



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0610830-0 A2**

(22) Data de Depósito: 21/04/2006
(43) Data da Publicação: 27/07/2010
(RPI 2064)



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

(54) Título: **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS, SUPERPRODUTORAS**

(30) Prioridade Unionista: 25/04/2005 FR 05 04115

(73) Titular(es): SANOFI PASTEUR

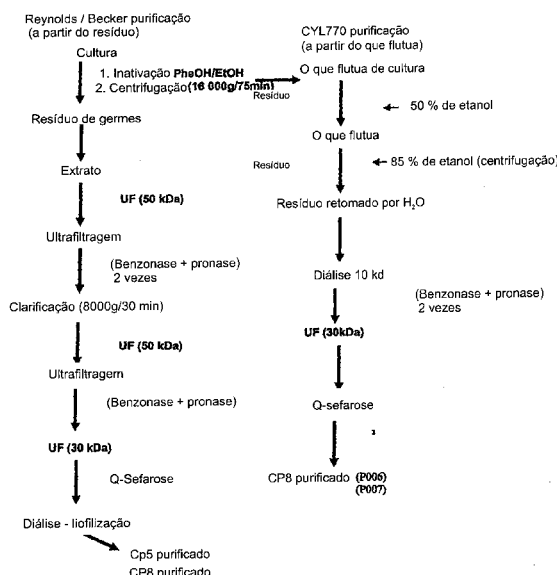
(72) Inventor(es): Bachra Rokbi, Céline Lafont

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT FR2006000880 de 21/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/114500 de 02/11/2006

(57) **Resumo:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS, SUPERPRODUTORAS. A presente invenção refere-se a um processo de produção de uma cepa superprodutora de Staphylococcus Aureus, compreendendo: (a) a cultura de uma cepa de Staphylococcus Aureus, sobre um meio de cultura M1, M2 ou M3 (b) eventualmente a recuperação das cepas assim produzidas a partir do meio de cultura, assim como a utilização dessas cepas para a produção de polissacarídeos.





PI0610830-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUPER-PRODUTORAS**".

5 A presente invenção refere-se a um processo de produção de cepas superprodutoras de *Staphylococcus Aureus* e à respectiva utilização em um processo de produção de polissacarídeos capsulares.

Os polissacarídeos capsulares de *Staphylococcus Aureus*, em particular os polissacarídeos de serótipos 5 e 8, são descritos na literatura como componentes de interesse para a produção de uma vacina, visando a
10 proteger contra as infecções devido a *Staphylococcus Aureus*.

As cepas T5 e T8 são microcápsulas e produzem, portanto, pequenas quantidades de polissacarídeos capsulares de interesse. As quantidades de polissacarídeos capsulares que devem ser incluídos em uma vacina são importantes devido ao sistema imunitário deficiente das populações
15 alvos (vide, por exemplo, Fattom, A., et al (1995) Vaccine 13, 1288-1293).

No âmbito de um desenvolvimento industrial dessa vacina é, portanto, importante poder produzir grandes quantidades de polissacarídeos capsulares T5 e T8.

É nessa óptica que os inventores colocaram em evidência um
20 novo processo que permite aumentar substancialmente a capacidade de secreção de polissacarídeo capsular das cepas de *Staphylococcus Aureus*. Os inventores fornecem, portanto, um processo de produção, permitindo obter polissacarídeo capsular de *Staphylococcus Aureus* em grandes quantidades.

25 De acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção se refere, portanto, a um processo de produção de cepas de *Staphylococcus Aureus* subprodutoras, compreendendo:

(a) a cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M1, compreendendo por litro de meio de cultura:

- 30 . 5 a 100 g de peptona vegetal;
. 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
. 1 a 30 g de açúcar;

. 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 , e FeSO_4 ,

. 1 a 700 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e Mg SO_4 ,

5 . 0,1 a 500 mg de Ca Cl_2 ,

. 0 a 50 mg de Zn Cl_2 ;

. 10 a 250 g de NaCl , de preferência 58,5 g/l, e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5; e

(b) eventualmente a recuperação das cepas a partir do meio de

10 cultura.

De acordo com o modo de realização particular do processo de produção de cepas superprodutoras, o meio de cultura M1 da etapa (a) compreende a peptona de trigo.

De acordo com um modo de realização vantajoso do processo de produção de cepas superprodutoras, o meio de cultura M1 compreende por litro de meio de cultura:

. 30 g de peptona de trigo;

. 5 g de extrato de levedo;

. 1 g de D-glicose H_2O ,

20 . 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O ,

. 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O ,

. 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O ,

. 58,5 g de NaCl ,

. 5 mg de Zn Cl_2 ,

25 . 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

. 6g de NH_4Cl e pH = 6,5.

De acordo com um modo de realização vantajoso, o meio M1 consiste por litro em: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1 g de D-glicose H_2O , 120 mg de FeCl_3 , 6 H_2O , 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O , 58,5 g de NaCl , 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 6 g de NH_4Cl , pH = 6,5.

De acordo com um modo de realização particular o processo de

produção de cepas superprodutoras compreende uma etapa de pré-cultura sobre um meio de pré-cultura M0, compreendendo:

- . 3 a 50 g de peptona vegetal;
- . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
- 5 . 1 a 30 g de açúcar;
- . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 e FeSO_4 ;
- . 1 a 700 mg de sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e MgSO_4 ,
- 10 . 0,1 a 50 mg de CaCl_2 ,
- . 0 a 50 mg de ZnCl_2 ,
- . 2 a 50 g de NaCl, de preferência 6 g/l; e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5.

- De acordo com um modo particular de realização do processo de produção de cepas superprodutoras, a etapa de pré-cultura utiliza um meio de pré-cultura M0, compreendendo por litro 3,87 g de peptona de trigo.

De acordo com um outro modo de realização do processo de produção de cepas superprodutoras, a etapa de pré-cultura utiliza um meio de pré-cultura M0, compreendendo por litro 3,87 g de peptona de trigo.

- 20 De acordo com um outro modo de realização do processo de produção de cepas superprodutoras, a etapa de pré-cultura utiliza um meio de pré-cultura M0 que compreende por litro 30 g de peptona de trigo.

- 25 De acordo com um modo de realização vantajoso do processo de produção de cepas superprodutoras, a etapa de pré-cultura utiliza um meio de pré-cultura M0 gelosado, compreendendo: 3,87 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1 g de D-glicose 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 ágar e pH = 6,5.

- 30 De acordo com um outro modo de realização vantajoso do processo de produção de cepas superprodutoras, a etapa de pré-cultura utiliza um meio de pré-cultura M0 líquido, compreendendo: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1 g de D-glicose 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 Na Cl, 5 mg de Zn Cl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g de NH_4Cl , e pH = 6,5.

De acordo com um modo de realização, o processo tal como definido acima é um processo de produção de cepas superprodutoras de *Staphylococcus Aureus* T5.

De acordo com um outro modo de realização o processo tal como definido acima é um processo de produção de cepas superprodutoras de *Staphylococcus Aureus* T8.

A presente invenção se refere também a uma cepa superprodutora obtida pelo processo, tal como definido acima e a utilização dessa cepa para a produção de polissacarídeo capsular. A presente invenção se refere, portanto, em particular uma cepa Reynolds superprodutora, uma cepa Becker superprodutora e uma cepa CYL770 superprodutora obtidas pelo processo tal como descrito acima.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção fornece, portanto, um processo de produção de polissacarídeos capsulares, compreendendo:

- (a) a cultura de uma cepa *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M1, tal como definido acima;
- (b) a inativação da cultura assim produzida; e
- (c) a recuperação dos polissacarídeos capsulares.

De acordo com um modo de realização do processo de produção de polissacarídeos capsulares a etapa de cultura utiliza um meio de cultura M1, compreendendo a peptona de trigo.

De acordo com um modo de realização, o processo de produção de polissacarídeo capsular compreende uma etapa de pré-cultura, tal como definida acima em relação com o processo de produção de cepas superprodutoras.

A presente invenção tem também por objeto um meio M0 adaptado à cultura de *Staphylococcus Aureus* compreendendo:

- . 3 a 50 g de peptona vegetal;
- . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;

- . 1 a 30 g de açúcar;
 - . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 e FeSO_4 ,
 - . 1 a 700 mg de sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e MgSO_4 ,
 - . 0,1 a 50 mg de CaCl_2 ,
 - . 0 a 50 mg de ZnCl_2 ,
 - . 2 a 50 g de NaCl , de preferência 6 g/l; e
- cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5, e se refere, de preferência, a um meio M0 gelosado ou líquido, compreendendo por litro e vantajosamente consistindo em: 3,87 g ou 30 g de peptona de trigo e 5 g de extrato de levedo, 1 g de D-glicose H_2O , 120 mg de FeCl_3 , 6 H_2O , 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O , 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 e pH = 6,5.
- A presente invenção tem também por objeto um meio de cultura M1 adaptado à superprodução de polissacarídio capsular de *Staphylococcus Aureus*, compreendendo:
- . 5 a 100 g de peptona vegetal;
 - . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
 - . 1 a 30 g de açúcar;
 - . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 e FeSO_4 ,
 - . 1 a 700 mg de um sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e MgSO_4 ;
 - . 0,1 a 500 mg de CaCl_2 ;
 - . 0 a 50 mg de ZnCl_2 ;
 - . 10 a 250 g de NaCl , de preferência 58,5 g/l que vai de 6,2 a 7,5, e
- de preferência se refere a um meio de cultura M1, compreendendo por litro e vantajosamente consistindo em: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1 g de D-glicose H_2O , 120 mg de FeCl_3 , 6 H_2O , 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O , 58,5 g de NaCl , 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de

(NH₄)Cl e pH = 6,5.

Os inventores colocaram em evidência que o meio M1, tal como definido acima, podia ser vantajosamente substituído por um meio simplificado M2. A presente invenção se refere, portanto, também a um processo de produção de cepas de *Staphylococcus Aureus* Superprodutores e a um processo de produção de polissacarídios capsulares, tais como definidos acima, nos quais o meio M1 é substituído por um meio M2, tal como definido abaixo.

A presente invenção tem também por objeto um meio de cultura M2, compreendendo por litro de meio de cultura:

. 52,5 a 100 g de peptona vegetal, vantajosamente peptona de trigo;

. 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g em particular 41 g/l de NaCl;

. 0 a 15 g/l de um sal de magnésio, vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular 15 g/l de MgCl₂, 6H₂O e

. 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l, em particular 0,25 g/l de D-glicose H₂O,

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores de 6,3 a 6,7, vantajosamente de 6,4 a 6,6.

De acordo com um modo de realização particular, o meio de cultura M2 compreende, e vantajosamente consiste em 93 g/l de peptona de trigo, 41 g/l de NaCl, 0,25 g/l de D-glicose H₂O e 15 g/l de MgCl₂, 6H₂O, cujo pH está na faixa de valores de 6,3 a 6,7.

Os inventores colocaram também em evidência que um meio de cultura M3, correspondendo a um meio M2, no qual a peptona vegetal é substituída por 65 a 85 g/l, vantajosamente 75 g/l de extrato de levedo podia ser utilizada. A presente invenção se refere, portanto, também a um processo de produção de cepas de *Staphylococcus Aureus* superprodutoras e a um processo de produção de polissacarídios capsulares, tais como definidos acima, nos quais o meio M1 é substituído por um meio M3, tal como definido abaixo.

A presente invenção tem, portanto, também por objeto um meio de cultura M3, compreendendo por litro de meio de cultura:

. 65 a 85 g de extrato de levedo, vantajosamente 75 g/l de extrato de levedo;

5 . 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5g a 82,5 g em particular 41 g/l de NaCl;

. 0 a 15 g/l de um sal de magnésio, vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular 15 g/l de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; e

10 . 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l, em particular 0,25 g/l de D-glicose, H_2O ,

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7.

A presente invenção vai ser descrita mais detalhadamente na descrição que se segue por Referência: à figura 1, dando uma representação do protocolo de recuperação dos polissacarídeos.

15 Os inventores colocaram em evidência, de forma surpreendente que os meios de cultura M1, M2 e M3 induzem um aumento substancial da capacidade de secreção de polissacarídeo capsular das cepas de *Staphylococcus Aureus*. Esse aumento pode ser colocado em evidência por medida da quantidade de polissacarídeo capsular produzida pelo métodos ELISA, tal
20 como descrita no exemplo 2.4 abaixo. Essas cepas de *Staphylococcus Aureus* que apresentam uma capacidade de secreção aumentada são denominados no âmbito da presente invenção cepas superprotetoras.

Entende-se, portanto, no âmbito da presente invenção por "cepas superprodutoras" uma cepa de *Staphylococcus Aureus* que, após cultura sobre um meio M1 ou M2 ou M3 produz uma quantidade de polissacarídeo capsular em mg/l, tal como determinada pelo métodos ELISA descrito no
25 exemplo 2.4, pelo menos 3 vezes, de preferência 5 vezes e vantajosamente 10 vezes superior, àquela produzida por cultura da mesma cepa de partida sobre por meio de Poutrel (vide Poutrel, B et al. (1995). Clin Diagn Lab Immunol 2, 166-171 para um descritivo do meio ou o exemplo 1.1 abaixo) nas
30 mesmas condições de cultura.

No caso de uma cepa recombinante, entende-se por "cepas su-

perprodutoras" uma cepa de *Staphylococcus Aureus* recombinante que, após cultura sobre um meio de cultura M1 ou M2 ou M3 produz uma quantidade de polissacarídio capsular em mg/l, tal como determinada pelo método ELISA descrito no exemplo 2.4, pelo menos 2 vezes superior, àquele produzido pela cultura da mesma cepa de partida sobre o meio TSB (vide exemplo 5 1.5 para um descritivo do meio) nas mesmas condições de cultura.

Os inventores colocaram em evidência, de forma surpreendente, que o processo de produção de cepas superprotetoras era aplicável às cepas de *Staphylococcus Aureus* T5 e às cepas T8. Os inventores também observaram que o processo, de acordo com a invenção, era também aplicável às cepas recombinantes que foram modificadas geneticamente para superproduzir seu polissacarídios capsular. Os inventores demonstraram esse aspecto, aplicando-se o processo, de acordo com a invenção, à cepa C-YL770 geneticamente modificada para produzir polissacarídio capsular T8 10 em grandes quantidades. A cepa após cultura sobre meio M1 ou M2 ou M3 vê sua capacidade de secreção em polissacarídio capsular T8 aumentar de um fator 2, conforme descrito nos exemplos abaixo.

Entende-se, portanto, no âmbito da presente invenção por "cepas de *Staphylococcus Aureus*" qualquer que expressa uma cápsula ou microcápsula, compreendendo um polissacarídio de serotipo T5 e/ou T8. Podem-se citar, a título de exemplo não limitativo de cepas propriadas, as cepas Newman (T5), Reynolds (T5), Lowenstein (T5), Becker (T8), Wright (T8) e CYL 770 (T8) e CYL1892 (T5). 20

Essas cepas são disponíveis junto a diversos institutos ou em diversas coleções, pode-se em particular citar a coleção do Institut Pasteur (CIP): Reynolds CIP 103313 , Cecker CIP103314, ou ATCC: Wright ATC 9525, Loweinstein ATCC 49521. No âmbito da presente invenção utilizam-se, de preferência, as cepas CYL770 (T8) e Reynolds (T5). A cepa CYL770 é uma cepa Becker modificada geneticamente para produzir maiores quantidades de polissacarídio capsular T8. Essa cepa pode ser vantajosamente utilizada como cepa de partida no processo de produção de cepas superprodutoras, de acordo com a invenção, assim como no processo de produção 25 30

do polissacarídeo, de acordo com a invenção. Um descritivo da cepa CYL770 é dado no artigo de Luong, T.T e Lee, C.Y (2002), Infect. Immun. 70: 3389-3395. A cepa CY1892 designa a cepa de *S. aureus* recombinante, obtida a partir de uma cepa Reynolds (CIP 103313) na qual o promotor do operon

5 cap 5 foi substituído pelo promotor constitutivo forte do operon cap1 da cepa M de *S. aureus*, segundo o processo descrito por Luong et Lee (2002 Infect. Immun. 70: 3389-3395) com as seguintes modificações: as seqüências homólogas foram substituídas por seqüências equivalentes homólogas da cepa Reynolds, o plasmídeo pCL52.2 foi substituído pelo plasmídeo pCL10, con-

10 tendo uma origem de replicação tremossensível e compreendendo um marcador cat (cloranfenicol acetil transferase, conferindo uma resistência ao cloranfenicol). Em resumo, um fragmento de ADN de aproximadamente 1 kb, contendo o ORF cap5 da cepa Reynolds fundido em um fragmento de aproximadamente 250-bp, contendo o Pcap 1 promotor é construído pela técnica

15 de PCR por sobreposição. Um fragmento de ADN de aproximadamente 1kb, contendo a seqüência a montante do gene cap5A é amplificado por pCR a partir do genoma da cepa Reynolds. Os dois fragmentos são em seguida clonados no plasmídeo pCL10 portando uma origem de réplica sensível à temperatura e comportando um marcador cat, de modo que o promotor

20 Pcap5 seja substituído pelo promotor pCap1. O plasmídeo assim construído é em seguida eletroportado em uma cepa RN4220, depois introduzido por transdução como auxílio do bacteriófago 52 na cepa Reynolds. A sensibilidade da origem de replicação à temperatura do plasmídeo permite em seguida favorecer a recombinação homóloga, bloqueando sua replicação, aplicando uma seleção pelo cloranfenicol.

25

Entende-se por "polissacarídeo capsular" no âmbito da presente invenção os polissacarídeos capsulares T5 e/ou T8 das cepas de *Staphylococcus Aureus*, assim como os fragmentos que daí derivam.

Entende-se por "meio de cultura" no âmbito da presente inven-

30 ção um meio isento de proteína de origem animal.

Por "proteína de origem animal", são entendidas as proteínas obtidas a partir de matéria de origem animal, assim, como qualquer produto

derivado, tais como os derivados oriundos do tratamento químico das proteínas animais. São entendidos também os produtos da hidrólise parcial ou total dessas proteínas animais, tais como peptonas, os polipeptídeos, os peptídeos ou os ácidos aminados que deles derivam.

5 O processo de produção de uma cepa superprodutora, de acordo com a invenção, compreende (a) uma etapa de cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus*. Segundo um modo de realização, a etapa de cultura utiliza um meio de cultura M1 que compreende:

- . 5 a 100 g de peptona vegetal;
- 10 . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
- . 1 a 30 g de açúcar;
- . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 , e FeSO_4 ,
- . 1 a 700 mg de um sal de magnésio selecionado no grupo que
- 15 consiste em MgCl_3 e MgSO_4 ,
- . 0,1 a 50 mg de CaCl_2 ,
- . 0 a 50 mg de ZnCl_2 ,
- . 10 a 250 g de NaCl , de preferência 58,5 g/l e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5.

20 A fonte de nitrogênio protéico no meio M1 utilizado é fornecida principalmente por uma peptona vegetal.

Entende-se por peptona vegetal" no âmbito da presente invenção as peptonas selecionadas no grupo que consiste em: peptona de trigo e peptona de ervilha. As peptonas vegetais são geralmente sob a forma de

25 hidrolisados obtidos por tratamento enzimático ou químico das proteínas extraídas geralmente das partes da planta que contêm os mais fortes teores em proteínas, tais como o germe de trigo, por exemplo. São utilizadas, de preferência, plantas que não foram modificadas geneticamente. No caso dos tratamentos químicos, o extrato protéico é submetido à ação do ácido clorídrico a quente sob pressão. O hidrolisado é em seguida neutralizado pela

30 soda, depois livre dos subprodutos sólidos. No caso dos tratamentos enzimáticos, o extrato protéico é digerido habitualmente pela papaína. As pepto-

nas obtidas são constituídas principalmente de uma mistura de ácidos aminados, e pequenos peptídeos, cujo PM é ≤ 1 KD. Os peptídeos, cujo PM é > 1 KD representam menos de 30% da mistura. Os preparados comerciais referenciados com os nomes (Hy-Pea 7404 de Quest ref 5710565, Petona de trigo E1 de Organotecnica ref. 19559) são exemplos de hidrolisados de peptonas vegetais utilizáveis no âmbito da presente invenção. A concentração de peptona vegetal utilizada no meio M1 é selecionado, considerando-se o teor em nitrogênio protéico da peptona e considerando-se a concentração em extrato de levedo. Esse teor é calculado pelo método de Kjeldahl. Para maiores detalhes, pode-se fazer referência, por exemplo, ao artigo de Lynch J.M. et al, J. AOAC Int. (1999) 82 (6): 1389-98. Habitualmente, os teores em nitrogênio protéico das peptonas vegetais selecionadas estão compreendidos entre 8% e 15% ((peso/peso)). Nessa faixa de valores, a concentração em peptona vegetal utilizável é de 5 a 100 g por litro de meio de cultura, de preferência de 20 a 50 g/l e, em particular, 30 g/l.

A fonte de nitrogênio protéico no meio M1 utilizado é fornecida também pelo extrato de levedo. Os teores em nitrogênio protéico nos extratos de levedo são geralmente de 9 a 13% (peso/peso). O extrato de levedo é utilizado a uma concentração de 0,5 a 20 g/l de meio de cultura, e, em particular, a uma concentração de 5 g/l. O nitrogênio protéico do meio de cultura pode também ser fornecido sob a forma de sais minerais, podem-se citar a título de exemplo os sais de amônio, tais como o cloreto ou sulfato. Esses sais minerais podem ser utilizados a concentrações que deverão ser ajustadas em função dos fornecimentos pelas outras fontes de nitrogênio.

As concentrações em fontes de nitrogênio protéico são ajustadas de tal modo que o teor em nitrogênio protéico total não leva a um hiper-catabolismo nitrogenado, podendo ser responsável pelo acúmulo de dejetos tóxicos no decorrer da cultura. Por outro lado, para evitar o aparecimento de um efeito inibidor substancial de um excesso de vitaminas fornecidas pelo extrato de levedo, este é utilizado apenas como fonte secundária de nitrogênio protéico e, de preferência, a uma concentração de 5 g/l.

De acordo com um modo de realização vantajoso, o meio de

cultura M1 compreende por litro de meio 30 g de peptona, de preferência de peptona de trigo e 5 g de extrato de levedo.

O meio de cultura compreende também uma fonte de açúcar.

Entende-se por "fonte de açúcar" no âmbito da presente invenção, qualquer fonte de açúcar de origem não animal, metabolizável pela bactéria, tal como a frutose, ribose, xilose, fucose ou glicose. Concentrações da ordem de 1 a 30 g/litro de meio de cultura podem ser utilizadas. Para a glicose, por exemplo, uma concentração de 1 g/l é vantajosamente utilizada.

O meio de cultura M1 compreende também sais minerais e, em particular, pelo menos sais, de preferência cloretos, de ferro, de magnésio, de cálcio, de zinco e de sódio nas seguintes quantidades:

- de 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 , e FeSO_4 , e em particular 120 mg de FeCl_3 , por litro de meio de cultura;

- de 1 a 700 mg de um sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e MgSO_4 e em particular 400 mg de MgCl_2 , por litro de meio de cultura;

- de 0,5 a 50 mg de CaCl_2 , e, em particular, 10 mg de CaCl_2 , por litro de meio de cultura;

- de 0 a 50 mg de ZnCl_2 e em particular 5 mg de ZnCl_2 por litro de meio de cultura; e

- de 10 a 250 g de NaCl , de preferência 58,5 g por litro de meio de cultura.

Os sais minerais de Fe, Ca e Mg são classicamente utilizados sob a forma hidratada. No âmbito da presente invenção os seguintes sais hidratados foram utilizados nos meios de cultura: $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

O meio M1 apresenta um pH inicial compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5, de preferência um pH de 6,5, para isto qualquer sal mineral classicamente utilizado por seu poder tampão e permitindo obter um pH na faixa de valor indicada acima pode ser utilizado, se necessário. Para a determinação do pH, a medida do pH é feita com o auxílio de um

pH - metro à temperatura ambiente.

O meio M1 pode também compreender agentes que regulam a pressão osmótica, tal como glicerofosfato e/ou glicina-betaína a concentrações de 1 a 10 mM para a glicina betaína e 50 a 100 mM para o glicerofosfato, que pode ser vantajoso acrescentar, quando a concentração em NaCl é superior a 1 M (58 g/l).

O meio de cultura M1 utilizado corresponde, de preferência, a um meio líquido. Pode, todavia, se apresentar sob a forma sólido. A forma sólida ou gelosada é obtida por adição ao meio líquido de uma substância gelificante, habitualmente o ágar a uma concentração de 10 a 30 g por litro de meio de cultura.

De acordo com um modo de realização vantajoso o meio de cultura M1 compreende, e, de preferência, consiste em , por litro, 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1 g de D-glicose H_2O , 120 mg de $FeCl_3$, 6 H_2O , 400 mg de $MgCl_2$, 6 H_2O , 10 mg de $CaCl_2$, 2 H_2O , 58,5 g de NaCl, 5 mg de $ZnCl_2$, 6,8 g de $(NH_4)_2SO_4$ e 6 g de NH_4Cl e apresenta um pH de 6,5.

A etapa de cultura pode ser realizada por inseminação do meio M1 com um inoculum, por exemplo com um CO680 nm inicial de 0,2, e incubação a 37°C durante um período, por exemplo, de aproximadamente 48 a 72 horas em uma atmosfera contendo ou não CO_2 a uma concentração de 5 a 10% (para o tipo 5 sem CO_2 e no caso da utilização da cepa Becker com CO_2). O volume de cultura pode variar em função das necessidades. Volumes de 400 ml a 20 l ou volumes superiores, por exemplo, de 30 l a 100 l podem ser utilizados. De preferência, uma relação volume do meio de cultura em relação ao volume do recipiente de cultura de 20% (V/V) é mantida. Para os grandes volumes, a oxigenação é controlada e regulada durante a cultura por um ajuste da pressão em oxigênio e uma agitação apropriada.

Em função das necessidades, a etapa de cultura pode compreender culturas sucessivas em volumes crescentes, a fim de aumentar a biomassa e a quantidade de polissacarídeos produzidos.

De acordo com um modo de realização vantajoso, o processo de

produção de cepas superprodutoras compreende uma etapa de pré-cultura sobre um meio de pré-cultura M0, compreendendo por litro:

- . 1 a 30 g de peptona vegetal;
- . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
- 5 . 1 a 30 g de açúcar,
- . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste me FeCl_3 e FeSO_4 ;
- . 1 a 700 mg de um sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e MgSO_4 ;
- 10 . 0,1 a 50 mg de CaCl_2 ,
- . 0, 1 a 50 mg de ZnCl_2 ;
- . 0 a 50 g de NaCl, de preferência 6 g/l; e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vão de 6,2 a 7,5.

- Para as definições dos diferentes componentes, pode-se repor-
- 15 tar às definições dadas acima em relação com o meio de cultura M1.

Ao contrário, no âmbito da etapa de pré-cultura, utilizam-se, de preferência, 3,87 g ou 30 g de peptona, em particular de trigo por litro de meio de pré-cultura. A concentração em NaCl no meio M0 é, de preferência, de 6 g por litro. O meio de pré-cultura M0 na etapa de pré-cultura é, de preferência, seja um meio gelosado, compreendendo 3,87 g de peptona de trigo

20 por litro seja um meio líquido, compreendendo 30 g de peptona de trigo por litro.

De acordo com um modo de realização vantajoso, a etapa de pré-cultura é utilizada por cultura da cepa sobre um meio de pré-cultura M0

25 compreendendo e, de preferência, consistindo em, por litro, 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1 g de D-glicose H_2O , 120 mg de FeCl_3 , 6 H_2O , 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O , 6 g de NaCl, 5 mg de ZnCl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 6 g de NH_4Cl e pH de 6,5.

De acordo com um outro modo de realização vantajoso, a etapa

30 de pré-cultura é utilizada por cultura da cepa sobre um meio de pré-cultura M0 líquido ou gelosado e que compreende e, de preferência, consiste em 3,87 de peptona de trigo ou 30 g/L para o meio M0 líquido, 5 g de extrato de

levedo, 1 g de D-glicose H_2O , 120 mg de $FeCl_3$, 6 H_2O , 400 mg de $MgCl_2$, 6 H_2O , 10 mg de $CaCl_2$, 2 H_2O , 6 g de NaCl, 5 mg de $ZnCl_2$, 6,8 g de $(NH_4)_2SO_4$ e 6 g de NH_4Cl , pH = 6,5.

A etapa de pré-cultura permite uma amplificação do inoculum.

- 5 Ela pode ser realizada por inseminação do meio de pré-cultura M0 com uma cepa de *Staphylococcus Aureus* por exemplo à razão de 1.10^7 CFU e incubação a 37°C durante um período que pode variar , por exemplo, de 5 a 20 horas, em uma atmosfera que contém ou não de 5 a 10% em volume de CO_2 (sem CO_2 para o T5 e em presença de CO_2 no caso da utilização da
- 10 cepa Becker). A etapa de pré-cultura pode a fim de aumentar a biomassa compreender pré-culturas sucessivas em volumes crescentes de meio M0. A pré-cultura serve em seguida para inseminar o meio líquido M1. Para isto, pode-se utilizar uma quantidade de inoculum tal que DO680 nm inicial seja de 0,2. O volume de cultura na etapa de pré-cultura pode variar classicamente de 400 ml a 20 l. De preferência, mantém-se uma relação volume do
- 15 meio de pré-cultura em relação ao volume do recipiente inferior ou igual a 20%.

- Após a etapa de cultura, as cepas assim produzidas podem ser recuperadas por centrifugação e conservadas sob a forma de liofilizados ou
- 20 de congelados após adição de glicerol 20% ou ser utilizadas diretamente para inseminar um maior volume de meio de cultura, ou ainda ser utilizadas diretamente no processo de produção de polissacarídeo capsular, segundo a presente invenção.

- De acordo com um modo de realização vantajoso, o processo de
- 25 produção tal como definido acima corresponde a um processo de produção de uma cepa Reynolds superprodutora.

De acordo com um outro modo de realização vantajoso, o processo de produção tal como definido acima corresponde a um processo de produção de uma cepa CTYL770 superprodutora.

- 30 A presente invenção se refere também às cepas superprodutoras de *Staphylococcus aureus*, em particular as cepas Reynolds, Becker et CYL770, produzidas pelo processo, tal como definido acima.

Os inventores realizaram um plano de experiência que mostra que o meio de cultura M1 pode ser simplificado e substituído no âmbito do processo, segundo a presente invenção por um meio M2, tal como definido abaixo.

5 De acordo com um outro modo de realização, a etapa (a) utiliza, portanto, um meio de cultura M2, compreendendo por litro de meio de cultura:

. 52,5 a 100 g de peptona vegetal, vantajosamente peptona de trigo;

10 . 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g em particular 41 g/l de NaCl;

. 0 a 15 g/l de um sal de magnésio, vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular 15 g/l de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e

15 . 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l, em particular 0,25 g/l de D-glicose H_2O , cujo pH está compreendido em uma faixa de valores de 6,3 a 6,7.

Para a definição dos termos utilizados, serão feitas referências às definições dadas acima em relação com o meio de cultura M1.

20 Os resultados do plano de experiência mostram que não é necessário acrescentar açúcar ao meio de cultura M2, quando a peptona vegetal continha um teor em açúcares total de pelo menos 5%. Esta pode compreender uma mistura de açúcares, tais como: frutuose, glicose, manotriose, rafinose, sacarose, estaquiose). Se esse não for o caso, será então necessário acrescentar ao meio de cultura uma outra fonte de açúcar. O açúcar
25 pode então ser acrescentado à razão de 0,25 g/l a 7 g/l.

De acordo com um modo de realização vantajoso, o meio de cultura M2 compreende 0,25 g/l de açúcar, em particular de D-glicose, H_2O .

O meio de cultura M2 pode vantajosamente conter um sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e MgSO_4 . Os inventores colocaram em evidência que a adição de um sal de magnésio permite aumentar a robustez do meio de cultura (as faixas de variação dos
30 constituintes são sensivelmente mais estreitos em presença de MgCl_2). O

cloreto de magnésio, em particular MgCl_2 , 6 H_2O , pode, portanto, ser acrescentado vantajosamente ao meio M2 em uma faixa de 0,01 g/l a 15 g/l de meio de cultura. A melhor robustez é observada quando o meio M2 contém 15 g/l de MgCl_2 , 6 H_2O . Concentrações superiores em sal de magnésio, não acarretando um aumento suplementar da robustez.

Os inventores colocaram, também em evidência que a produtividade melhorada em polissacarídeos é observada com o meio M2 em uma ampla faixa de concentração que vai de 5 g/l a 100 g/l, vantajosamente de 5 g/l a 82,5 g/l de meio de cultura.

O plano de experiência tem, por outro lado, permitido que haja uma forte interação entre a concentração em peptona e a concentração em NaCl. Faixas de concentrações que podem ser utilizadas no âmbito dos processos, segundo a presente invenção, puderam assim ser definidas.

De acordo com um modo de realização particularmente vantajoso, o meio M2 tal como definido acima compreende 52,5 a 70 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de trigo; e

5 a 37 g de NaCl.

De acordo com um outro modo de realização particularmente vantajoso, o meio M2 tal como definido acima compreende 66 a 82,5 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de trigo, e 22 a 74 g de NaCl.

De acordo com um outro modo de realização particularmente vantajoso, o meio M2 tal como definido acima compreende 60 a 90,5 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de trigo, e 35 a 63,5 g de NaCl.

De acordo com um outro modo de realização particularmente vantajoso, o meio M2 tal como definido acima compreende 79 a 95 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptídeo de trigo e 46 a 82,5 g de NaCl.

Os meios M2, segundos esses 4 modos de realização podem vantajosamente conter 0,25 g/l de glicose, em particular D-glicose e 15 g/l de MgCl_2 , 6 H_2O .

O meio de cultura M2 pode vantajosamente conter um sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e Mg SO_4 . Os inventores colocaram em evidência que a adição de um sal de magnésio per-

mite aumentar a robustez do meio de cultura (as faixas de variação dos constituintes são sensivelmente mais estreitas em presença de MgCl_2). O cloreto de magnésio, em particular $\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$, pode, portanto, ser acrescentado vantajosamente ao meio M2 em uma faixa de 0,01 g/l a 15 g/l de meio de cultura. A melhor robustez é observada quando o meio M2 contém 15 g/l de $\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$. Concentrações superiores em sal de magnésio não acarretam um aumento suplementar da robustez.

Os inventores colocaram também em evidência que a produtividade melhorada em polissacarídios é observada com o meio M2 em uma ampla faixa de concentrações de NaCl. Com efeito, o NaCl pode seja estar ausente, seja ser utilizado em uma faixa de concentração que vai de 5 g/l a 100 g/l, vantajosamente de 5g/l a 82,5 g/l de meio de cultura.

O plano de experiência permitiu, por outro lado, mostrar que haja uma forte interação entre a concentração em peptona e a concentração em NaCl. Faixas de concentrações que podem ser vantajosamente utilizadas no âmbito dos processos, segundo a presente invenção puderam assim ser definidas.

De acordo com um modo de realização particularmente vantajoso, o meio M2, tal como definido acima compreende 52,5 a 70 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de trigo; e 5 a 37 g de NaCl.

De acordo com um outro modo realização particularmente vantajoso, o meio M2 tal como definido acima compreende 66 a 82,5 g de peptona vegetal, vantajosamente da peptona de trigo, e 22 a 74 g de NaCl.

De acordo com um outro modo de realização particularmente vantajoso, o meio M2 tal como definido acima compreende 60 a 90,5 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de trigo, e 35 a 63,5 g de NaCl.

De acordo com um outro modo de realização particularmente vantajoso, o meio M2 tal como definido acima compreende 79 a 95 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de trigo, e 46 a 82,5 g de NaCl.

Os meios M2, segundo esses 4 modos de realização podem vantajosamente conter 0,25 g/l de glicose, em particular D-glicose e 15 g/l de $\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$.

De acordo com um modo de realização particular, o meio de cultura M2 compreende e vantajosamente consiste em 93 g/l de peptona de trigo, 41 g/l de NaCl, 0,25 g/l de D-glicose, H₂O, e 15g/l de MgCl₂, 6 H₂O, cujo pH está em uma faixa de valores de 6,3 a 6,7. Esse meio leva, por exemplo, a um rendimento de 40 mg/l de polissacarídio T5 a partir de uma cepa Reynolds.

Os inventores mostraram também por um plano de experiência que um meio M2, tal como definido acima, no qual a peptona vegetal é substituída por 65 a 85 g, vantajosamente 75 g/l de extrato de levedo podia ser utilizado nos processos, segundo a presente invenção. Esse meio é denominado meio de cultura M3. O meio de cultura M3, segundo a presente invenção compreende, portanto, por litros de meio de cultura:

. 65 g/l a 80 g/l de extrato de levedo, vantajosamente 75 g/l de extrato de levedo;

. 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl;

. 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl;

. 0 a 15 g/l de um sal de magnésio, vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular 15 g/l de MgCl₂, 6 H₂O; e

. 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l, em particular 0,25 g/l de D-glicose H₂O,

. cujo pH está compreendido em uma faixa que vai de 6,3 a 6,7.

Experiências suplementares mostraram que a faixa de peptona vegetal (tal como definida acima) podia ser estendida até um valor de 200 g/l de meio de cultura. Os meios M2 e M3, tais como definidos acima, contendo uma peptona vegetal à razão de 52,5 a 200 g/l são, portanto, incluídos no âmbito da presente invenção.

A presente invenção se refere, portanto, também às cepas superprodutoras de *Staphylococcus Aureus*, em particular as cepas Reynolds, Becker e CYL770, CYL1892 produzidas pelo processo que utiliza o meio de cultura M2 ou M3, tal como definido acima.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção se refere, portanto, a um processo de produção de polissacarídios capsular, compreendendo:

(a) a cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* tal como
5 definida acima sobre um meio de cultura M1 ou M2 ou M3, tal como definido acima,

(b) a inativação da cultura assim produzida; e

(c) a recuperação do polissacarídio capsular.

A etapa (a) de cultura do processo de produção de polissacarí-
10 dios capsular pode ser realizada nas mesmas condições que aquelas descritas acima em relação com a etapa (a) do processo de produção de cepas superprodutoras e pode também ser precedida de uma etapa de pré-cultura, tal como descrita acima.

A cultura resultante da etapa (a) é em seguida submetida a uma
15 etapa de inativação.

A etapa de inativação pode ser utilizada por tratamento da cultura com uma mistura fenol/etanol (V/V) à razão de 2% em volume ao final, depois agitação por exemplo com o auxílio imantado à temperatura ambiente durante 6 horas a 48 horas em função da biomassa a tratar. A inativação é
20 controlada por um teste de mortalidade. Para isso, 100 microlitros da cultura tratada são inseminados em mingau tripticase soja adicionado de 1/30 de soro de cavalo. As culturas são incubadas durante 48 H a 37°C em posição estática, os bujões de frascos de mingau permanecendo desaparafusados. A inativação das culturas pode ser controlada por um método que compreende
25 uma etapa de amplificação em meio TSB (sem acréscimo de soro) sob agitação a 37°C durante 16 a 18 horas, depois uma caixa de pétri de gelose Columbia 2% NaCl é inseminada com 150 µL de cultura assim amplificada. A caixa é ela própria colocada a 37°C durante 16 a 18 horas, depois observada. Uma ausência de colônias prova da inativação conseguida da cultura
30 tratada. A ausência de bactérias confiáveis se traduz por uma ausência de impulso após 24 de incubação a 37°C. Uma vez que a mortalidade da cultura é estabelecida, recupera-se o polissacarídios capsular. A etapa de recu-

peração compreende uma extração do polissacarídeo a partir das células. Diferentes técnicas de extração foram descritas na literatura e podem ser aplicadas no âmbito da presente invenção. Pode-se fazer referência, por exemplo, aos artigos de Lee J.C. Infect. Immun. 1993; 67: 1853-1858; 5 Dassy B. et al J. Gen. Microbiol. 1991; 137: 1155 - 1162. Um método de extração por autocavagem a 121°C é ilustrada no exemplo 2.3. Uma técnica de extração utilizando a lisostafina é descrita no exemplo 2.5.

No caso da cepa CYL 770, a maior parte do polissacarídeo é secretada no que flutua de cultura e pode, portanto, ser recuperada diretamente a partir deste. Para isto ao final da cultura, o meio é centrifugado e o resí- 10 duo celular é eliminado.

O polissacarídeo capsular resultante pode em seguida se necessário ser purificado. Diferentes técnicas de purificação foram descritas na literatura e podem ser aplicadas no âmbito da presente invenção . Pode-se 15 fazer referência, por exemplo, aos artigos de Lee J.C. et al 1987; 55: 2191-2197; Fattom A. et al Infect. Immun. 1990; 58: 2367-2374. Um técnica de purificação é ilustrada no exemplo 2.5.

A análise da composição molar em monossacarídeo e a análise por RMN do próton a 500 MHz mostram que se obtém um polissacarídeo, 20 cuja estrutura está de acordo com aquela descrita na literatura com uma taxa de O-acetilação superior a 70% e uma taxa de pureza de pelo menos 70%. Os residuais estão presentes no produto final à razão de aproximadamente 0,5 a 3% (p/p) de residuais de natureza protéica e menos de 0,1% (p/p) de ácidos nucleicos residuais e menos de 5% (p/p) de ácido lipotecóico e de ácido tecóico residuais. 25

A quantidade de polissacarídeo capsular obtida pode ser avaliada pela técnica ELISA, tal como descrita no exemplo 2.4.

O processo de produção de PS, segundo a invenção, pode, portanto, ser utilizado vantajosamente para produzir polissacarídeo T5, de preferência a partir de uma cepa Reynold, tal como CIP 103313 e polissacarídeo 30 T8, de preferência a partir da cepa CYL770.

Segundo um outro aspecto, a presente invenção se refere, por-

tanto, a um meio M0, tal como definido acima adaptado à cultura de *Staphylococcus Aureus*.

Entende-se no âmbito da presente invenção por "meio adaptado à cultura de *Staphylococcus Aureus*" um meio que permite obter, por um lado, um aumento da biomassa de um fator de pelo menos 10, tal como determinada pela medida da densidade óptica a 680 nm e, por outro lado, uma confiabilidade tal como a relação DO/CFU, seja de pelo menos 1 Unidade de DO = 10^8 CFU/ml. Para determinar essa relação DO/CFU, a suspensão bacteriana cuja densidade óptica foi medida com o auxílio de um espectrofotômetro é diluída em um tampão PBS, utilizando diluições de razão 10. O número de CFU contidas nessas diluições é avaliado após inseminação destas sobre uma caixa de Pétri, contendo um meio nutritivo (tal como a gelose Colombia). Após incubação 24 horas a 37°C, as bactérias confiáveis são computadas e a correspondência entre o número de bactérias confiáveis expressa em Unidade que formam colônias (CFU) e a densidade óptica (DO) pode assim ser estabelecida.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção se refere também aos meios de cultura M1, M2 e M3, tais como definidos acima adaptados à superprodução de polissacarídeo capsular de *Staphylococcus Aureus*.

Entende-se no âmbito da presente invenção por "meio adaptado à superprodução de polissacarídeo capsular" um meio que leva a um aumento da capacidade de secreção em polissacarídeo capsular de uma cepa *Staphylococcus Aureus* que se traduz por uma produção de polissacarídeo capsular, tal como determinada por um teste ELISA, tal como definido no exemplo 2.4 pelo menos 3 vezes, de preferência pelo menos 5 vezes e, em particular, pelo menos 10 vezes superior àquela produzida pela cultura da mesma cepa de partida nas mesmas condições de cultura, mas sobre o meio de Poutrel.

No caso das cepas recombinantes, considera-se que o meio é adaptado à superprodução de polissacarídeo capsular, se conduzir a um aumento da capacidade de secreção em polissacarídeo capsular de uma cepa

de *Staphylococcus Aureus* recombinante que se traduz por uma produção de polissacarídeo capsular, tal como determinada por um teste ELISA, tal como definido no exemplo 2.4, pelo menos 2 vezes superior àquela produzida pela cultura da mesma cepa de partida nas mesmas condições de cultura, mas sobre o meio TSB.

A presente invenção vai ser descrita de forma mais detalhada nos exemplos que seguem que são dados a título puramente ilustrativo da invenção e não podem em nenhum caso ser considerados como limitando o alcance desta.

10 EXEMPLO 1: Preparo dos Meios de Cultura

Em uma primeira etapa, soluções mães de cada um dos componentes são preparados. Para isso, os componentes são pesados sobre uma balança de precisão e dissolvidos em água ultrafiltrada (salvo indicação contrária). As soluções assim obtidas são em seguida filtradas sobre Stericup
15 0,22 micron e armazenadas a + 4°C ao abrigo da luz. As soluções mães de peptonas de trigo, de extrato de levedo e de FeCl₃, são preparadas extemporaneamente.

1.1. Meio de Poutrel

O meio de Poutrel é preparado conforme indicado no artigo de
20 Poutrel et al., (poutrel, B et al. (1995). Clin Diagn Lab Immunol 2, 166-171) por mistura das diferentes soluções mães. O pH é em seguida ajustada em 7 por acréscimo de NaOH 30%, depois o meio é filtrado sobre 0,22 micron.

A composição final em g/l de meio é: L-Cistina: 0,24 g/l; L-Aspártico ácido: 2,4 g/L; L-Glutâmico ácido: 2,4 g/L; L-proline: 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
25 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-Triptofano: 0,06 g/L; L-Metionina: 0,18 g/L; D-Glicose: 10 g/L; Ácido nicotínico: 11,94 mg/L; Tiamina HCl: 0,6 mg/L; Amônio
30 Sulfato: 6,84 g/L; Potássio di-hidrogenofosfato: 1,34 g/L; Sódio difosfato: 14,38 g/L; Cálcio cloreto: 5 mg/L; Cobalto cloreto hexa-hidratado: 2,4 mg/L; Sulfato de cobre: 0,5 mg/L; Sulfato de manganês: 5,6 mg/L; sódio cloreto:

5,8 mg/L; cloreto de zinco: 3,4 mg/L; cloreto de ferro: 27 mg/L; Magnésio sulfato: 247 mg/L.

1.2. Os Meios M0 Gelosado, M0 Líquido, M1

Para o meio M0 gelosado:

5 Em uma primeira etapa, 150 ml de base gelosada são preparados por dissolução de 3 g de ágar em 150 ml de H₂O ultrafiltrada. A composição resultante é colocada no banho-maria fervente até desaparecimento dos grãos de ágar (aproximadamente 30 minutos), depois esterilizada no auto clave durante 30 minutos a 116°C.

10 O meio M0 gelosado é em seguida preparado por mistura das diferentes soluções mães na ordem indicada na composição abaixo), filtração da mistura resultante sobre estericup 0,22 micron e adição da mistura assim obtida sob 50 mL à base gelosada de forma a se conseguir um meio contendo em g por litro:

15 Peptona de trigo: 3,87 g; extrato de levedo: 5 g; D-glicose H₂O: 1 g; NaCl: 6 g; MgCl₂, 6 H₂O, 0,4 g; (NH₄)₂ SO₄ : 6,8 g; NH₄Cl: 6 g; FeCl₃, 6 H₂O : 120 10⁻³ g; ZnCl₂: 5 10⁻³ g; CaCl₂, 2H₂O: 10 10⁻³ g.

8 caixas de pétri são em seguida escoadas.

A peptona de trigo que foi utilizada corresponde à peptona de 20 trigo de Organotecnica (ref. 19559). O extrato de levedo utilizado corresponde ao extrato de Beckton Dickinson (ref 212750):

Para o meio M0 líquido:

O meio M0 líquido é preparado por mistura das diferentes soluções mães na ordem indicada na composição abaixo e filtração da mistura 25 resultante sobre estericup 0,22 micron de forma a se conseguir um meio contendo em g por litro:

peptona de trigo: 30 g; extrato de levedo: 5 g; D-glicose H₂O: 1g; NaCl: 6 g; MgCl₂, 6 H₂O, 0,4 g; (NH₄)₂ SO₄ : 6,8 g; NH₄Cl: 6 g; FeCl₃, 6 H₂O : 120 10⁻³ g; ZnCl₂: 5 10⁻³ g; CaCl₂, 2H₂O: 10 10⁻³ g; pH = 6,5.

30 Para o meio M1

O meio M1 é preparado por mistura das diferentes soluções mães na ordem indicada na composição abaixo e filtração da mistura resul-

tante sobre estericup 0,22 micron, de forma a se conseguir um meio contendo em g por litro:

Peptona de trigo: 30 g; extrato de levedo: 5 g; D-glicose H_2O : 1 g; NaCl: 58,5 g; MgCl_2 , 6 H_2O , 0,4 g; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: 6,8 g; NH_4Cl : 6 g; FeCl_3 , 6 H_2O : $120 \cdot 10^{-3}$ g; ZnCl_2 : $5 \cdot 10^{-3}$ g; CaCl_2 , 2 H_2O : $10 \cdot 10^{-3}$ g.

1.3. Gelose Columbia 2% NaCl

Para 1 litro de meio, 44g de Columbia "Blood Ágar Base" (Difco ref 279240) são pesados, depois são acrescentados 500 ml de H_2O ultrafiltrada estéril. A mistura obtida é incubada no banho-maria a 100°C , durante aproximadamente 30 minutos (até completa dissolução e obtenção de uma solução límpida). 500 ml de H_2O ultrafiltrada estéril são em seguida acrescentados. A solução é repartida em frascos Schotts de 200 ml, depois esterilizada por autoclave a 116°C , durante 30 minutos. Os meios são em seguida mantidos a 55°C (banho-maria), antes de serem escoados em caixas de pétri (25ml/caixa). Antes de escoar as caixas, são acrescentados 13,3 ml de NaCl 30% (filtrado 0,22 μm) por frasco de 200 ml para se obter uma concentração final de 2% (= 2g/100 ml).

1.4. "Tryptic Soy Ágar" (GTS)

Para 1 litro de meio, 40 g de "Tryptic Soy Ágar"(Difco ref. 236950) são pesados, depois são acrescentados 500 ml de H_2O ultrafiltrada estéril. A mistura obtida é incubada no banho-maria a 100°C , durante aproximadamente 30 minutos (até completa dissolução e obtenção de uma solução límpida). 500 ml de H_2O ultrafiltrada estéril são em seguida acrescentadas. A solução é repartida em frascos Schotts de 200 ml, depois esterilizada por autoclave a 116°C durante 30 minutos. Os meios são em seguida mantidos a 55°C (banho-maria) antes de serem derramados em caixas de pétri (25 ml/caixa).

1.5 Mingau "bacto Tryptic Soy" Broth (TSB)

Para 1 litro de meio, 30 g de "Bacto Tryptic Soy" (Difco Ref. 211825) são pesados, depois são acrescentados 500 mL de H_2O ultrafiltrada estéril. A mistura obtida é incubada no banho-maria a 100°C durante aproximadamente 30 minutos (até completa dissolução e obtenção de uma solu-

ção límpida). 500 ml de H₂O ultrafiltrada estéril são em seguida acrescentadas. A solução é repartida em frascos Schotts de 200 ml, depois esterilizada por autoclave a 116°C durante 30 minutos. Os meios são em seguida mantidos a 55°C (banho-maria) antes de serem derramados em caixas de pétri (25 ml/caixa).

EXEMPLO 2: Avaliação da Produção de Polissacarídio Capsular de Tipo 5 (CP5) em Diferentes Condições de Cultura

2.1. Cultura da cepa Reynolds

Congelados foram preparados de duas formas diferentes, segundo o fato de se desejar colocar em condições sem compostos de origem animal ou em condições padrão. Para as condições padrão, um liofilizado de origem é retomado sobre uma gelose Colombia+ 2% NaCl. Esta última é cultivada durante 18 horas a 37°C com ou sem CO₂ em função da cepa. A cultura é de novo repicada sobre uma nova caixa de gelose durante 4 horas a 37°C para serem obtidos germes em fase exponencial de crescimento. A cultura é então recuperada em mingau trypticase soja ao qual são acrescentados 20% de glicerol. No caso em que as condições isentas de compostos de origem animal são requeridas, a pré-cultura é realizada sobre meio M0 18 horas a 37°C, depois o inoculum serve para repicar um meio líquido M0. O congelamento é feito também após adição de glicerol 20%.

Um congelado Reynolds de 100 µL obtido pelo primeiro método citado acima é retomado em 900 µL de PBS.

Inseminam-se duas caixas de pétri de meio M0 gelosado e duas caixas de pétri de gelose columbia 2% de NaCl em camada com 150 µL de suspensão bacteriana por caixa e incuba-se 18-20 horas a 37°C.

As camadas são raspadas a esse e suspensas de novo em 5 ml de PBS. A DO_{680nm} das suspensões é medida e permite determinar o volume de pré-cultura necessário para inseminar os erlens de 50 mL a DO_{680nm} = 0,2.

A pré-cultura sobre Gelose Columbia 2% NaCl é utilizada para inseminar um erlen de meio de Poutrel, e a pré-cultura sobre M0 gelosado (18-20 H a 37°C) é utilizada para inseminar um erlen de meio M0 líquido e

um erlen de meio M1. Os volumes são variáveis em função dos testes, mais freqüentemente 50 ml. Para manter uma boa oxigenação, o volume de meio é inferior ou igual a 20% do volume do erlen.

- Após verificação das DO_{680nm} iniciais, os erlens são colocados sob agitação (x 100 tpm) a 37°C.

A seqüência das culturas é feita por medida da DO a 680 nm em t_0 , t_{8h} , t_{24h} , t_{32h} , t_{48h} , t_{56h} , e t_{72h} , o pH inicial é medido assim como em 72 horas de cultura. Os resultados obtidos sobre as culturas de 50 ml estão consignados nas tabelas 1 e 2 abaixo.

10 Tabela 1

Cepa	Meio de Pré-cultura	DO/CFU para $DO_{680} = 1$	Desvio Padrão
Reynolds	Gelose Columbia 2% NaCl	5,3E + 08	8,2E + 07
Reynolds	M0 Gelosado	4,2E + 08	1,7E + 08

Tabela 2: Medida da DO 680 nm

Tempo em Horas	Poutrel	M0 líq.	M 1
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. Inativação da Cultura

Às 72 horas as culturas são repartidas em 4 frascos schott de 1 L contendo cada um 750 mL de cultura.

- São acrescentados 15 mL de fenol/etanol (v/v) para 750 ml de cultura seja 2% final e agita-se a mistura com o auxílio de uma barra imantada à temperatura ambiente durante 48 horas aproximadamente.

O teste de mortalidade é realizado da seguinte forma:

100 µl de cultura tratada são aferidos sobre gelose Columbia 2% NaCl e

- 5 100 µl de cultura tratada são inseminadas em mingau trypticase soja + 1/30 soro de cavalo, depois se incuba durante 48 horas a 37°C (os bujões dos frascos de mingau trypticase soja são desaparafusados). As culturas assim inativadas são utilizadas para extrair o polissacarídeo e avaliar a quantidade produzida por ELISA.

2.3. Extração do Polissacarídeo Produzido

- 10 As culturas de 72 horas inativadas são em seguida centrifugadas durante 30 minutos a 3500 rpm a + 4°C, o que flutua de cultura são separados e armazenados a + 4°C. Os resíduos são retomados em 5 ml de PBS e autoclavados durante 60 minutos a 121°C, depois centrifugados durante 30 minutos a 25000 g + 4°C. O que flutua (extrato 1) é recuperado. Os resíduos
- 15 são retomados em 5 mL de PBS, autoclavados durante 60 minutos a 121°C e centrifugados durante 30 minutos a 25000 g + 4°C. O que flutua (extrato 2) é recuperado. Os extratos 1 e 2 são reunidos e tratados à proteinase K 50 µg/ml 1H a 37°C, depois a proteína é inativada durante 20 minutos a 75°C.

2.4. Avaliação da Quantidade de Polissacarídeo Produzida por ELISA

- 20 Os soro policlonais dirigidos contra a cápsula de tipo 5 ou de tipo 8 foram produzidos segundo o método descrito por Karakawa et al. J Clin Microbiol. 1985 set; 22(3): 445-7. Os monoclonais utilizados foram produzidos pelo protocolo, tal como descrito por Hochkeppel et al. J Clin Microbiol. 1987 mar; 25 (3): 526-30 e nos foram transmitidos pelo Institut Pasteur.

- 25 A quantidade de polissacarídeo capsular produzida é determinada por ELISA. Para isto, um teste ELISA colocado entre 2 elementos é feito sobre placas de 96 cavidades (Nunc, Roskilde, Danemark). Em uma primeira etapa, deposita-se nas cavidades um anticorpo monoclonal anti-CP5 (1 micrograma por ml em tampão carbonato de sódio 0,05 M pH = 9,6 (sigma) -
- 30 100 ng/cavidade), as placas são incubadas durante toda a noite a 4°C. As placas são em seguida lavadas 4 vezes com 300 microlitros por cavidade de tampão PBS (Eurobio) adicionado de 0,05% de tween 20 (Sigma) (PBS-

Tween), depois saturadas durante uma hora a 37°C com 250 microlitros por cavidade de PBS-Tween adicionado de 1% (v/p) de BSA (Eurobio) (PBS-Tween-BSA). As placas são em seguida lavadas em três vezes com a solução PBS-Tween.

- 5 Diluições em série de um fator 2 dos extratos da etapa 2.3 por utilização da solução PBS-Tween-BSA são realizadas e acrescentadas à razão de 100 microlitros por cavidade. As placas são incubadas durante 90 minutos a 37°C, depois lavadas 4 vezes com PBS-Tween. Anticorpos policlonais de coelho anti-CP5 produtos segundo o protocolo de Karakawa (Karakawa et al., 1985, J. Clin. Microbiol. 1985, set; 22(3): 445-7) são diluídos em PBS-Tween-BSA (1/2000), depois acrescentados às cavidades à razão de 100 microlitros por cavidade, e incuba-se durante 90 minutos a 37°C. As placas são em seguida lavadas 4 vezes com PBS-Tween. O conjugado IgG de cabra anticoelho - peroxidase (Southern biotech), diluído em PBS-Tween-BSA (1/6000) é acrescentado à razão de 100 microlitros por cavidade e incuba-se durante 1 hora a 37°C. AS placas são lavadas 8 vezes com 300 microlitros de PBS-Tween por cavidade e são acrescentados 100 microlitros por cavidade de uma solução de substrato TMB (TEBU), depois se incuba no negro durante 15 minutos à temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). A reação enzimática é parada por adição de 100 microlitros de H₃PO₄ 1M (sigma) por cavidade.
- 10
15
20

Uma leitora de placa automática (Versamax) mede em seguida a densidade óptica a 450 nm. O valor da prova é subtraído e a quantidade avaliada por comparação com uma curva aferida.

- 25 Os resultados estão consignados na tabela 3 abaixo.

Tabela 3

					Dosagem ELISA CP5 (X3) (No Resíduo)	
Meio de Cultura	Pré-Cultura	Volume de Cultura (ml)	SO680 Inicial	DO680 Final	Média (µg/ml de cultura)	Desvio Padrão
Poutrel	Gel. Col. 2% NaCl	50	0,2	8,1	3,6	0,3
M0 líquido	M0 Gelo-sado	50	0,2	8,6	9,7	1,2
M1	M0 Gelo-sado	50	0,2	5,7	36,0	1,5

2.5 - Extração e Purificação do Polissacarídeo CP5

A cepa Reynolds é cultivada como descrito no ponto 2.1 segundo um protocolo, que compreende uma pré-cultura sobre meio M0 gelosado, depois uma cultura em 400 ml de meio M1 em erlens. As culturas são agrupadas para serem obtidos 3 litros de cultura a partir dos quais se extrai e se purifica o polissacarídeo T5 produzido.

A integralidade da cultura é inativada por tratamento ao fenol-etanol (V/V 2% final), depois centrifugada 30 minutos a 25000 g. Um resíduo de aproximadamente 10,9 g de germes inativados úmidos por litro de cultura é obtido.

Os germes são colocados em suspensão à razão de 0,5 g/ml de Tris 50mM, MgSO₄ 2 mM, pH 7,5. Uma solução aquosa de lisistafina a 5 mg/ml é acrescentada, de forma a se obter uma concentração final de 100 µg/ml. Após incubação de 4 horas a 37°C sob agitação magnética, acrescenta-se uma solução de benzonase a 5 U/ml final e a incubação é feita durante 2 horas a 37°C sob agitação magnética.

Após centrifugação (25000 g, 30 mn), o que flutua da extração é coletado, resfriado e ultrafiltrados. O que flutua é previamente diluído em ¼ em H₂O, para se obter um volume suficiente para o sistema de ultrafiltração. A ultrafiltração é feita sobre 2 caixas UF 50 kD nas seguintes condições: H₂O: 10 volumes; depois Tris 50 mM pH 8,0: 3 volumes. O volume de reten-

tado permanece constante no decorrer da ultrafiltração. O retentado constitui o que é denominado o extrato CP5.

O extrato CP5 é incubado a 37°C em presença de $MgCl_2$ (1 mM no final) e de benzonase (5U/ml final seja ~ 40 U por grama de germes úmidos tratados) sob agitação. Após 3 horas de incubação, agita-se a benzonase a uma concentração final de 50/ml, a incubação é contida durante 3 horas. Uma solução aquosa de pronase a 10 mg/ml é adicionada de forma a obter uma concentração final de 4U/ml (seja ~ 30U por grama de germes úmidos tratados), adicionada de $CaCl_2$, a uma concentração final de 1 mM. A mistura é então incubada durante 15 horas a 37°C. Uma ultrafiltração 50 kD é realizada a fim de eliminar os fragmentos de ácidos nucleicos e de proteínas sobre 2 caixas UF 50KD nas seguintes condições: H_2O : 10 volumes, depois Tris 50 mM pH: 8,0: 3 volumes. O volume de retentado permanece constante no decorrer da ultrafiltração. Ao retentado anteriormente obtido é acrescentado: $MgCl_2$ 1mM em final, Benzonase 0,1 U/ml em final e incubase 3 horas sob agitação magnética.

Uma solução aquosa de pronase a 10 mg/ml é acrescentada a uma concentração final de 0,1 U/ml, adicionada de $CaCl_2$, a uma concentração final de 1 mM, depois se incuba durante 2 horas a 37°C.

Uma ultrafiltração sobre 2 caixas UF 30KD é então feita nas seguintes condições: H_2O : 10 volumes, depois Tris 50 mM pH 7,5: 3 volumes. O retentado obtido apresenta um precipitado/turvo esbranquiçado que é eliminado por centrifugação a 8000 g/30 min.

Uma etapa de purificação sobre cromatografia de troca de íons é em seguida realizada. Ela permite a eliminação dos residuais, notadamente o ácido teicóico (TA) e o ácido lipoteicóico (LTA).

As seguintes condições são utilizadas: três colunas Hi Trap Q HP de 5 ml são conectadas em série (Ref.: Amersham 17-1154-01); Tampão de equilíbrio: tris 20 mM pH 7,5; Vazão: 2 ml/min; Injeção da amostra em tampão de equilíbrio.

Purificação:

- Tris 20 mM PH 7,5: 5 volumes de coluna

- gradiente Tris 20 mM PH 7,5 NaCl 0-0,5 M: 10 volumes de coluna

- Tris 20 mM, NaCl 0,5 M Ph: 7,5: 5 volumes de coluna
- gradiente Tris 20 mM pH 7,5 NaCl 0,5-1M: 5 volumes de coluna
- Tris 20 mM, NaCl 1 M Ph 7,5: 5 volumes de coluna
- Tris 20 mM Ph 7,5: 5 volumes de coluna

A purificação é seguida por medida da absorbância 206 e 280 nm. Uma análise por CZE permite identificar os diferentes componentes purificados no decorrer da cromatografia. O polissacarídeo CP5 é purificado a uma concentração em NaCl compreendida entre 0,2 M e 0,3 M. Nas condições cromatográficas utilizadas, este é bem separado dos residuais. Notadamente, o ácido teicóico que é purificado entre 0,36 M e 0,48 M em NaCl e o ácido lipoteicóico que é purificado entre 0,74 M e 0,86 M em NaCl.

As frações contendo o CP5 são reunidas e dialisadas a +4°C contra 20 volumes de uma solução aquosa de NaCl 0,5 M (2-3 banhos), depois contra a água ultrafiltrada 20 volumes (3-4 banhos). O Tris é assim eliminado.

O produto purificado é liofilizado e conservado a -20°C.

A partir de 3 litros de cultura, são obtidos 74 mg de polissacarídeo capsular T5 em fim de purificação. As características do produto estão consignadas na tabela 4 abaixo.

Tabela 4

	Dosa- gem CP5	O-acetilA (CP em peso de pó)		O-acetilA (CP dosagem CE)		Proteínas	ADN
Método Analítico	RMN	Colorimetria				Micro BCA Direto	Picogreen
Unidades	% em relação ao peso de pó	Mmo ls/mg CP	Mmo ls/mg UR	Mmo ls/m gCP	Mmo ls/m gUR	% P/P em Relação Peso de Pó	% P/P em Relação Peso de Pó
Resulta- dos	80%	1,32	0,87	1,65	1,08	2,7%	<0,1%

EXEMPLO 3: Avaliação da Produtividade de Polissacarídios Capsulares de Tipo 8 (CP8) em Diferentes Condições de Cultura.

A avaliação é realizada sobre as cepas Becker et CYL770.

3.1. Cultura da Cepa Becker

5 Os congelados são de duas formas diferentes segundo o fato se colocar em condições sem compostos de origem animal ou em condições padrão. Para as condições padrão, um liofilizado de origem é retomado sobre um gelose Colombia + 2% NaCl. Esta é cultivada 18 horas a 37°C com ou sem CO₂ em função da cepa. A cultura é de novo repicada sobre uma
10 nova caixa de gelose durante 4 horas a 37°C para serem obtidos dos germes em fase exponencial de crescimento. A cultura é, então, recuperada em mingau tripticase soja ao qual são acrescentados 20% de glicerol. No caso em que as condições isentos de compostos de origem animal são requeridos, a pré-cultura é realizada sobre meio M0 18 horas a 37°C, depois o ino-
15 culum serve para repicar um meio M0 líquido. O congelamento é feito também após adição de glicerol 20%.

Um congelado de 100 µl Becker preparado segundo o método em mingau tripticase soja é retomada em 900 µl de PBS. Três caixas de pétri de M0 gelosado, duas caixas de pétri de gelose columbia 2% NaCl, e uma
20 caixa de pétri GTS são inseminadas em camada com 150 µl de suspensão bacteriana por caixa. As caixas são incubadas durante 18/20 h a 37°C +5% CO₂.

As camadas são raspadas nesse e suspensas novamente em 5 ml de PBS.

25 A DO_{680nm} das suspensões é medida, e permite determinar o volume de pré-cultura necessário para inseminar os erlens de 50ml a DO_{680nm} = 0,2.

A pré-cultura sobre gelose columbia 2% NaCl é utilizada para inseminar um erlen de meio de Poutrel, a pré-cultura sobre GTS é utilizada
30 para inseminar um erlen de TSB, e a pré-cultura sobre meio M0 gelosado é utilizado para inseminar em erlen de meio de M0 líquido e um erlen de meio M1.

Para manter uma boa oxigenação, o volume de meio é inferior ou igual a 20% do volume do erlen.

Após verificação das DO_{680nm} iniciais, os erlens são colocados sob agitação x100 tpm a 37°C.

- 5 Experiências similares são realizadas em erlens contendo 400 ml de meio de cultura.

3.2. Cultura da cepa CYL770

- 10 Para a cepa recombinante CYL770, o método de preparo dos congelados utiliza uma repicagem do congelado inicial sobre meio TSB ou sobre um meio M0 líquido. A cultura é feita durante 5 horas a 37°C sob agitação. O congelamento é feito após adição de 20% de glicerol no meio.

- 15 Um congelado de 1 ml CYL770 assim obtido é retomado por 10 ml de meio M0, depois colocado em erlen de 50 ml e incubado durante 18/20 horas a 37°C sob agitação x100tpm. Um segundo congelado CYL770 é retomado em 10 ml de meio TSB, depois colocado sob agitação nas mesmas condições que anteriormente.

AS DO_{680nm} das pré-culturas líquidas é medida, e permite determinar o volume de pré-cultura necessário para inseminar os erlens de 50 ml a $DO_{680nm} = 0,2$.

- 20 A pré-cultura em TSB permite inseminar um erlen de TSB, a pré-cultura em M0 líquido permite inseminar um erlen em meio M1. Para manter uma boa oxigenação, o volume de meio é inferior ou igual a 20% do volume do erlen.

- 25 Após verificação das DO_{680nm} iniciais, os erlens são colocados sob agitação x100 tpm a 37°C.

Experiências similares são realizadas em erlens contendo 400 ml de meio de cultura.

3.3- Acompanhamento das Culturas

- 30 O acompanhamento das culturas é feito por medida da DO a 680 nm em t_0 , t_{8h} , t_{24h} , t_{32h} , t_{48h} , t_{56h} e t_{72h} .

O ph inicial é medido assim como 72 horas de cultura. Os resultados das culturas de 50 ml são consignados na tabela 5 abaixo.

Tabela 5

Tempo em 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

3.4. Inativação das Culturas

As culturas são inativadas segundo o mesmo protocolo que aquele descrito no ponto 2.2. acima. A extração do polissacarídeo produzido é utilizada segundo o mesmo protocolo que aquele descrito no item 2.3 acima.

3.5. Avaliação da quantidade de polissacarídeo produzida é realizada por utilização do mesmo teste ELISA que aquele descrito no item 2.4 acima, salvo os anticorpos utilizados são anticorpos anti-CP8 e o teste é realizado sobre os extratos de resíduos e sobre o que flutua de cultura. A adsorção foi realizada com ascite contendo o monoclonal K8-24 diluído a $1/20000^e$ e o anticorpo policlonal de coelho é um soro absorvido diluído a $1/1000^e$.

Os resultados obtidos para culturas de 50 ml e de 400 ml são consignados na tabela 6 abaixo. Para as culturas de 400 ml a análise é feita cada vez sobre uma única amostra de 50 ml de uma cultura e quantidade total é em seguida calculada e reportada na tabela 6.

Tabela 6

			Dosagem ELISA do CP8 (X2)			
			Resíduo		Flutuante	
Cepa	Cultura	Pré-cultura	Média (µg/ml de Cultura)	Desvio Padrão	Média (µg/ml de Cultura)	Desvio Padrão
Becker (50 ml)	Poutrel	Gel. Col. 2% NaCl	1,3	0	1,8	0
	M0 Líq.	M0 gel.	1,9	Não Aplicável	3,6	Não Aplicável
	M1	M0 gel	23,04		57,6	
	TBS	GTS	0	0	0	0
Becker (400 ml)	M1	M0 gel.	23,04		57,6	
CYL770 (50 ml)	M1	M0 Líq.	8,7	0,5	534,2	75,2
	TSB	TSB	4,7	1,3	244	Não Aplicável
CYL770 (400 ml)	M1	M0líq.	27,18	Não Aplicável	579,6	Não Aplicável
	TSB	TSB	3,6	Não Aplicável	216	Não Aplicável

3.6. Recuperação e Purificação do PS Produzido

A recuperação do polissacarídeo T*8 foi feita a partir das culturas em erlens de 400 ml da cepa Becker em meio M-1 por utilização do processo, tal como descrito no exemplo 2 para a obtenção do polissacarídeo T5.

A purificação do polissacarídeo T8 foi também realizada a partir das culturas em erlens de 400 ml da cepa CYL770 em meio M-1 e culturas sobre meio TSB. Para isto 800 ml de cultura são inativados por tratamento ao fenol-etanol, segundo o processo descrito acima, depois centrifugada em 30 min a 25000 g. 720 ml do que flutua foram obtidos.

A 500 ml do que flutua é acrescentada uma quantidade de acetato de sódio, de forma a se obter uma concentração final de 4% em acetato

de sódio. A suspensão é colocada sob agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Depois, uma quantidade de etanol, de forma a se obter uma concentração final em etanol de 50%, é acrescentada. A suspensão é então agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos, depois armazenada sem agitação durante uma noite a +4°C.

Após centrifugação a 15000 g durante 30 minutos, o que flutua é coletado. Ao que flutua são acrescentados acetato de sódio e etanol, de forma a se obter uma concentração final de 4% em acetato de sódio e 85% em etanol. A suspensão é colocada sob agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente, depois armazenada sem agitação durante uma noite a 4°C. Após centrifugação a 15000 g durante 30 minutos, o resíduo é coletado.

O resíduo assim obtido é retomado por 100 ml de água ultrafiltrada (concentração de um fator 5 em relação ao volume do que flutua de cultura centrifugado). Após agitação magnética até uma dissolução completa do resíduo à temperatura ambiente, a suspensão obtida é dialisada contra 2 litros de água ultrafiltrada com três mudanças de banho no dia à temperatura ambiente, seguida de uma etapa durante uma noite 4°C. São acrescentados em seguida à suspensão assim obtida Tris e $MgCl_2$, a fim de se obter uma concentração final em Tris de 50 mM e de $MgCl_2$ de 1 mM. Essa solução é incubada a 37°C em presença de benzonase (5U/ml final) sob agitação. Após 3 horas de incubação, acrescenta-se benzonase a uma concentração final de 5 U/ml e a incubação é prosseguida durante 3 horas.

Uma solução aquosa de pronase a 10 mg/ml é acrescentada de forma a se obter uma concentração final de 4 U/ml, adicionada de $CaCl_2$ a uma concentração final de 1 mM. Essa etapa é então incubada durante 15 horas a 37°C. Se aparecer uma turvação/opalescência visível, uma centrifugação a 8000 g durante 30 minutos é feita. Uma ultrafiltração 30 kDa é realizada, a fim de eliminar os fragmentos de ácidos nucleicos e de proteínas nas seguintes condições: H_2O : 10 volumes; depois Tris 20 mM pH 7,5: 3 volumes.

O volume de retentado continua constante durante a ultrafiltra-

gem e obtenção de uma solução límpida muito ligeiramente colorida.

Se o retentado obtido apresentar uma turvação/opalescência, esta é eliminada por centrifugação a 8000 g durante 30 minutos.

Uma etapa de cromatografia trocadora de íons é em seguida feita para completar a eliminação dos resíduos, notadamente o ácido teicóico (TA) e o ácido lipoteicóico (LTA) nas seguintes condições: Gel Q sefarose HP; Coluna Hi Trap Q HP de 20 ml; Tampão de equilíbrio: tris 20 mM com pH 7,5; Vazão: 2 ml/min; Injeção da amostra em tampão de equilíbrio. Injeção do equivalente de 125 ml do que flutua de cultura para 20 ml de gel; Purificação:

- Tris 20 mM pH 7,5: 5 volumes de coluna
- gradiente Tris 20 mM pH 7,5 NaCl 0-0,5 M 20 volumes de coluna

- Tris 20mM, NaCl 0,5 M pH 7,5: 5 volumes de coluna
- Tris 20mM, NaCl 1 M pH 7,5: 5 volumes de coluna
- Tris 20mM, pH 7,5: 5 volumes de coluna

A purificação é seguida por medida da absorbância a 206 e 280 nm. Uma análise por CZE permite identificar os diferentes componentes purificados durante a cromatografia.

Pudemos assim determinar que o polissacarídeo CP8 é purificado a uma concentração em NaCl compreendida entre 0,2 M e 0,3 M. Nas condições cromatográficas utilizadas, este é bem separado dos residuais, cuja quantidade é ínfima depois que essa etapa de cromatografia. Notadamente, o ácido teicóico que é purificado entre 0,36 M e 0,48 M em NaCl e o ácido lipoteicóico que é purificado entre 0,74 M e 0,86 M em NaCl.

As frações contendo o CP8 são reunidas e dialisadas a + 4°C contra 20 volumes de uma solução aquosa de NaCl 0,5 M (2-3 banhos), depois contra a água ultrafiltrada a 20 volumes (3-4 banhos). A etapa em forte concentração de NaCl permite uma boa eliminação do Tris.

O produto assim purificado é liofilizado e conservado a -20°C.

Os resultados obtidos são consignados na tabela 7 abaixo.

Tabela 7

	Dosagem CPS	O-acetila (CP em peso de pó)		O-acetila (CP dosagem CE)		Proteínas	ADN
Método Analítico	CZE	Colorimetria				Micro BCA Direto	Picogreen
Unida-des	% em relação ao peso de pó	Mmols/mgCP	Mmols/mol UR	Mmols/mg CP	Mmols/mol UR	% P/P em Relação Peso de Pó	% P/P em Relação Peso de Pó
Becker (P005) Resíduo M0 líq./M1	71%	0,93	0,61	1,31	0,86	2,2%	nd
CYL770 (P006) que flutua M0 líq./M1	85%	1,03	0,68	1,22	0,80	0,5%	<0,1%
CYL770 (P007) que flutua TSB/TS B	62%	1,08	0,71	1,75	1,14	3,5%	nd

EXEMPLO 4: Cultura da Cepa de *Staphylococcus Aureus* Reynolds Tipo 5 em Fermentador de 30 litros

4.1. Cultura sobre Meio BTS + NaCl

O congelado da cepa Reynolds preparado pelo primeiro método do ponto 2.1 é inoculado à razão de 0,5% em volume em dois erlens com gargalos de 2L (E1 e E2) contendo, cada um, 200 ml de meio Mingau Triptona Soja adicionado de NaCl (55 g/l). Os erlens são incubados a 37°C durante 5±1 horas (E1) ou 48 horas (E2) sob uma agitação de 175 tpm.

O fermentador Braun de 30 litros contendo 20 litros do mesmo meio é inoculado com 70 ml de pré-cultura (E1) estimado a $\sim 1,38 \cdot 10^{11}$ CFU (~5h de cultura de DO_{600nm} final no erlen próximo de 4). A cultura é realizada nas condições seguintes: temperatura: 37°C; duração de cultura: 48 ± 2 horas; regulagem do pH a 6,50 com NH₄OH 25% e H₃PO₄ 10%; PO₂ 30% (regulagem em cascata: agitação 20 a 80%, ar de 20 (1vvm) a 60% (3 vvm), enriquecimento em oxigênio de 0 a 100%); Pressão: 10 KPa (100 mbárias); regulagem antiespuma pelo estruktol 1/50.

O acompanhamento da cultura é realizado durante as primeiras horas com retiradas regulares, assim como 20 ± 2 horas de cultura, 24 ± 2 horas de cultura, 42 ± 2 horas de cultura para controlar a DO a 600 nm; determinar o peso seco; determinar a viabilidade; observar a morfologia; dosar a glicose; dosar o acetato e determinar a produtividade em polissacarídeo pelo teste ELISA sobre 6 resíduos de DO = 50, após 4 ± 2 horas, 18 ± 2 horas, 24 ± 3 horas, 44 ± 3 horas e 48 ± 2 horas de cultura.

As células são coletadas após 48 ± 2 horas de cultura em caçambas de centrifugação de 1L (12 caçambas/20 l de cultura) e centrifugadas durante 20 minutos a 7000 g a 4°C. O peso úmido é determinado após eliminação do que flutua. Os resíduos são conservados a ≤ -20°C até a etapa de inativação dos germes ao fenol/etanol, depois recuperação e purificação do polissacarídeo T5, segundo o processo do exemplo 2.

O segundo erlen (E2) é acompanhado em 48 horas, a fim de acompanhar a produtividade da cápsula CP5 a 10 horas, 14 horas e 48 horas de cultura.

4.2. Cultura sobre Meio de Poutrel

O congelado da *Staphylococcus Aureus* Reynolds tipo 5 preparado, segundo o primeiro método descrito no ponto 2.1 é inoculado à razão de 1% em volume em dois erlens com gargalos de 2 litros (E1 e E2) contendo
 5 cada um 200 ml de meio de Poutrel. Os erlens são incubados a 37°C a 175 tpm durante 16 ± 2 horas. As pré-culturas são resfriadas e utilizadas para inocular o fermentador. A cultura em fermentador B. Braun de 30 l, contendo 20 l de meio de Poutrel é realizada nas seguintes condições: temperatura: 37°C; duração de cultura: 48 ± 2 horas; regulagem do pH a 6,50 com NH_4OH
 10 25% e H_3PO_4 10%; PO_2 30% (regulagem em cascata: agitação 20 a 80%, ar de 20 (1vvm) a 60% (3 vvm), enriquecimento em oxigênio de 0 a 100%); pressão: 10 KPa (100 mbárias); regulagem antiespuma pelo estruktol 1/50.

A cultura é acompanhada nas primeiras horas assim como a 24 ± 2 horas de cultura e 30 ± 2 horas de cultura, com retiradas para controlar a
 15 DO a 600 nm; determinar o peso seco; determinar a confiabilidade; observar a morfologia; dosar a glicose; dosar o acetato, dosar os ácidos aminados livres e determinar a produtividade em polissacarídeo pelo teste ELISA.

As células são coletadas após 48 ± 2 horas de cultura.

2 litros de coleta são coletados em um schott de 2 e tratados
 20 com fenol/etanol (v/v) a uma concentração final de 2% (V/V). Essa mistura é colocada sob agitação durante $6\text{h} \pm 1$ horas a $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$. Após eliminação do que flutua do resto da cultura, os resíduos bacterianos são retomados com um volume mínimo de tampão PBS, depois autoclavados para inativação e recuperação do polissacarídeo, segundo o processo descrito no exemplo 2 acima.
 25

O resto da cultura é coletado em caçambas de centrifugação de 1 L (12 caçambas/18 litros decultura) e centrifugado durante 20 minutos a 7000 g a 4°C. O peso úmido é determinado após eliminação do que flutua. 2 litros do que flutua são conservados a $\leq -20^\circ\text{C}$, após filtragem 0,45 μm e autoclavagem 55 minutos a 121°C.
 30

Os 12 resíduos são recolocados em suspensão em um volume mínimo de tampão PBS (aproximadamente 650 ml) com o auxílio do ultratu-

5 rax. As suspensões são resfriadas, homogeneizadas e repartidas equitativamente em 3 schott de 500 ml (aproximadamente 300 ml/schott) antes de autoclavagem durante 55 minutos a 121°C. As suspensões autoclavadas são em seguida resfriadas e o polissacarídeo é recuperado segundo o protocolo descrito no exemplo 2 acima.

4.3 Cultura sobre Meio Columbia + NaCl

10 O congelado de *Staphylococcus Aureus* Reynolds tipo 5 preparado, segundo o primeiro método do ponto 2.1 é inoculado à razão de 1% em volume em dois erlens com gargalos de 2l, contendo cada um 200 ml de meio columbia + 20 g/l de NaCl (Difco ref 294420)¹. Os erlens são incubados a 37°C durante 24 ± 2 horas sob uma agitação de 175 tpm. Após 24 ± 2 horas, as pré-culturas são resfriadas e utilizadas para inocular o fermentador. A cultura no fermentador de 30 l B.Braun contendo 20 l do mesmo meio é realizado nas seguintes condições: temperatura: 37°C; duração de cultura: 15 24 ± 2 horas; regulagem do pH a 7,00 com NH_4OH 25% e H_3PO_4 10%; PO_2 30% (regulagem em cascata: agitação 20 a 80% , ar de 20 (1vvm) a 60% (3 vvm), enriquecimento em oxigênio de 0 a 100%); pressão: 10 KPa (100 mbárias); regulagem antiespuma pelo estrutol 1/50.

20 A cultura seguida regularmente com retiradas regulares para controlar a DO a 600 nm; determinar o peso seco; determinar a confiabilidade; observar a morfologia; dosar a glicose; dosar o acetato e determinar a produtividade em polissacarídeo pelo teste ELISA.

25 As células são em seguida coletadas após 24 ± 2 horas de cultura. A cultura final é transferida em caçambas de centrifugação de 1 l (12 caçambas/20 l de cultura) e centrifugada 20 minutos a 7000 g a 4°C. O peso úmido é determinado após a eliminação do que flutua. Após centrifugação, os 12 resíduos são recolocados em suspensão com o auxílio do ultraturax em um volume mínimo de tampão PBS compreendido entre 1 e 1,2 l. As suspensões são resfriadas, homogeneizadas e repartidas equitativamente em schott de 500 ml, depois autoclavadas 55 minutos a 121°C. As suspensões autoclavadas são em seguida resfriadas e polissacarídeo é recuperado, 30 segundo o protocolo descrito no exemplo 2 acima.

4.4 Cultura sobre Meio M1

Um congelado de *Staphylococcus Aureus* Reynolds tipo 5 preparado, segundo o primeiro método descrito no ponto 2.1 acima é retomado em tampão PBS 1C à razão de 1 ml de congelado para 9 ml de tampão para
5 inseminar aproximadamente 10 caixas de meio M0 gelosado à razão de 150 μL /caixa.

As caixas são incubadas a 37°C durante 15 a 18 horas. Após uma incubação de 15 -18 horas a 37°C, as camadas formadas são raspadas antes de serem retomadas em suspensão em meio M1 para inocular dois
10 erlens de composição idêntica (200 ml/2L -E1 e E2) de forma a ter uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ inicial próximo de 0,2 em cada erlen. Os erlens são incubados a 37°C sob uma agitação de 175 tpm, durante aproximadamente 5 horas (cultura em fase exponencial E1) ou 72 horas (E2).

Uma parte da cultura de E1 ($\text{DO}_{600\text{nm}}$ próxima de 3) é utilizada
15 para inocular o fermentador B. Braun de 30 l contendo 20 l de meio M1, de forma a ter uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ inicial próxima de 0,02.

A cultura é utilizada nas seguintes condições: temperatura: 37°C; duração de cultura: 72+4 horas; regulagem do pH a 6,59 com NH_4OH 25% e H_3PO_4 10%; PO_2 30% (regulagem em cascata: agitação 20 a 80%, ar
20 de 20 (1 vvm) a 60% (3 vvm), enriquecimento em oxigênio de 0 a 100%); pressão: 10 KPa (100 mbárias); regulagem antiespuma pelo estruktol 1/50.

1L de cultura é em seguida coletado em caçambas de centrifugação e centrifugado durante 20 minutos a 7000 g a 4°C a fim de determinar o peso úmido após eliminação do que flutua. Os resíduos são conservados a
25 $\leq -20^\circ\text{C}$.

O resto da cultura é coletado em Nalgeno de 50 l e inativado ao fenol/etanol (2% final V/V) e o polissacarídeo é recuperado segundo o protocolo descrito no exemplo 2-acima.

O conjunto dos resultados obtidos é consignado na tabela 8 a-
30 baixo:

TABELA 8

Meio	Columbia + NaCl	Poutrel	BTS + NaCl	M1
DO Final	21	16	17	16
[CP5] Extração Lisostafina	nd	6,6 mg/l	nd	130 mg/l
[CP5] Extração Autoclave	0,2 mg/l	3,7 mg/l	3,5 mg/l	40 mg/l
Rendimento Específico (µg/DO)	0,01	0,23	0,21	2,5

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de uma cepa superprodutora de *Staphylococcus Aureus*, compreendendo:

5 (a) a cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M1, compreendendo por litro de meio de cultura:

. 5 a 100 g de peptona vegetal;

. 0,5 a 20 g de extrato de levedo;

. 1 a 30 g de açúcar;

10 . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 , e FeSO_4 ;

. 1 a 700 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e Mg SO_4 ,

. 0,1 a 500 mg de Ca Cl_2 ,

. 0 a 50 mg de Zn Cl_2 ;

15 . 10 a 250 g de NaCl , de preferência 58,5 g/l, e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5; e

(b) eventualmente a recuperação das cepas a partir do meio de cultura.

20 2. Processo de produção de uma cepa superprodutora, de acordo com a reivindicação 1, no qual o meio de cultura M1 da etapa (a) compreende a peptona de trigo.

3. Processo de produção de uma cepa superprodutora, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, no qual meio de cultura M1 compreende por litro de meio de cultura:

25 . 30 g de peptona de trigo;

. 5 g de extrato de levedo;

. 1 g de D-glicose H_2O ,

. 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O ,

. 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O ,

30 . 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O ,

. 58,5 g de NaCl ,

. 5 mg de Zn Cl_2 ,

- . 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- . 6g de NH_4Cl e pH = 6,5.

4. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 4, no qual o meio M1 consiste por litro em: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1 g de D-glicose H_2O , 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O , 400 mg de Mg-Cl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O , 58,5 g de NaCl , 5 mg de Zn Cl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6g de NH_4Cl e pH = 6,5.

5. Processo de produção de uma cepa superprodutora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, compreendendo uma etapa de pré-cultura sobre um meio de cultura M0, compreendendo:

- . 3 a 50 g de peptona vegetal;
- . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
- . 1 a 30 g de açúcar;
- . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 , e FeSO_4 ,
- . 1 a 700 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e Mg SO_4 ,
- . 0,1 a 50 mg de Ca Cl_2 ,
- . 0 a 50 mg de Zn Cl_2 ;
- . 2 a 50 g de NaCl , de preferência 6 g/l, e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5.

6. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 5, no qual o meio M0 da etapa de pré-cultura compreende 3,87 g ou 30 g de peptona de trigo.

7. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, no qual o meio M0 da etapa de pré-cultura compreende:

- . 3,87 ou 30 g de peptona de trigo;
- . 5 g de extrato de levedo;
- . 1 g de D-glicose H_2O ,
- . 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O ,
- . 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O ,
- . 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O ,

- . 6 g de NaCl,
- . 5 mg de Zn Cl₂,
- . 6,8 g de (NH₄)₂SO₄,
- . 6g de NH₄Cl e pH = 6,5.

5 8. Processo de produção de uma cepa superprodutora de *Staphylococcus Aureus*, compreendendo:

(a) a cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M2, compreendendo por litro de meio de cultura:

10 . 52,5 a 100 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de trigo;

. 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl;

15 . 0 a 15 g/l de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em MgSO₄ e MgCl₂, vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular a 15 g/l de MgCl₂, 6 H₂O; e

. 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l em particular 0,25 g/l de D-glicose, H₂O, cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7; e

20 (b) eventualmente a recuperação das cepas a partir do meio de cultura.

25 9. Processo de produção de uma cepa superprodutora, de acordo com a reivindicação 8, no qual o meio de cultura M2 compreende, e vantajosamente consiste em 93 g/l de peptona de trigo, 41 g/l de NaCl, 0,25 g/l de D-glicose, H₂O e 15 g/l de MgCl₂, 6 H₂O, cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7.

10. Processo de produção de uma cepa superprodutora de *Staphylococcus Aureus*, compreendendo:

(a) a cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M3, compreendendo por litro de meio de cultura:

30 . 65 a 85 g de extrato de levedo, vantajosamente 75 g;

. 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl;

. 0 a 15 g/l de um sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgSO_4 e MgCl_2 , vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular a 15 g/l; e

5 . 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l em particular 0,25 g/l de D-glicose, H_2O , cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7; e

(b) eventualmente a recuperação das cepas a partir do meio de cultura.

10 11. Processo de produção de uma cepa superprodutora *Staphylococcus Aureus* T5, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

12. Processo de produção de uma cepa superprodutora de *Staphylococcus Aureus* T8, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

13. Processo de produção de polissacarídio capsular, compreendendo:

15 (a) cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M1, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou sobre um meio de cultura M2, tal como definido na reivindicação 8 ou 9, ou sobre um meio de cultura M3, tal como definido na reivindicação 10;

(a) a inativação da cultura assim produzida; e

20 (b) a recuperação do polissacarídio capsular.

14. Processo de produção de polissacarídio capsular, no qual o meio M1 da etapa de cultura compreende a peptona de trigo.

25 15. Processo de produção de polissacarídio capsular, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, no qual o meio M1 da etapa de cultura compreende por litro de meio de cultura: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1g de D-glicose H_2O , 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O , 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O , 58,5 g de NaCl , 5 mg de Zn Cl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6g de NH_4Cl e $\text{pH} = 6,5$.

30 16. Processo de produção de polissacarídio capsular, de acordo com a reivindicação 15, no qual o M1 consiste, por litro de meio de cultura, em: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1g de D-glicose H_2O , 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O , 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O ,

58,5 g de NaCl, 5 mg de Zn Cl₂, 6,8 g de (NH₄)₂SO₄, 6g de NH₄Cl e pH = 6,5.

17. Processo de produção de polissacarídeo capsular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, compreendendo uma etapa de pré-cultura, tal como definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 7.

18. Cepa subprodutora de *Staphylococcus Aureus*, obtida pelo processo, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 13 a 17.

19. Cepa subprodutora Reynolds, de acordo com a reivindicação 18.

20. Cepa subprodutora Becker, de acordo com a reivindicação 18.

21. Cepa subprodutora CYL 770, de acordo com a reivindicação 18.

22. Cepa subprodutora CLY1892, de acordo com a reivindicação 18.

23. Meio M0 adaptado à cultura de *Staphylococcus Aureus*, compreendendo:

- . 3 a 50 g de peptona vegetal;
- . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
- . 1 a 30 g de açúcar;
- . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl₃, e FeSO₄,
- . 1 a 700 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em MgCl₂ e Mg SO₄,
- . 0,1 a 50 mg de Ca Cl₂,
- . 0 a 50 mg de Zn Cl₂;
- . 2 a 50 g de NaCl, de preferência 6 g/l, e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5.

24. Meio M0, de acordo com a reivindicação 23, compreendendo:

- (a). 3,87 ou 30 g de peptona de trigo;
- (b). 5 g de extrato de levedo;
- (c). 1 g de D-glicose H₂O,
- (d). 120 mg de Fe Cl₃, 6 H₂O,
- (e). 400 mg de MgCl₂, 6 H₂O,
- (f). 10 mg de CaCl₂, 2 H₂O,

- (g). 6 g de NaCl,
- (h). 5 mg de Zn Cl₂,
- (i). 6,8 g de (NH₄)₂SO₄,
- (j). 6g de NH₄Cl e pH = 6,5.

5 25. Meio de cultura M1, adaptado a superprodução de polissacarídeo capsular, compreendendo:

- . 5 a 100 g de peptona vegetal;
- . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
- . 1 a 30 g de açúcar;

10 . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl₃, e FeSO₄;

. 1 a 700 mg de um sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgCl₂ e Mg SO₄,

. 0,1 a 500 mg de Ca Cl₂,

15 . 0 a 50 mg de Zn Cl₂;

. 10 a 250 g de NaCl, de preferência 58,5 g/l, e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5.

26. Meio de cultura M1, de acordo com a reivindicação 22, compreendendo:

20 . 30 g de peptona de trigo;

. 5 g de extrato de levedo;

. 1 g de D-glicose H₂O,

. 120 mg de Fe Cl₃, 6 H₂O,

. 400 mg de MgCl₂, 6 H₂O,

25 . 10 mg de CaCl₂, 2 H₂O,

. 58,5 g de NaCl,

. 5 mg de Zn Cl₂,

. 6,8 g de (NH₄)₂SO₄,

. 6g de NH₄Cl e pH = 6,5.

30 27. Meio M2, adaptado a superprodução de polissacarídeo capsular, compreendendo por litro de meio de cultura:

. 52 a 100 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de

trigo;

. 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl;

5 . 0 a 15 g/l de um sal de magnésio, vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular 15 g/l de MgCl_2 , 6 H_2O ; e

. 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l em particular 0,25 g/l de D-glicose, H_2O ,

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7.

10 28. Meio de cultura M2, de acordo com a reivindicação 27, compreendendo por litro de meio de cultura: 93 g/l de peptona de trigo, 41 g/l de NaCl, 0,25 g/l de D-glicose H_2O e 15 g/l de MgCl_2 , 6 H_2O , cujo pH está compreendido em uma faixa de valor que vai de 6,3 a 6,7.

29. Meio M3, adaptado a superprodução de polissacarídio capsular, compreendendo por litro de meio de cultura:

15 . 65 a 85 g de extrato de levedo, vantajosamente 75 g de extrato de levedo;

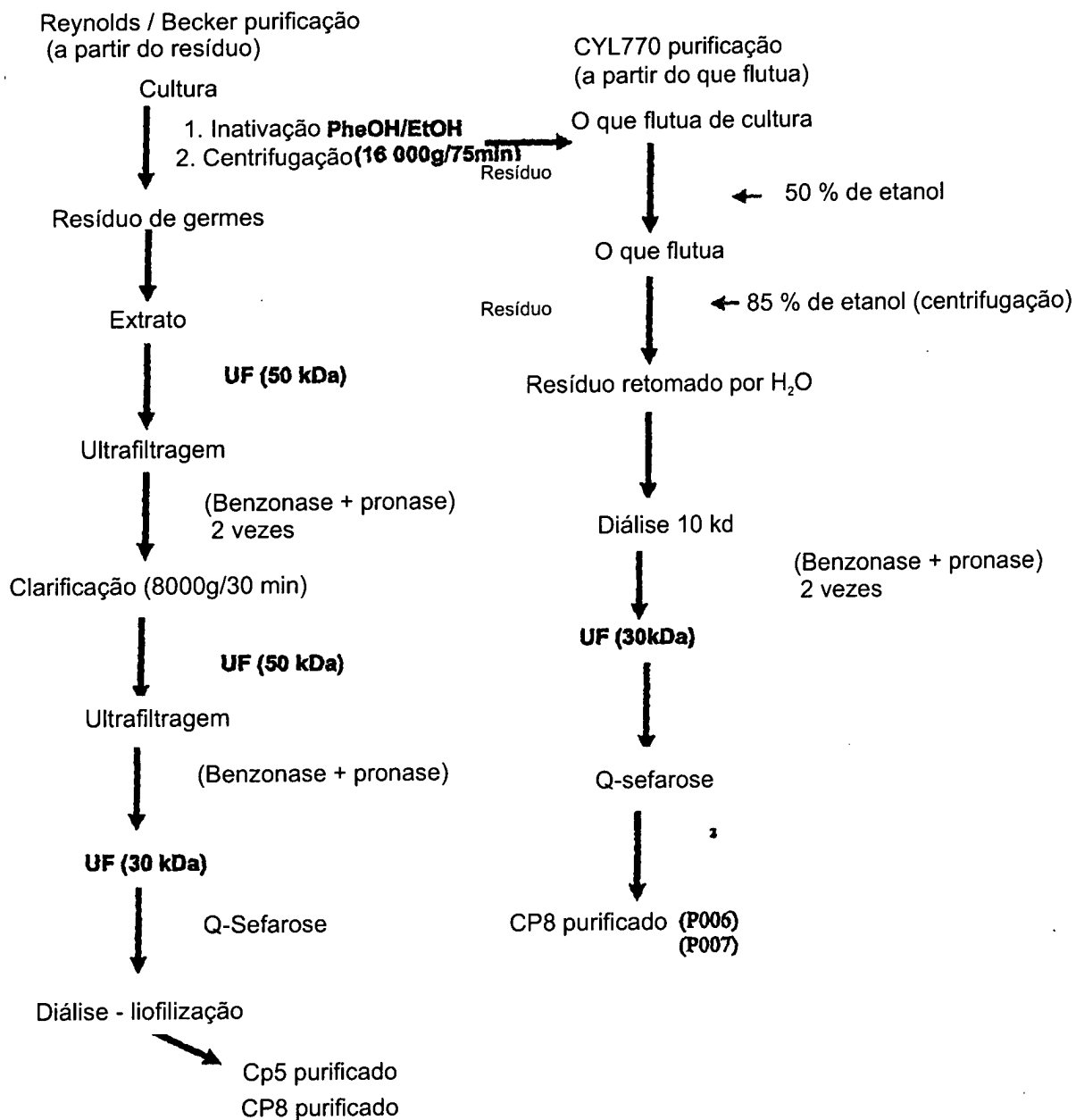
. 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl;

20 . 0 a 15 g/l de um sal de magnésio vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular a 15 g/l de MgCl_2 , 6 H_2O ; e

. 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l em particular 0,25 g/l de D-glicose, H_2O ,

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7.

FIG 1



RESUMO

Patente Invenção: **"PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS, SUPERPRODUTORAS"**.

- 5 A presente invenção refere-se a um processo de produção de uma cepa superprodutora de *Staphylococcus Aureus*, compreendendo: (a) a cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus*, sobre um meio de cultura M1, M2 ou M3 (b) eventualmente a recuperação das cepas assim produzidas a partir do meio de cultura, assim como a utilização dessas cepas para a produção de polissacarídeos.

Novo quadro reivindicatório (total de 29 reivindicações) para processamento na Fase Nacional Brasileira.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de uma cepa superprodutora de *Staphylococcus Aureus*, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) a cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M1, compreendendo por litro de meio de cultura:

- . 5 a 100 g de peptona vegetal;
- . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
- . 1 a 30 g de açúcar;
- . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que con-

10 siste em FeCl_3 , e FeSO_4 ;

. 1 a 700 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e Mg SO_4 ,

. 0,1 a 500 mg de Ca Cl_2 ,

. 0 a 50 mg de Zn Cl_2 ;

15 . 10 a 250 g de NaCl , de preferência 58,5 g/l, e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5; e

(b) eventualmente a recuperação das cepas a partir do meio de cultura.

2. Processo de produção de uma cepa superprodutora, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura M1 da etapa (a) compreende a peptona de trigo.

3. Processo de produção de uma cepa superprodutora, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que meio de cultura M1 compreende por litro de meio de cultura:

25 . 30 g de peptona de trigo;

. 5 g de extrato de levedo;

. 1 g de D-glicose H_2O ,

. 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O ,

. 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O ,

30 . 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O ,

. 58,5 g de NaCl ,

. 5 mg de Zn Cl_2 ,

- . 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- . 6g de NH_4Cl e pH = 6,5.

4. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o meio M1 consiste por litro em: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1 g de D-glicose H_2O , 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O , 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O , 58,5 g de NaCl , 5 mg de Zn Cl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6g de NH_4Cl e pH = 6,5.

5. Processo de produção de uma cepa superprodutora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, compreendendo uma etapa de pré-cultura sobre um meio de cultura M0, caracterizado pelo fato de que compreende:

- . 3 a 50 g de peptona vegetal;
- . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
- . 1 a 30 g de açúcar;
- . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 , e FeSO_4 ,
- . 1 a 700 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e Mg SO_4 ,
- . 0,1 a 50 mg de Ca Cl_2 ,
- . 0 a 50 mg de Zn Cl_2 ;
- . 2 a 50 g de NaCl , de preferência 6 g/l, e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5.

6. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o meio M0 da etapa de pré-cultura compreende 3,87 g ou 30 g de peptona de trigo.

7. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o meio M0 da etapa de pré-cultura compreende:

- . 3,87 ou 30 g de peptona de trigo;
- . 5 g de extrato de levedo;
- . 1 g de D-glicose H_2O ,
- . 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O ,

- . 400 mg de $\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$,
- . 10 mg de $\text{CaCl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$,
- . 6 g de NaCl ,
- . 5 mg de Zn Cl_2 ,
- 5 . 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- . 6g de NH_4Cl e $\text{pH} = 6,5$.

8. Processo de produção de uma cepa superprodutora de *Staphylococcus Aureus*, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) a cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M2, compreendendo por litro de meio de cultura:

. 52,5 a 100 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de trigo;

. 0 a 82,5 g de NaCl , vantajosamente de 5 g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl ;

15 . 0 a 15 g/l de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em MgSO_4 e MgCl_2 , vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular a 15 g/l de $\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$; e

. 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l em particular 0,25 g/l de D-glicose, H_2O , cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7; e

(b) eventualmente a recuperação das cepas a partir do meio de cultura.

9. Processo de produção de uma cepa superprodutora, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura M2 compreende, e vantajosamente consiste em 93 g/l de peptona de trigo, 41 g/l de NaCl , 0,25 g/l de D-glicose, H_2O e 15 g/l de $\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$, cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7.

10. Processo de produção de uma cepa superprodutora de *Staphylococcus Aureus*, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) a cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M3, compreendendo por litro de meio de cultura:

. 65 a 85 g de extrato de levedo, vantajosamente 75 g;

. 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl;

. 0 a 15 g/l de um sal de magnésio selecionado no grupo que consiste em MgSO_4 e MgCl_2 , vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular a 15 g/l; e

. 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l em particular 0,25 g/l de D-glicose, H_2O , cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7; e

(b) eventualmente a recuperação das cepas a partir do meio de cultura.

11. Processo de produção de uma cepa superprodutora *Staphylococcus Aureus* T5, caracterizado pelo fato de que o referido processo é de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

12. Processo de produção de uma cepa superprodutora de *Staphylococcus Aureus* T8, caracterizado pelo fato de que o referido processo é de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

13. Processo de produção de polissacarídio capsular, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) cultura de uma cepa de *Staphylococcus Aureus* sobre um meio de cultura M1, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou sobre um meio de cultura M2, tal como definido na reivindicação 8 ou 9, ou sobre um meio de cultura M3, tal como definido na reivindicação 10;

(a) a inativação da cultura assim produzida; e

(b) a recuperação do polissacarídio capsular.

14. Processo de produção de polissacarídio capsular, caracterizado pelo fato de que o meio M1 da etapa de cultura compreende a peptona de trigo.

15. Processo de produção de polissacarídio capsular, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o meio M1 da etapa de cultura compreende por litro de meio de cultura: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1g de D-glicose H_2O , 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O , 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O , 58,5 g de NaCl, 5

mg de Zn Cl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6g de NH_4Cl e $\text{pH} = 6,5$.

16. Processo de produção de polissacarídio capsular, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o M1 consiste, por litro de meio de cultura, em: 30 g de peptona de trigo, 5 g de extrato de levedo, 1g de D-glicose H_2O , 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O , 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O , 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O , 58,5 g de NaCl , 5 mg de Zn Cl_2 , 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6g de NH_4Cl e $\text{pH} = 6,5$.

17. Processo de produção de polissacarídio capsular de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de pré-cultura, tal como definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 7.

18. Cepa subprodutora de *Staphylococcus Aureus*, caracterizada pelo fato de que é obtida pelo processo como definido em qualquer uma das reivindicações 13 a 17.

19. Cepa subprodutora Reynolds, caracterizada pelo fato de que a referida cepa é de acordo com a reivindicação 18.

20. Cepa subprodutora Becker, caracterizada pelo fato de que a referida cepa é de acordo com a reivindicação 18.

21. Cepa subprodutora CYL 770, caracterizada pelo fato de que a referida cepa é de acordo com a reivindicação 18.

22. Cepa subprodutora CLY1892, caracterizada pelo fato de que a referida cepa é de acordo com a reivindicação 18.

23. Meio M0 adaptado à cultura de *Staphylococcus Aureus*, caracterizado pelo fato de que compreende:

- . 3 a 50 g de peptona vegetal;
- . 0,5 a 20 g de extrato de levedo;
- . 1 a 30 g de açúcar;
- . 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em FeCl_3 , e FeSO_4 ,
- . 1 a 700 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que consiste em MgCl_2 e Mg SO_4 ,
- . 0,1 a 50 mg de Ca Cl_2 ,

. 0 a 50 mg de Zn Cl_2 ;

. 2 a 50 g de NaCl , de preferência 6 g/l, e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5.

24. Meio M0 de acordo com a reivindicação 23, caracterizado
5 pelo fato de que compreende:

(a). 3,87 ou 30 g de peptona de trigo;

(b). 5 g de extrato de levedo;

(c). 1 g de D-glicose H_2O ,

(d). 120 mg de Fe Cl_3 , 6 H_2O ,

10 (e). 400 mg de MgCl_2 , 6 H_2O ,

(f). 10 mg de CaCl_2 , 2 H_2O ,

(g). 6 g de NaCl ,

(h). 5 mg de Zn Cl_2 ,

(i). 6,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

15 (j). 6g de NH_4Cl e pH = 6,5.

25. Meio de cultura M1 adaptado a superprodução de polissacac-
rídio capsular, caracterizado pelo fato de que compreende:

. 5 a 100 g de peptona vegetal;

. 0,5 a 20 g de extrato de levedo;

20 . 1 a 30 g de açúcar;

. 1 a 200 mg de um sal de ferro selecionado no grupo que con-
siste em FeCl_3 , e FeSO_4 ;

. 1 a 700 mg de um sal de magnésio selecionado no grupo que
consiste em MgCl_2 e Mg SO_4 ,

25 . 0,1 a 500 mg de Ca Cl_2 ,

. 0 a 50 mg de Zn Cl_2 ;

. 10 a 250 g de NaCl , de preferência 58,5 g/l, e

cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,2 a 7,5.

26. Meio de cultura M1, de acordo com a reivindicação 25, ca-
30 racterizado pelo fato de que compreende:

. 30 g de peptona de trigo;

. 5 g de extrato de levedo;

- . 1 g de D-glicose H_2O ,
- . 120 mg de $Fe Cl_3$, 6 H_2O ,
- . 400 mg de $MgCl_2$, 6 H_2O ,
- . 10 mg de $CaCl_2$, 2 H_2O ,
- 5 . 58,5 g de NaCl,
- . 5 mg de $Zn Cl_2$,
- . 6,8 g de $(NH_4)_2SO_4$,
- . 6g de NH_4Cl e pH = 6,5.

27. Meio M2, adaptado à superprodução de polissacarídeo capsular, caracterizado pelo fato de que compreende por litro de meio de cultura:

- . 52 a 100 g de peptona vegetal, vantajosamente a peptona de trigo;
- . 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl;
- 15 . 0 a 15 g/l de um sal de magnésio, vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular 15 g/l de $MgCl_2$, 6 H_2O ; e
- . 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l em particular 0,25 g/l de D-glicose, H_2O ,
- 20 cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7.

28. Meio de cultura M2, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que compreende por litro de meio de cultura: 93 g/l de peptona de trigo, 41 g/l de NaCl, 0,25 g/l de D-glicose H_2O e 15 g/l de $MgCl_2$, 6 H_2O , cujo pH está compreendido em uma faixa de valor que vai de 6,3 a 6,7.

29. Meio M3, adaptado a superprodução de polissacarídeo capsular, caracterizado pelo fato de que compreende por litro de meio de cultura:

- . 65 a 85 g de extrato de levedo, vantajosamente 75 g de extrato de levedo;
- 30 . 0 a 82,5 g de NaCl, vantajosamente de 5 g a 82,5 g, em particular 41 g/l de NaCl;

. 0 a 15 g/l de um sal de magnésio vantajosamente de 0,01 a 15 g/l, em particular a 15 g/l de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; e

. 0 a 7 g/l de açúcar, vantajosamente de 0,25 a 7 g/l em particular 0,25 g/l de D-glicose, H_2O ,

5 cujo pH está compreendido em uma faixa de valores que vai de 6,3 a 6,7.