuyo pH está comprendido en un intervalo de valores que va de 6,2 a 7,5.

6. Un procedimiento de producción según la reivindicación 5 en el cual el medio M0 de la etapa de precultivo comprende 3,87 g o 30 g de peptona de trigo.

7. Un procedimiento de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el cual el medio M0 de la etapa de precultivo comprende:

- 3,87 o 30 g de peptona de trigo y vegetal,
- 5 g de extracto de levadura,
- 1 g de D-glucosa H_2O ,
- 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
- 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
- 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
- 6 g de NaCl ,
- 5 mg de ZnCl_2 ,
- 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 6 g de NH_4Cl , y pH=6,5.

8. Un procedimiento de producción de polisacárido capsular que comprende:

- el cultivo de una cepa de *Staphylococcus aureus* en un medio de cultivo M1 tal como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- la inactivación del cultivo así producido, y
- la recuperación del polisacárido capsular.

9. Un procedimiento de producción de polisacárido capsular según la reivindicación 8, en el cual el medio M1 de la etapa de cultivo comprende peptona de trigo.

10. Un procedimiento de producción de polisacárido capsular según una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el cual el medio M1 de la etapa de cultivo comprende por litro de medio de cultivo: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H_2O , 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 58,5 g de NaCl , 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g de NH_4Cl y pH=6,5.

11. Un procedimiento de producción de polisacárido capsular según la reivindicación 10, en el cual el medio M1, por litro de medio de cultivo, consiste en: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extracto de levadura, 1 g de D-glucosa H_2O , 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 58,5 g de NaCl , 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g de NH_4Cl y pH=6,5.

12. Un procedimiento de producción de polisacárido capsular según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 que comprende una etapa de precultivo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

ES 2 341 362 T3

13. Medio de cultivo M1 adaptado a la superproducción de polisacárido capsular que comprende:

- 5 a 100 g de peptona vegetal,
- 0,5 a 20 g de extracto de levadura,
- 1 a 30 g de azúcar,
- 1 a 200 mg de una sal de hierro seleccionada del grupo consistente en FeCl_3 y FeSO_4 ,
- 1 a 700 mg de una sal de magnesio seleccionada del grupo consistente en MgCl_2 y MgSO_4 ,
- 0,1 a 500 mg de CaCl_2 ,
- 0 a 50 mg de ZnCl_2 ,
- 10 a 250 g de NaCl , preferentemente 58,5 g/l, y

cuyo pH está comprendido en un intervalo de valores que va de 6,2 a 7,5.

14. Un medio de cultivo M1 según la reivindicación 13 que comprende:

- 30 g de peptona de trigo,
- 5 g de extracto de levadura,
- 1 g de D-glucosa H_2O ,
- 120 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
- 400 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
- 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
- 58,5 g de NaCl ,
- 5 mg de ZnCl_2 ,
- 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 6 g de NH_4Cl y pH=6,5.

Figura 1

Purificación Reynolds/Becker
a partir del sedimento

CYL770 purificación
a partir del sobrenadante

