



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 280 749**

⑤1 Int. Cl.:
C12P 19/26 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **03729905 .4**

⑧6 Fecha de presentación : **19.06.2003**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1517994**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2005**

⑤4 Título: **Floculación con sal bivalente.**

③0 Prioridad: **20.06.2002 DK 2002 00944**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

⑦3 Titular/es: **Novozymes Biopolymer A/S**
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

⑦2 Inventor/es: **Thwaites, Eric**

⑦4 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

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

Floculación con sal bivalente.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método simple y electivo para la floculación de una célula de *Bacillus* que produce un glicosaminoglucano de interés, tal como ácido hialurónico, de un caldo de fermentación.

10 **Estado de la técnica**

El ácido hialurónico (AH) es un mucoide polisacárido de origen biológico, que está muy distribuido en la naturaleza. Por ejemplo, es sabido que el ácido hialurónico está presente en tejidos animales tales como el cordón umbilical, líquido sinovial, humor vítreo, cresta de gallo, y varios tejidos conjuntivos tales como la piel y el cartílago.

15 El ácido hialurónico, con un peso molecular alto, es viscoso y capaz de mantener un estado gelatinoso, que actúa como un lubricante, impidiendo la invasión de bacterias y reteniendo agua.

Debido a las propiedades anteriormente mencionadas, el ácido hialurónico tiene usos técnicos y cosméticos, p. ej., el ácido hialurónico es capaz de conservar la tonicidad y la elasticidad de la piel. El uso farmacéutico del ácido hialurónico está muy descrito en la bibliografía, p. ej., como un ojo vítreo o como un medio de soporte en cirugía oftálmica o como un sustituto del líquido sinovial.

25 Gracias a su naturaleza altamente hidrofílica, el ácido hialurónico puede también ser usado en productos cosméticos tales como lociones y cremas.

El ácido hialurónico puede ser extraído y purificado de p. ej. cordones umbilicales, de crestas de gallo o de estreptococos de grupo A y C.

30 El ácido hialurónico puede también ser producido por producción recombinante en una célula huésped tal como una célula bacteriana o una célula fúngica.

35 Cuando el ácido hialurónico es producido por la fermentación de un microorganismo, la masa celular es retirada de forma convencional por filtración o centrifugado a una dilución elevada. La floculación permite una retirada celular más eficaz y también el uso de una gama más amplia de técnicas de retirada celular (p. ej. filtración de tambor, filtración frontal ("dead end"), centrifugado etc). No obstante, los productos químicos de floculación pueden afectar de forma inversa al producto o impedir estrategias de procesamiento de flujo descendente.

Resumen de la invención

40 Hemos encontrado que es posible flocular una célula de *Bacillus* que produce un glicosaminoglucano de interés, de una manera muy eficaz: La adición de una sal bivalente ha demostrado que crea pequeños icebergs que pueden ser fácilmente separados del caldo celular sin reducir el rendimiento del producto, o sin impedir operaciones de flujo descendente posteriores.

45 La presente invención proporciona un método para flocular una célula de *Bacillus* y/o para retirar los contaminantes de alto peso molecular de un caldo de fermentación, que comprende la adición de una sal bivalente al caldo de fermentación que comprende un glicosaminoglucano de interés tras lo cual la célula de *Bacillus* y/o los contaminantes de alto peso molecular son retirados, en el cual dicha célula de *Bacillus* produce el glicosaminoglucano de interés.

50 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un método para flocular una célula de *Bacillus*, que produce un glicosaminoglucano de interés, de un caldo de fermentación que comprende la adición de una sal bivalente al caldo de fermentación del cual se retirará más tarde la célula de *Bacillus*.

Glicosaminoglucanos

60 Según la invención un glicosaminoglucano puede ser cualquier polímero de carbohidrato con un peso molecular de al menos 10.000 daltons; preferiblemente un peso molecular de al menos 20.000 daltons; más preferiblemente un peso molecular de al menos 30.000 daltons.

Los glicosaminoglucanos preferidos son el ácido hialurónico, chondroitin sulfato, heparina, sulfato de heparina, sulfato de dermatano, y sulfato de queratina. El ácido hialurónico está constituido mediante las unidades de alternación y repetición de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, para formar una cadena lineal con un peso molecular de hasta 15.000.000 daltons.

Los glicosaminoglucanos preferidos según la invención son los glicosaminoglucanos con un peso molecular de 10.000 daltons a 15.000.000 daltons.

Debe ser notado que el término "ácido hialurónico" en la presente solicitud y reivindicaciones puede significar indiferentemente ácido hialurónico en su forma ácida o en su forma de sal tal como por ejemplo hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de magnesio, hialuronato de calcio, u otros.

Caldo de fermentación

El glicosaminoglucano puede ser obtenido a partir de cualquier caldo de fermentación. El glicosaminoglucano puede además ser producible por un método que comprenda el cultivo de una célula huésped.

La célula huésped es una célula de *Bacillus*, p. ej., *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*. En una forma de realización preferida, la célula huésped de *Bacillus* es una célula de *Bacillus lentus*, una célula de *Bacillus licheniformis*, una célula de *Bacillus stearothermophilus* o una célula de *Bacillus subtilis*. Las células de *Bacillus subtilis* mutantes particularmente adaptadas para la expresión recombinante están descritas en WO 98/22898.

La célula de *Bacillus* que produce el glicosaminoglucano de interés se cultiva en un medio nutritivo adecuado para la producción del glicosaminoglucano usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula de *Bacillus* puede ser cultivada por cultivo en frasco de agitación, fermentación a poca escala o a gran escala (incluyendo pero sin limitarse a, fermentaciones discontinuas (batch), alimentadas (fed-batch), o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y de carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles por proveedores comerciales b pueden ser preparados según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection).

Contaminantes/impurezas de alto peso molecular

Los materiales sin glicosaminoglucano con el mismo rango de peso molecular o uno más elevado que el propio glicosaminoglucano de interés, tales como, pero no limitados a: levano, aditivos glutámicos, ácidos nucleicos, detrito celular y componentes etc.

Usando el método según la invención es posible retirar contaminantes/impurezas de peso molecular elevado; es también posible retirar estas impurezas de las preparaciones sin células del glicosaminoglucano de interés.

Floculación

El método de la invención puede ser aplicado a un caldo de fermentación no tratado o a un caldo de fermentación que ha sido sometido primero, pero no limitado a, p. ej., una regulación del pH, una regulación de la temperatura, y/o una dilución del agua.

Según la invención se ha descubierto que la adición de una sal bivalente al caldo de fermentación resulta en una floculación con pequeños flóculos que pueden ser fácilmente separados del caldo celular.

La evaluación de los tamaños de los flóculos se hace normalmente mediante la comparación de los flóculos observados con una fotografía de varios tamaños de flóculos.

Frecuentemente será una ventaja diluir el caldo de fermentación con agua antes, simultáneamente o después de la adición de la sal bivalente. Dependiendo del rendimiento del glicosaminoglucano y de la viscosidad deseada una dilución con el 100-500% (p/p) de agua del caldo de fermentación será apropiada; preferiblemente una dilución con el 100-400% (p/p) de agua del caldo de fermentación.

Frecuentemente será ventajoso calentar el caldo de fermentación antes, simultáneamente o después de la adición de la sal bivalente, o calentar el caldo de fermentación antes, simultáneamente o después de la dilución dependiendo del rendimiento del glucosaminoglucano de interés y de la viscosidad deseada. El caldo de fermentación es preferiblemente calentado a una temperatura alrededor de los 10°C, en particular a una temperatura entre 30°C y 60°C.

Frecuentemente será ventajoso ajustar el pH del caldo de fermentación antes, simultáneamente o después de la adición de la sal bivalente y o la dilución. Preferiblemente el caldo de fermentación es ajustado a un pH entre 6.5 y 14, en particular a un pH entre 7.5 y 8.5.

Salas bivalentes

Según la invención un agente floculante sorprendentemente bueno es una sal bivalente, en particular una sal de calcio y/o de magnesio. Una sal preferida bivalente es un fosfato, un sulfato o un cloruro, p. ej., cloruro de calcio. Una forma de realización preferida es una sal de calcio.

La cantidad mínima de una sal bivalente que floculará es dependiente del microorganismo del caldo de fermentación, de los constituyentes del caldo de fermentación y del tipo y de la concentración de la propia sal. Debería asimismo observarse que la sobredosificación de la sal bivalente puede reducir el rendimiento. La sal bivalente debería ser añadida a al menos 0,1 g de sal bivalente por gramo de masa seca del microorganismo del caldo de fermentación, preferiblemente la sal bivalente puede ser añadida en una gama de 0,5-25 g de sal bivalente por gramo de masa seca del microorganismo del caldo de fermentación, más preferiblemente la sal bivalente puede ser añadida en una gama de 0,5-15 g de sal bivalente por gramo de masa seca del microorganismo del caldo de fermentación, más preferiblemente la sal bivalente puede ser añadida en una gama de 0,5-8 g de sal bivalente por gramo de masa seca del microorganismo del caldo de fermentación, en particular la sal bivalente puede ser añadida en una gama de 0,5-3,5 g de sal bivalente por gramo de masa seca del microorganismo del caldo de fermentación.

La dosificación de la sal bivalente se hace normalmente bien directa o en un tanque de mezcla o por cualquier otro método conocido en la técnica.

Puede ser ventajoso, además de la sal bivalente, añadir uno o más agentes floculantes tales como un aluminato, p. ej., NaAlO_2 , o un polímero catiónico o uno aniónico.

Después de la adición de la sal bivalente, y opcionalmente los demás agentes floculantes, los microorganismos son retirados por métodos conocidos en la técnica tales como, pero no limitados a, filtración, p. ej. filtración del tambor, filtración de la membrana, filtración frontal de filtro prensa, filtración de flujo transversal, o centrifugado.

Operaciones de flujo descendente posteriores

El glicosaminoglucano resultante puede ser aislado adicionalmente por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el glicosaminoglucano puede ser recuperado por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitados a, posterior filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, precipitación o cristalización. El glicosaminoglucano aislado puede luego ser adicionalmente purificado y/o modificado por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación del sulfato amónico), o extracción.

La invención está posteriormente ilustrada con los ejemplos siguientes que no están destinados a ser de ninguna manera limitadores del objetivo de la invención como se reivindica.

*Ejemplo 1**Ejemplo de floculación AH*

Fuente: GMM *B. subtilis* que contiene el casete de ácido hialurónico producido como se describe en la solicitud divisional estadounidense: US 60/342644.

Fermentación

Usamos una escala de 1500 litro; un medio definido utilizando nitrógeno inorgánico como la fuente de nitrógeno única y la dosificación de sacarosa como la fuente de carbono.

La masa celular seca final en el caldo de fermentación fue de aproximadamente 15 a 20 g l^{-1} en una base de peso celular seco. (Difícil de evaluar con precisión debido a la alta viscosidad del caldo).

El ácido hialurónico en el caldo de fermentación fue aproximadamente 10 g l^{-1} con un peso molecular promedio de aproximadamente 1.400.000 Da. (Medido por ELISA y GPC-MALLS respectivamente).

Separación celular

Dilución: 200% (1 en 3) dilución con agua

Temperatura: 10°C

pH 7.0

ES 2 280 749 T3

Floculación: 2% peso de cloruro de calcio con respecto al caldo de cultivo, o aproximadamente 1,0 a 1,3 g de cloruro de calcio por g de células secas.

Retirada celular

Las células floculadas fueron fácilmente retiradas del caldo contenedor de ácido hialurónico bajo las condiciones de funcionamiento del equipo normales y flujos con pérdida pequeña de rendimiento por uno o más de los siguientes métodos:

1. • a: Filtración frontal “nutch”. Condiciones de funcionamiento normales.
2. • b: Centrifugado a escala de laboratorio en tubos centrifugadores de 50 ml. Condiciones de funcionamiento normales.
3. • c: Filtración del tambor (área de 2,5 m²). Condiciones de funcionamiento normales.
4. • d: Centrifugado a escala piloto. Condiciones de funcionamiento normales.

Evaluamos (a)-(d), y en cada caso obtuvimos un líquido marcadamente claro, de color pajizo que contenía la mayoría del ácido hialurónico en el caldo de fermentación original.

La facilidad de separación sugeriría que la separación celular también sería mejorada en otro equipo de separación celular (p. ej. filtro prensa, microfiltración, etc).

Ejemplo 2

Ejemplo de floculación AH a escala piloto, pH 6.5

Fuente: GMM *B. subtilis* que contiene el casete del ácido hialurónico producido como se describe en la solicitud divisional estadounidense: US 60/342644.

Fermentación

Usamos una escala de 1500 litros; un medio definido utilizando nitrógeno inorgánico como la fuente de nitrógeno única y la dosificación de sacarosa como la fuente de carbono.

La masa celular seca final en el caldo de fermentación fue de aproximadamente 10 a 15 g l⁻¹ en una base de peso celular seco. (Difícil de evaluar con precisión debido a la alta viscosidad del caldo).

El ácido hialurónico en el caldo de fermentación fue aproximadamente 12 g l⁻¹ con un peso molecular promedio de aproximadamente 1.000.000 Da. (Medido por ELISA y GPC-MALLS respectivamente).

Separación celular

Dilución: 300% (1 en 4) dilución con agua

Temperatura 35°C

Floculación: 2% peso de cloruro de calcio con respecto al caldo de cultivo o 1,3 a 2,0 g de cloruro de calcio por g de células secas.

pH 6.5

Retirada celular

Las células floculadas fueron fácilmente retiradas del caldo contenedor de ácido hialurónico bajo unas condiciones de funcionamiento del equipo normales y flujos con pérdida pequeña de rendimiento por uno o más de los siguientes métodos:

1. • a: Filtración frontal “nutch”. Condiciones de funcionamiento normales.
2. • b: Centrifugado a escala de laboratorio en tubos centrifugadores de 50 ml. Condiciones de funcionamiento normales.
3. • c: Filtración del tambor (área de 2,5 m²). Condiciones de funcionamiento normales.

ES 2 280 749 T3

4. • d: Centrifugado a escala piloto. Condiciones de funcionamiento normales.

Evaluamos (a)-(d), y en cada caso obtuvimos un líquido marcadamente claro, de color amarillo pajizo que contenía la mayoría del ácido hialurónico en el caldo de fermentación original.

La facilidad de separación sugeriría que la separación celular también sería mejorada en otro equipo de separación de celular (p. ej. filtro prensa, microfiltration, etc).

Ejemplo 3

Ejemplo de floculación AH a escala del proceso, pH 8

Fuente: GMM *B. subtilis* que contiene el casete del ácido hialurónico producido como se describe en la solicitud divisional estadounidense: US 60/342644.

Fermentación

Usamos una escala de 20 000 litros; un medio definido utilizando nitrógeno inorgánico como la fuente de nitrógeno única y la dosificación de sacarosa como la fuente de carbono.

La masa celular seca final en el caldo de fermentación fue de aproximadamente 8 a 10 g l⁻¹ en una base de peso celular seco.

Ácido hialurónico en el caldo de fermentación fue aproximadamente 10 g l⁻¹ con un peso molecular promedio de aproximadamente 1.000.000 Da. (Medido por ELISA y GPC-MALLS respectivamente).

Separación celular

Dilución: 400% (1 en 5) dilución con agua

Temperatura 45°C

pH 8.0

Floculación: 2% peso cloruro de calcio con respecto al caldo de cultivo o aproximadamente 2,0 a 2,5 g de cloruro de calcio por g de células secas.

Retirada celular

Las células floculadas fueron fácilmente eliminadas del caldo contenedor de ácido hialurónico bajo condiciones de funcionamiento del equipo normales y flujos con pérdida pequeña de rendimiento por uno o más de los siguientes métodos:

1. • a: Filtración frontal “nutch”. Condiciones de funcionamiento normales.

2. • b: Centrifugado a escala de laboratorio en tubos centrifugadores de 50 ml. Condiciones de funcionamiento normales.

3. • C: Filtración del tambor (escala del proceso). Condiciones de funcionamiento normales.

4. • d: Filtro prensa (escala piloto). Condiciones de funcionamiento normales.

Evaluamos (a)-(d), y en cada caso obtuvimos un líquido marcadamente claro de color pajizo que contenía la mayoría del ácido hialurónico en el caldo de fermentación original. Los contaminantes de peso molecular alto (como se evaluó por análisis de GPC antes y después del tratamiento así como por digestión enzimática) fueron exhaustivamente retirados.

La facilidad de separación sugeriría que la separación celular también sería mejorada en otro equipo de separación celular (p. ej. microfiltration, etc). El funcionamiento a esta dilución y temperatura redujo la viscosidad de manera que los índices del flujo fueron superiores a los de los ejemplos 1 ó 2. Además, la depuración celular y otra depuración de contaminantes (medida por recuento de células y turbidez) fueron también mayores que en los ejemplos 1 ó 2.

ES 2 280 749 T3

Ejemplo 4

Ejemplo de floculación AH a escala piloto, experimento de retirada de contaminantes

- 5 *Fuente:* GMM *B. subtilis* que contiene el casete del ácido hialurónico producido como se describe en la solicitud divisional estadounidense: US 60/342644.

Fermentación

- 10 Usamos una escala de 1500 litros; un medio definido utilizando nitrógeno inorgánico como la fuente de nitrógeno única y la dosificación de sacarosa como la fuente de carbono.

La masa celular seca final en el caldo de fermentación fue de aproximadamente 8 a 10 g l⁻¹ en una base de peso celular seco.

- 15 El ácido hialurónico en el caldo de fermentación fue de aproximadamente 10 g l⁻¹ con un peso molecular promedio de aproximadamente 1.000.000 Da. (Medido por ELISA y GPC-MALLS respectivamente).

Separación celular

- 20 Dilución: 300% (1 en 4) dilución con agua

Temperatura 15 a 60°C

- 25 pH 5.0 a 10.0

Floculación: 2% peso de cloruro de calcio con respecto al caldo de cultivo o aproximadamente 2,0 a 2,5 g de cloruro de calcio por g de células secas.

- 30 *Retirada celular*

- 35 Las células floculadas fueron fácilmente eliminadas del caldo contenedor de ácido hialurónico bajo condiciones de funcionamiento del equipo normales y flujos con pérdida pequeña de rendimiento por una filtración frontal "nutch". Condiciones de funcionamiento normales. Un control sin cloruro de calcio no consiguió filtrar o clarificar el caldo de cultivo tratado.

- 40 La investigación de los productos filtrados recogidos por GPC-MALLS, digestión enzimática y otros análisis revelaron que el grado de retirada del contaminante de alto peso molecular podría ser controlado por el pH con el grado máximo de retirada estando por debajo de pH 5.5 y a pH > 7.5; siendo pH 8 el valor preferido para el funcionamiento del proceso. El grado de retirada del contaminante de alto peso molecular resultó ser independiente de la temperatura o dilución.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de floculación de una célula de *Bacillus* y/o de retirada de contaminantes de alto peso molecular de un caldo de fermentación, que comprende la adición de una sal bivalente al caldo de fermentación que comprende un glicosaminoglucano de interés tras lo cual la célula de *Bacillus* y/o los contaminantes de alto peso molecular son retirados, donde dicha célula de *Bacillus* produce el glicosaminoglucano de interés.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde el glicosaminoglucano es ácido hialurónico.
3. Método según la reivindicación 1, donde el glicosaminoglucano tiene un peso molecular de 10.000 daltons a 15.000.000 daltons.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, donde la sal bivalente es una sal de calcio y/o una sal de magnesio.
5. Método según la reivindicación 1, donde la sal bivalente se añade a una concentración de 0,1-25 g de sal bivalente por gramo de masa seca de microorganismo.
- 20 6. Método según la reivindicación 1, donde el microorganismo es retirado por filtración.
7. Método según la reivindicación 1, donde el caldo de fermentación es diluido con agua antes, simultáneamente o después de la adición de la sal bivalente.
- 25 8. Método según la reivindicación 7, donde el caldo de fermentación es diluido con 100-500% (p/p) de agua.
9. Método según la reivindicación 8, donde el caldo de fermentación es diluido con 100-400% (p/p) de agua.
10. Método según la reivindicación 1, donde el caldo de fermentación es ajustado a un pH entre 6.5 y 14.
- 30 11. Método según la reivindicación 10, donde el caldo de fermentación es ajustado a un pH entre 7.5 y 8.5.
12. Método según la reivindicación 1, donde el caldo de fermentación es ajustado a un pH inferior a 5.5 tras lo cual los altos contaminantes moleculares son retirados.
- 35 13. Método según la reivindicación 1, donde el caldo de fermentación se calienta a una temperatura entre 30°C y 60°C.
14. Método según la reivindicación 1, donde adicionalmente uno u más agentes floculantes son agregados al caldo de fermentación.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65