

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5290748号
(P5290748)

(45) 発行日 平成25年9月18日(2013.9.18)

(24) 登録日 平成25年6月14日(2013.6.14)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20 A

C 1 2 P 19/04 (2006.01)

C 1 2 N 1/20 E

C 1 2 R 1/445 (2006.01)

C 1 2 P 19/04 C

C 1 2 N 1/20 A

C 1 2 R 1:445

請求項の数 9 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-508253 (P2008-508253)
 (86) (22) 出願日 平成18年4月21日(2006.4.21)
 (65) 公表番号 特表2008-538702 (P2008-538702A)
 (43) 公表日 平成20年11月6日(2008.11.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2006/000880
 (87) 国際公開番号 W02006/114500
 (87) 国際公開日 平成18年11月2日(2006.11.2)
 審査請求日 平成21年4月15日(2009.4.15)
 (31) 優先権主張番号 0504115
 (32) 優先日 平成17年4月25日(2005.4.25)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

前置審査

(73) 特許権者 592055820
 サノフィ・パストゥール
 S A N O F I P A S T E U R
 フランス69367リヨン・セデックス0
 7、アヴニュ・ボン・パストゥール2番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100156111
 弁理士 山中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 過剰産生黄色ブドウ球菌株の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を包含する、莢膜多糖の製造方法：

(a) 培地 M 1 あたり以下：

- ・ 5 ～ 1 0 0 g の植物ペプトン、
- ・ 0 . 5 ～ 2 0 g の酵母エキス、
- ・ 1 ～ 3 0 g の糖、
- ・ 1 ～ 2 0 0 m g の、 FeCl_3 および FeSO_4 からなる群より選択される鉄塩、
- ・ 1 ～ 7 0 0 m g の、 MgCl_2 および MgSO_4 からなる群より選択されるマグネシ

ウム塩、

- ・ 0 . 1 ～ 5 0 0 m g の CaCl_2 、
- ・ 0 ～ 5 0 m g の ZnCl_2 、
- ・ 1 0 ～ 2 5 0 g の NaCl を含み、そして

その pH は 6 . 2 ～ 7 . 5 の値の範囲内である培地 M 1 上で 5 型または 8 型黄色ブドウ球菌株を培養する工程、

(b) このようにして製造された培養物を不活性化する工程、および

(c) 莢膜多糖を回収する工程。

【請求項 2】

工程 (a) の培地 M 1 がコムギペプトンを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

10

20

工程 (a) の培地 M 1 が 5 8 . 5 g の N a C l を含む、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

培地 M 1 が培地 1 l あたり以下：

- ・ 3 0 g のコムギペプトン、
- ・ 5 g の酵母エキス、
- ・ 1 g の D - グルコース H_2O 、
- ・ 1 2 0 m g の $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、
- ・ 4 0 0 m g の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、
- ・ 1 0 m g の $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、
- ・ 5 8 . 5 g の N a C l、
- ・ 5 m g の $ZnCl_2$ 、
- ・ 6 . 8 g の $(NH_4)_2SO_4$ 、
- ・ 6 g の NH_4Cl を含み、そして $pH = 6 . 5$ である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項

記載の方法。

【請求項 5】

培地 M 1 が 1 l あたり以下： 3 0 g のコムギペプトン、 5 g の酵母エキス、 1 g の D - グルコース H_2O 、 1 2 0 m g の $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 4 0 0 m g の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 1 0 m g の $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、 5 8 . 5 g の N a C l、 5 m g の $ZnCl_2$ 、 6 . 8 g の $(NH_4)_2SO_4$ 、 6 g の NH_4Cl からなり、そして $pH = 6 . 5$ である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

培地 1 l あたり以下：

- ・ 3 ~ 5 0 g の植物ペプトン、
- ・ 0 . 5 ~ 2 0 g の酵母エキス、
- ・ 1 ~ 3 0 g の糖、
- ・ 1 ~ 2 0 0 m g の、 $FeCl_3$ および $FeSO_4$ からなる群より選択される鉄塩、
- ・ 1 ~ 7 0 0 m g の、 $MgCl_2$ および $MgSO_4$ からなる群より選択されるマグネシウム塩、

- ・ 0 . 1 ~ 5 0 m g の $CaCl_2$ 、
- ・ 0 ~ 5 0 m g の $ZnCl_2$ 、
- ・ 2 ~ 5 0 g の N a C l を含み、そして

その pH が 6 . 2 ~ 7 . 5 の値の範囲内である培地 M 0 上で前培養する工程を包含する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

前培養工程の培地 M 0 が 3 . 8 7 g または 3 0 g のコムギペプトンを含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前培養工程の培地 M 0 が 6 g の N a C l を含む、請求項 6 または 7 記載の方法。

【請求項 9】

前培養工程の培地 M 0 が培地 1 l あたり以下：

- ・ 3 . 8 7 または 3 0 g のコムギペプトン、
- ・ 5 g の酵母エキス、
- ・ 1 g の D - グルコース H_2O 、
- ・ 1 2 0 m g の $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、
- ・ 4 0 0 m g の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、
- ・ 1 0 m g の $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、
- ・ 6 g の N a C l、
- ・ 5 m g の $ZnCl_2$ 、
- ・ 6 . 8 g の $(NH_4)_2SO_4$ 、
- ・ 6 g の NH_4Cl を含み、そして $pH = 6 . 5$ である、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項

記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、過剰産生黄色ブドウ球菌株の製造方法および莢膜多糖の製造方法におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

黄色ブドウ球菌莢膜多糖（特に、血清型5および8の多糖）は、黄色ブドウ球菌に起因する感染症に対する防御を目的とするワクチンを製造するための目的の成分として文献に

10

【0003】

T5およびT8株は微小莢膜化（microcapsules）されており、それゆえ少量の目的の莢膜多糖を産生する。ワクチン中に含めなければならない莢膜多糖の量は、標的化される集団の免疫系欠損ゆえにかなりの量である（例えば、Fattom, A., et al (1995) Vaccine 13, 1288-1293を参照のこと）。

【0004】

そのようなワクチンの工業的開発の場合、それゆえ、多量のT5およびT8莢膜多糖の製造が可能であることが重要である。

【0005】

20

この観点をもって、本発明者らは黄色ブドウ球菌株が莢膜多糖を分泌する能力を実質的に増加させる新規の方法を示した。それゆえ、本発明者らは、多量に黄色ブドウ球菌莢膜多糖を得ることを可能にする製造方法を提供する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

第1の態様によれば、本発明はそれゆえ、以下の工程を包含する、過剰産生黄色ブドウ球菌株の製造方法に関する：

（a）培地1あたり以下：

・ 5～100gの植物ペプトン、

・ 0.5～20gの酵母エキス、

・ 1～30gの糖、

・ 1～200mgの、FeCl₃およびFeSO₄からなる群より選択される鉄塩、

・ 1～700mgの、MgCl₂およびMgSO₄からなる群より選択されるマグネシウム塩、

・ 0.1～500mgのCaCl₂、

・ 0～50mgのZnCl₂、

・ 10～250gのNaCl、好ましくは58.5g/lを含み、そして

そのpHは6.2～7.5の値の範囲内である培地M1上で黄色ブドウ球菌株を培養する工程、ならびに

40

（b）株を培地から回収してもよい工程。

【0007】

過剰産生株の製造方法の特定の実施態様によれば、工程（a）の培地M1はコムギペプトンを含む。

【0008】

過剰産生株の製造方法の有利な実施態様によれば、培地M1は培地1あたり以下：

・ 30gのコムギペプトン、

・ 5gの酵母エキス、

・ 1gのグルコース、

・ 120mgのFeCl₃塩、

50

- ・ 400 mg の $MgCl_2$ 塩、
- ・ 10 mg の $CaCl_2$ 、
- ・ 58.5 g の $NaCl$ 、
- ・ 5 mg の $ZnCl_2$ 、
- ・ 6.8 g の $(NH_4)_2SO_4$ 、
- ・ 6 g の NH_4Cl を含み、そして $pH = 6.5$ である。

【0009】

別の有利な実施態様によれば、培地 M1 は 1 l あたり以下：30 g のコムギペプトン、5 g の酵母エキス、1 g の D - グルコース H_2O 、120 mg の $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、400 mg の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10 mg の $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、58.5 g の $NaCl$ 、5 mg の $ZnCl_2$ 、6.8 g の $(NH_4)_2SO_4$ および 6 g の NH_4Cl からなり、そして $pH = 6.5$ である。

10

【0010】

特定の実施態様によれば、過剰産生株の製造方法は以下：

- ・ 3 ~ 50 g の植物ペプトン、
- ・ 0.5 ~ 20 g の酵母エキス、
- ・ 1 ~ 30 g の糖、
- ・ 1 ~ 200 mg の、 $FeCl_3$ および $FeSO_4$ からなる群より選択される鉄塩、
- ・ 1 ~ 700 mg の、 $MgCl_2$ および $MgSO_4$ からなる群より選択されるマグネシウム塩、

20

- ・ 0.1 ~ 50 mg の $CaCl_2$ 、

- ・ 0 ~ 50 mg の $ZnCl_2$ 、

- ・ 2 ~ 50 g の $NaCl$ 、好ましくは 6 g / l を含み、そして

その pH は 6.2 ~ 7.5 の値の範囲内である前培養培地 M0 上で前培養する工程を包含する。

【0011】

過剰産生株の製造方法の特定の実施態様によれば、前培養工程は、1 l あたり 3.87 g のコムギペプトンを含む前培養培地 M0 を使用する。

【0012】

過剰産生株の製造方法の別の実施態様によれば、前培養工程は、1 l あたり 30 g のコムギペプトンを含む前培養培地 M0 を使用する。

30

【0013】

過剰産生株の製造方法の有利な実施態様によれば、前培養工程は、以下：3.87 g のコムギペプトン、5 g の酵母エキス、1 g の D - グルコース H_2O 、120 mg の $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、400 mg の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10 mg の $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、6 g の $NaCl$ 、5 mg の $ZnCl_2$ 、6.8 g の $(NH_4)_2SO_4$ 、6 g の NH_4Cl 、15 g / l の寒天を含み、そして $pH = 6.5$ である寒天前培養培地 M0 を使用する。

【0014】

過剰産生株の製造方法の別の有利な実施態様によれば、前培養工程は、以下：30 g のコムギペプトン、5 g の酵母エキス、1 g の D - グルコース H_2O 、120 mg の $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、400 mg の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10 mg の $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、6 g の $NaCl$ 、5 mg の $ZnCl_2$ 、6.8 g の $(NH_4)_2SO_4$ 、6 g の NH_4Cl を含み、そして $pH = 6.5$ である液体前培養培地 M0 を使用する。

40

【0015】

1 つの実施態様によれば、上記の方法は、黄色ブドウ球菌 T5 の過剰産生株の製造方法である。

【0016】

別の実施態様によれば、上記の方法は、黄色ブドウ球菌 T8 の過剰産生株の製造方法である。

50

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、上記の方法によって得られる過剰産生株、および莢膜多糖を製造するためのこの株の使用に関する。それゆえ、本発明は特に、上記の方法によって得られる過剰産生 R e y n o l d s 株、過剰産生 B e c k e r 株および過剰産生 C Y L 7 7 0 株に関する。

【 0 0 1 8 】

別の態様によれば、本発明はそれゆえ、以下の工程を包含する、莢膜多糖の製造方法を提供する：

- (a) 上記の培地 M 1 上で黄色ブドウ球菌株を培養する工程、
- (b) このようにして製造された培養物を不活性化する工程、および
- (c) 莢膜多糖を回収する工程。

10

【 0 0 1 9 】

莢膜多糖の製造方法の 1 つの実施態様によれば、培養工程はコムギペプトンを含む培地 M 1 を使用する。

【 0 0 2 0 】

1 つの実施態様によれば、莢膜多糖の製造方法は、過剰産生株の製造方法に関連して記載する前培養工程を包含する。

【 0 0 2 1 】

本発明の主題はまた、以下：

- ・ 3 ～ 5 0 g の植物ペプトン、
- ・ 0 . 5 ～ 2 0 g の酵母エキス、
- ・ 1 ～ 3 0 g の糖、
- ・ 1 ～ 2 0 0 m g の、 F e C l ₃ および F e S O ₄ からなる群より選択される鉄塩、
- ・ 1 ～ 7 0 0 m g の、 M g C l ₂ および M g S O ₄ からなる群より選択されるマグネシウム塩、
- ・ 0 . 1 ～ 5 0 m g の C a C l ₂ 、
- ・ 0 ～ 5 0 m g の Z n C l ₂ 、
- ・ 2 ～ 5 0 g の N a C l 、好ましくは 6 g / l を含み、そして

20

その p H は 6 . 2 ～ 7 . 5 の値の範囲内である、黄色ブドウ球菌の培養に適切な培地 M 0 であり、

30

そして、それは好ましくは、 1 l あたり以下： 3 . 8 7 g または 3 0 g のコムギペプトンおよび 5 g の酵母エキス、 1 g の D - グルコース H ₂ O 、 1 2 0 m g の F e C l ₃ ・ 6 H ₂ O 、 4 0 0 m g の M g C l ₂ ・ 6 H ₂ O 、 1 0 m g の C a C l ₂ ・ 2 H ₂ O 、 6 g の N a C l 、 5 m g の Z n C l ₂ 、 6 . 8 g の (N H ₄) ₂ S O ₄ 、 6 g の N H ₄ C l を含み、有利にはそれらからなり、そして p H = 6 . 5 である寒天または液体培地 M 0 に関する。

【 0 0 2 2 】

本発明の主題はまた、以下：

- ・ 5 ～ 1 0 0 g の植物ペプトン、
- ・ 0 . 5 ～ 2 0 g の酵母エキス、
- ・ 1 ～ 3 0 g の糖、
- ・ 1 ～ 2 0 0 m g の、 F e C l ₃ および F e S O ₄ からなる群より選択される鉄塩、
- ・ 1 ～ 7 0 0 m g の、 M g C l ₂ および M g S O ₄ からなる群より選択されるマグネシウム塩、
- ・ 0 . 1 ～ 5 0 0 m g の C a C l ₂ 、
- ・ 0 ～ 5 0 m g の Z n C l ₂ 、
- ・ 1 0 ～ 2 5 0 g の N a C l 、好ましくは 5 8 . 5 g / l を含み、そして

40

その p H は 6 . 2 ～ 7 . 5 の値の範囲内である、黄色ブドウ球菌莢膜多糖の過剰産生に適切な培地 M 1 であり、

そして、それは好ましくは、 1 l あたり以下： 3 0 g のコムギペプトン、 5 g の酵母エキ

50

ス、1 g の D - グルコース H_2O 、120 mg の $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、400 mg の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10 mg の $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、58.5 g の $NaCl$ 、5 mg の $ZnCl_2$ 、6.8 g の $(NH_4)_2SO_4$ 、6 g の NH_4Cl を含み、有利にはそれらからなり、そして $pH = 6.5$ である培地 M 1 に関する。

【0023】

本発明者らは、上記の培地 M 1 が単純化培地 M 2 によって有利に置換され得ることを示した。従って、本発明はまた、培地 M 1 が下記の培地 M 2 によって置換される、上記の過剰産生黄色ブドウ球菌株の製造方法および莢膜多糖の製造方法に関する。

【0024】

従って、本発明の主題はまた、培地 1 l あたり以下：

- ・ 52.5 ~ 100 g の植物ペプトン、有利にはコムギペプトン、
 - ・ 0 ~ 82.5 g の $NaCl$ 、有利には 5 g の ~ 82.5 g、特に 41 g / l の $NaCl$ 、
 - ・ 0 ~ 15 g / l のマグネシウム塩、有利には 0.01 ~ 15 g / l、特に 15 g / l の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、および
 - ・ 0 ~ 7 g / l の糖、有利には 0.25 ~ 7 g / l、特に 0.25 g / l の D - グルコース H_2O を含み、
- その pH は 6.3 ~ 6.7、有利には 6.4 ~ 6.6 の値の範囲内である培地 M 2 である。

【0025】

特定の実施態様によれば、培地 M 2 は以下：93 g / l のコムギペプトン、41 g / l の $NaCl$ 、0.25 g / l の D - グルコース $\cdot H_2O$ および 15 g / l の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ を含み、有利にはそれから構成され、その pH は 6.3 ~ 6.7 の値の範囲内である。

【0026】

本発明者らはまた、植物ペプトンが 65 ~ 85 g / l、有利には 75 g / l の酵母エキスによって置換された培地 M 2 に対応する培地 M 3 が使用され得ることを示した。従って、本発明はまた、培地 M 1 が下記の培地 M 3 によって置換される、上記の過剰産生黄色ブドウ球菌株の製造方法および莢膜多糖の製造方法に関する。

【0027】

従って、本発明の主題はまた、培地 1 l あたり以下：

- ・ 65 ~ 85 g の酵母エキス、有利には 75 g / l の酵母エキス、
 - ・ 0 ~ 82.5 g の $NaCl$ 、有利には 5 g ~ 82.5 g の、特に 41 g / l の $NaCl$ 、
 - ・ 0 ~ 15 g / l のマグネシウム塩、有利には 0.01 ~ 15 g / l、特に 15 g / l の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、および
 - ・ 0 ~ 7 g / l の糖、有利には 0.25 ~ 7 g / l、特に 0.25 g / l の D - グルコース H_2O を含み、
- その pH は 6.3 ~ 6.7 の値の範囲内である培地 M 3 である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

本発明を、多糖を回収するためのプロトコルの描写を提供する図 1 を参照して、以下の説明においてさらに詳細に説明する。

【0029】

本発明者らは、驚くべきことに、培地 M 1、M 2 および M 3 が、黄色ブドウ球菌株が莢膜多糖を分泌する能力の実質的な増加を誘導することを実証した。増加は、下記の実施例 2.4 に記載の E L I S A 法によって、製造された莢膜多糖の量を測定することによって実証され得る。増加した分泌能力を示す黄色ブドウ球菌株は、本発明の関連において、過剰産生株と呼ばれる。

【0030】

本発明の関連において、用語「過剰産生株」はそれゆえ、培地M1またはM2またはM3上で培養した後に、同じ培養条件下でポートル(Poutrel)培地(培地の説明についてPoutrel, B et al. (1995). Clin Diagn Lab Immunol 2, 166-171、または下記の実施例1.1を参照のこと)上で同じ出発株を培養することによって産生されるものより少なくとも3倍、好ましくは5倍、そして有利には10倍多い量の莢膜多糖(mg/ml)(実施例2.4に記載のELISA法によって決定される)を産生する黄色ブドウ球菌株を意味することが意図される。

【0031】

組換え株の場合、用語「過剰産生株」は、培地M1またはM2またはM3上で培養した後に、同じ培養条件下でTSB培地(培地の説明について実施例1.5を参照のこと)上で同じ出発株を培養することによって産生されるものの少なくとも2倍量の莢膜多糖(mg/l)(実施例2.4に記載のELISA法によって決定される)を産生する組換え黄色ブドウ球菌株を意味することが意図される。

【0032】

本発明者らは、驚くべきことに、過剰産生株の製造方法が、黄色ブドウ球菌T5およびT8株に適用可能であることを実証した。本発明者らはまた、本発明による方法がまた、その莢膜多糖を過剰産生するように遺伝子改変された組換え株に適用可能であることを観察した。本発明者らは、T8莢膜多糖を多量に産生するように遺伝子改変されたCYL770株に本発明による方法を適用することによってこの態様を実証した。それが培地M1またはM2またはM3上で培養された後、下記の実施例において記載されるように、この株がT8莢膜多糖を分泌する能力は2の係数で増加する。

【0033】

本発明の関連において、用語「黄色ブドウ球菌株」はそれゆえ、血清型T5および/またはT8の多糖を含む莢膜または微小莢膜(microcapsule)を発現する任意の黄色ブドウ球菌株を意味することが意図される。適切な株の非限定的な例として、Newman(T5)、Reynolds(T5)、Lowenstein(T5)、Becker(T8)、Wright(T8)、CYL770(T8)およびCYL1892(T5)株に言及し得る。

【0034】

これらの株は、種々の研究所からまたは種々の収集物において入手可能であり；特に以下に言及し得る：Pasteur Institute Collection(CIP)：Reynolds CIP 103313、Becker CIP 103314、またはATCC：Wright ATCC 9525、Lowenstein ATCC 49521。本発明の関連において、CYL770(T8)およびReynolds(T5)株が、好適に使用される。CYL770株は、より多量のT8莢膜多糖を産生するように遺伝子改変されたBecker株である。この株は、本発明による過剰産生株の製造方法において、そしてまた本発明による多糖の製造方法において出発株として有利に使用され得る。CYL770株の説明は、Luong, T.TおよびLee, C.Yによる論文(2002), Infect. Immun. 70: 3389-3395において与えられる。CYL1892株は、以下の改変を有する、LuongおよびLeeによって記載される方法(2002 Infect. Immun. 70: 3389-3395)に従ってcap5オペロンプロモーターが黄色ブドウ球菌のM株のcap1オペロンの強い構成性プロモーターと置換されたReynolds株(CIP 103313)から得られた組換え黄色ブドウ球菌株を示す：相同配列がReynolds株の等価な相同配列と置換されており、プラスミドpCL52.2が、温度感受性複製起点を含みそしてcatマーカー(クロラムフェニコールに対する耐性を与えるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)を含むプラスミドpCL10と置換されている。簡潔に記載すると、Pcap1プロモーターを含む約250bpのフラグメントに融合されたReynolds株のcap5 ORFを含む約1kbのDNAフラグメントが、重複PCR

10

20

30

40

50

技術によって構築される。c a p 5 A 遺伝子上流の配列を含む約 1 k b の DNA フラグメントが、R e y n o l d s 株のゲノムから P C R によって増幅される。続いて、2 つのフラグメントが、P c a p 5 プロモーターが P c a p 1 プロモーターと置換されるように、温度感受性複製起点を保有しそして c a t マーカーを含むプラスミド p C L 1 0 中にクローン化される。続いて、このようにして構築されたプラスミドが R N 4 2 2 0 株中に電気穿孔され、次いでバクテリオファージ 5 2 を使用する形質導入によって R e y n o l d s 株中へ導入される。プラスミドの複製起点の温度感受性は、続いて、その複製をブロックしつつ、同時にクロラムフェニコールでの選択を適用することによって相同組換えを促進することを可能にする。

【 0 0 3 5 】

10

本発明の関連において、用語「莢膜多糖」は、黄色ブドウ球菌株の T 5 および / または T 8 莢膜多糖を意味し、それに由来するフラグメントも意味することが意図される。

【 0 0 3 6 】

本発明の関連において、用語「培地」は、動物起源のタンパク質を含まない培地を意味することが意図される。

【 0 0 3 7 】

表現「動物起源のタンパク質」は、動物起源の材料から得られたタンパク質およびそれに由来する任意の産物（例えば、動物タンパク質の化学的処理から生じた誘導体）を意味することが意図される。それはまた、これらの動物タンパク質の部分的または全体的加水分解の産物（例えば、それに由来するペプトン、ポリペプチド、ペプチド、もしくはアミノ酸）を意味することが意図される。

20

【 0 0 3 8 】

本発明による過剰産生株の製造方法は、(a) 黄色ブドウ球菌株を培養する工程を包含する。1 つの実施態様によれば、培養工程は、以下：

- ・ 5 ~ 1 0 0 g の植物ペプトン、
 - ・ 0 . 5 ~ 2 0 g の酵母エキス、
 - ・ 1 ~ 3 0 g の糖、
 - ・ 1 ~ 2 0 0 m g の、F e C l ₃ および F e S O ₄ からなる群より選択される鉄塩、
 - ・ 1 ~ 7 0 0 m g の、M g C l ₂ および M g S O ₄ からなる群より選択されるマグネシウム塩、
 - ・ 0 . 1 ~ 5 0 m g の C a C l ₂、
 - ・ 0 ~ 5 0 m g の Z n C l ₂、
 - ・ 1 0 ~ 2 5 0 g の N a C l、好ましくは 5 8 . 5 g / l を含み、そして
- その pH は 6 . 2 ~ 7 . 5 の値の範囲内である培地 M 1 を使用する。

30

【 0 0 3 9 】

使用される培地 M 1 中のタンパク質窒素供給源は、主に植物ペプトンによって提供される。

【 0 0 4 0 】

本発明の関連において、用語「植物ペプトン」は、以下からなる群より選択されるペプトンを意味することが意図される：コムギペプトンおよびエンドウマメペプトン。一般に植物ペプトンは、最高のタンパク質含量を含む植物の部分（例えば、コムギ麦芽）から一般に抽出されるタンパク質の酵素的または化学的処理によって得られる加水分解産物の形態である。好ましくは、化学的に修飾されていない植物が使用される。化学的処理の場合、タンパク質抽出物は、高温条件下および加圧下で塩酸の作用に供される。次いで、加水分解産物は、水酸化ナトリウムを用いて中和され、次いで、固体副生成物がそれから除去される。酵素処理の場合、タンパク質抽出物は、通常、パepsinを用いて消化される。得られるペプトンは、主にアミノ酸、および MW が 1 K D である小ペプチドの混合物からなる。MW が > 1 K D であるペプチドは、混合物の 3 0 % 未満を表す。H y - P e a 7 4 0 4 (Q u e s t から r e f 5 7 1 0 5 6 5) および P e p t o n e d e b l e E 1 (O r g a n o t e c h n i e から r e f 1 9 5 5 9) の名称で参照される

40

50

市販の調製物は、本発明の関連において使用され得る植物ペプトン加水分解産物の例である。

【0041】

培地 M1 中で使用される植物ペプトンの濃度は、ペプトンのタンパク質窒素含量を考慮し、そして酵母エキスの濃度を考慮することによって選択される。この含量は、ケルダール法によって算出される。さらなる詳細について、例えば、Lynch J. M. et al., J. AOAC Int. (1999) 82 (6): 1389-98 による論文が参照され得る。通常、選択された植物ペプトンのタンパク質窒素含量は、8% ~ 15% (重量/重量) の間である。この値の範囲において、使用され得る植物ペプトンの濃度は、5 ~ 100 g/l 培地、好ましくは 20 ~ 50 g/l、そして特に 30 g/l である。

10

【0042】

使用される培地 M1 中のタンパク質窒素供給源はまた、酵母エキスによって提供される。酵母エキス中のタンパク質窒素含量は、一般に 9 ~ 13% (重量/重量) である。酵母エキスは、0.5 ~ 20 g/l 培地の濃度、特に 5 g/l の濃度で使用される。培地中のタンパク質窒素はまた、無機塩の形態で提供され得る；例として、アンモニウム塩（例えば、塩化物または硫酸塩）に言及し得る。この無機塩は、他の窒素供給源によって提供される量に従って調整される濃度で使用され得る。

【0043】

タンパク質窒素供給源の濃度は、全タンパク質窒素含量が、培養の間の有毒な老廃物の蓄積の原因であり得る窒素異化亢進を生じないように調整される。さらに、酵母エキスによって提供されるビタミンの過剰に起因する実質的な阻害効果の出現を防止するために、後者は、タンパク質窒素の二次的な供給源としてののみ、好ましくは 5 g/l の濃度で使用される。

20

【0044】

有利な実施態様によれば、培地 M1 は、培地 1 l あたり 30 g のペプトン（好ましくは、コムギペプトン）および 5 g の酵母エキスを含む。

【0045】

培地はまた、糖供給源を含む。

【0046】

本発明の関連において、用語「糖供給源」は、細菌によって代謝され得る非動物起源の糖の任意の供給源（例えば、フルクトース、リボース、キシロース、フコースまたはグルコース）を意味することが意図される。1 ~ 30 g/l 培地の糖の濃度が、使用され得る。例えば、グルコースについて、1 g/l の濃度が有利には使用される。

30

【0047】

培地 M1 はまた、無機塩、特に鉄、マグネシウム、カルシウム、亜鉛およびナトリウム塩、好ましくは塩化物を以下の量で含む：

- 培地 1 l あたり、1 ~ 200 mg の、 FeCl_3 および FeSO_4 からなる群より選択される鉄塩、特に 120 mg の FeCl_3 ；
- 培地 1 l あたり、1 ~ 700 mg の、 MgCl_2 および MgSO_4 からなる群より選択されるマグネシウム塩、特に 400 mg の MgCl_2 ；
- 培地 1 l あたり、0.5 ~ 50 mg の CaCl_2 、特に 10 mg の CaCl_2 ；
- 培地 1 l あたり、0 ~ 50 mg の ZnCl_2 、特に 5 mg の ZnCl_2 ；および
- 培地 1 l あたり、10 ~ 250 g の NaCl 、好ましくは 58.5 g。

40

【0048】

Fe 、 Ca および Mg の無機塩は、通常、水和形態で使用される。本発明の関連において、以下の水和塩が培地中で使用された： $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

【0049】

培地 M1 は、6.2 ~ 7.5 の値の範囲内、好ましくは 6.5 の初期 pH を有し；これ

50

を行うために、その緩衝能力のために通常使用され、上記の値の範囲のpHを得ることを可能にする任意の無機塩が、必要に応じて使用され得る。pHを決定するために、周囲温度においてpHメーターを使用して、それが測定される。

【0050】

培地M1はまた、グリセロリン酸および/またはグリシンベタインのような浸透圧調節剤を、グリシンベタインについては1~10mM、およびグリセロリン酸については50~100mMの濃度で含み得、これはNaCl濃度が1M(58g/l)超である場合に添加することが有利であり得る。

【0051】

使用される培地M1は、液体培地に好適に対応する。しかし、それは固体形態であり得る。固体または寒天形態は、ゲル形成物質(通常、寒天)の液体培地への10~30g/l培地の濃度での添加によって得られる。

【0052】

有利な実施態様によれば、培地M1は、1lあたり以下: 30gのコムギペプトン、5gの酵母エキス、1gのD-グルコースH₂O、120mgのFeCl₃・6H₂O、400mgのMgCl₂・6H₂O、10mgのCaCl₂・2H₂O、58.5gのNaCl、5mgのZnCl₂、6.8gの(NH₄)₂SO₄、および6gのNH₄Clを含み、好ましくはそれらからなり、そして6.5のpHを有する。

【0053】

培養工程は、培地M1に接種物(例えば、0.2の初期OD_{680nm}を有する)を播種し、そして37において、例えば約48~72時間の期間、5~10%の濃度でCO₂を含み得る雰囲気中で(5型についてはCO₂なし、Becker株の使用の場合はCO₂あり)培養することによって実施され得る。培養容量は、必要に応じて変動し得る。400ml~20lの容量またはより大きな容量(例えば、30l~100l)が、使用され得る。培養容器の容量に対する培地の容量の比率20%(V/V)が維持される。より大きな容量について、酸素負荷は、酸素圧を調整することおよび適切な攪拌によって培養の間に確認されそして調節される。

【0054】

培養工程は、必要に応じて、バイオマスおよび製造される多糖の量を増加させるために、漸増容量中での連続培養を含み得る。

【0055】

有利な実施態様によれば、過剰産生株の製造方法は、1lあたり以下:

- ・ 1~3gの植物ペプトン、
- ・ 0.5~20gの酵母エキス、
- ・ 1~30gの糖、
- ・ 1~200mgの、FeCl₃およびFeSO₄からなる群より選択される鉄塩、
- ・ 1~700mgの、MgCl₂およびMgSO₄からなる群より選択されるマグネシウム塩、
- ・ 0.1~50mgのCaCl₂、
- ・ 0.1~50mgのZnCl₂、
- ・ 0~50gのNaCl、好ましくは6g/lを含み、そして

そのpHは6.2~7.5の値の範囲内である前培養培地M0上で前培養する工程を包含する。

【0056】

種々の構成物の定義については、培地M1に関連して上記に与えられる定義に言及し得る。

【0057】

一方、前培養工程の場合、前培養培地1lあたり3.87または30gのペプトン、特にコムギペプトンが、好適に使用される。培地M0中のNaClの濃度は、好ましくは6g/lである。前培養工程における前培養培地M0は、好ましくは、1lあたり3.87

10

20

30

40

50

gのコムギペプトンを含む寒天培地、または1 lあたり30 gのコムギペプトンを含む液体培地のいずれかである。

【0058】

有利な実施態様によれば、前培養工程は、1 lあたり以下：30 gのコムギペプトン、5 gの酵母エキス、1 gのD-グルコース H_2O 、120 mgの $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、400 mgの $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10 mgの $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、6 gの $NaCl$ 、5 mgの $ZnCl_2$ 、6.8 gの $(NH_4)_2SO_4$ 、および6 gの NH_4Cl を含み、好ましくはそれらからなり、そして $pH = 6.5$ である前培養培地M0上で株を培養することによって実施される。

【0059】

別の有利な実施態様によれば、前培養工程は、以下：3.87 gのコムギペプトン（または液体培地M0については30 g/l）、5 gの酵母エキス、1 gのD-グルコース H_2O 、120 mgの $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、400 mgの $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10 mgの $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、6 gの $NaCl$ 、5 mgの $ZnCl_2$ 、6.8 gの $(NH_4)_2SO_4$ 、および6 gの NH_4Cl を含み、好ましくはそれらからなり、そして $pH = 6.5$ である液体または寒天前培養培地M0上で株を培養することによって実施される。

【0060】

前培養工程は、接種物を増幅することを可能にする。それは、前培養培地M0に黄色ブドウ球菌株（例えば、 $1 \times 10^7 CFU$ の割合で）を播種し、そして37 °Cにおいて、例えば5時間～20時間の範囲であり得る期間、5～10%（容量）の CO_2 を含み得る雰囲気中で（T5については CO_2 なし、Becker株が使用される場合は CO_2 の存在下）インキュベートすることによって実施され得る。バイオマスを増加させるために、前培養工程は、培地M0の漸増容量中での連続前培養を含み得る。次いで、前培養物は、液体培地M1に播種するために使用される。これを行うために、初期OD_{680nm}が0.2であるような接種物の量が使用され得る。前培養工程における培養容量は、通常400 ml～20 lで変動し得る。容器の容量に対する前培養培地の容量の比率20%以下が、好ましくは維持される。

【0061】

培養工程の後、このようにして製造された株は遠心分離によって回収され得、そして凍結乾燥産物、または20%グリセロールの添加後の凍結産物の形態で保存され得るか、またはより大きな容量の培地に播種するために直接使用され得、そうでなければ本発明による莢膜多糖の製造方法において直接使用され得る。

【0062】

有利な実施態様によれば、上記の製造方法は、過剰産生Reynolds株の製造方法に対応する。

【0063】

別の有利な実施態様によれば、上記の製造方法は、過剰産生CYL770株の製造方法に対応する。

【0064】

本発明はまた、上記の方法によって製造された過剰産生黄色ブドウ球菌株（特に、Reynolds、BeckerおよびCYL770株）に関する。

【0065】

本発明者らは、培地M1が単純化され得、そして本発明による方法の関連において下記の培地M2と置換され得ることを示す実験計画を実施した。

【0066】

別の実施態様によれば、工程(a)はそれゆえ、培地1 lあたり以下：

- ・ 52.5～100 gの植物ペプトン、有利にはコムギペプトン、
- ・ 0～82.5 gの $NaCl$ 、有利には5 g～82.5 g、特に41 g/lの $NaCl$ 、
- ・ 0～15 g/lのマグネシウム塩、有利には0.01～15 g/l、特に15 g/l

10

20

30

40

50

の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、および

・ $0 \sim 7 \text{ g/l}$ の糖、有利には $0.25 \sim 7 \text{ g/l}$ 、特に 0.25 g/l の D - グルコース・ H_2O を含み、

・ その pH は $6.3 \sim 6.7$ の値の範囲内である培地 M2 を使用する。

【0067】

使用される用語の定義については、培地 M1 に関連して上記した定義が参照される。

【0068】

実験計画の結果は、植物ペプトンが少なくとも 5 % の全糖含量を含む場合、培地 M2 に糖を添加する必要はないことを示す。後者は、糖の混合物（例えば、フルクトース、グルコース、マンノトリオース、ラフィノース、スクロースまたはスタキオース）を含み得る。そうでない場合、別の糖の供給源を培地に添加する必要がある。糖は $0.25 \text{ g/l} \sim 7 \text{ g/l}$ の割合で添加され得る。

10

【0069】

有利な実施態様によれば、培地 M2 は 0.25 g/l の糖、特に D - グルコース・ H_2O を含む。

【0070】

培地 M2 は、有利には、 MgCl_2 および MgSO_4 からなる群より選択されるマグネシウム塩を含み得る。本発明者らは、マグネシウム塩の添加が培地の頑強性を増加させることを可能にすることを示した（構成物の変動範囲は、 MgCl_2 の存在下で、実質的により狭い）。塩化マグネシウム、特に $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ は、それゆえ、 $0.01 \text{ g/l} \sim 15 \text{ g/l}$ 培地の範囲で培地 M2 に有利に添加され得る。培地 M2 が 15 g/l の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を含む場合、最も高い頑強性が観察される。より高い濃度のマグネシウム塩は、いずれのさらなる頑強性の増加ももたらさない。

20

【0071】

本発明者らはまた、改善された多糖生産性が、NaCl 濃度の広い範囲内にある培地 M2 を用いて観察されることを示した。詳細には、NaCl は非存在であるか、または $5 \text{ g/l} \sim 100 \text{ g/l}$ 、有利には $5 \text{ g/l} \sim 82.5 \text{ g/l}$ 培地の濃度範囲内で使用されるかのいずれかであり得る。

【0072】

さらに、実験計画は、ペプトンの濃度と NaCl の濃度との間に強い相互作用が存在することを示すことを可能にした。従って、本発明による方法の関連において有利に使用され得る濃度範囲を定義することが可能となった。

30

【0073】

特に有利な実施態様によれば、上記の培地 M2 は、 $52.5 \sim 70 \text{ g}$ の植物ペプトン、有利にはコムギペプトン、および $5 \sim 37 \text{ g}$ の NaCl を含む。

【0074】

別の特に有利な実施態様によれば、上記の培地 M2 は、 $66 \sim 82.5 \text{ g}$ の植物ペプトン、有利にはコムギペプトン、および $22 \sim 74 \text{ g}$ の NaCl を含む。

【0075】

別の特に有利な実施態様によれば、上記の培地 M2 は、 $60 \sim 90.5 \text{ g}$ の植物ペプトン、有利にはコムギペプトン、および $35 \sim 63.5 \text{ g}$ の NaCl を含む。

40

【0076】

別の特に有利な実施態様によれば、上記の培地 M2 は、 $79 \sim 95 \text{ g}$ の植物ペプトン、有利にはコムギペプトン、および $46 \sim 82.5 \text{ g}$ の NaCl を含む。

【0077】

これらの 4 つの実施態様による培地 M2 は、有利には、 0.25 g/l のグルコース、特に D - グルコース、および 15 g/l の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を含み得る。

【0078】

特定の実施態様によれば、培地 M2 は、 93 g/l のコムギペプトン、 41 g/l の NaCl、 0.25 g/l の D - グルコース・ H_2O および 15 g/l の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

50

₂Oを含み、有利にはそれらからなり、そのpHは6.3～6.7の値の範囲内である。そのような培地は、例えば、Reynolds株から40mg/lの多糖T5の収量を生じる。

【0079】

本発明者らはまた、実験計画によって、植物ペプトンが65～85g/l、有利には75g/lの酵母エキスで置換された上記の培地M2が本発明による方法において使用され得ることを示した。この培地は、培地M3と呼ばれる。それゆえ、本発明による培地M3は、培地1lあたり以下：

- ・65g/l～85g/lの酵母エキス、有利には75g/lの酵母エキス、
- ・0～82.5gのNaCl、有利には5g～82.5g、特に41g/lのNaCl
- 、
- ・0～15g/lのマグネシウム塩、有利には0.01～15g/l、特に15g/lのMgCl₂・6H₂O、および
- ・0～7g/lの糖、有利には0.25～7g/l、特に0.25g/lのD-グルコース・H₂Oを含み、
- ・そのpHは6.3～6.7の値の範囲内である。

【0080】

さらなる実験は、植物ペプトン範囲（上記）が200g/l培地の値まで拡張され得ることを示した。植物ペプトンを52.5～200g/lの割合で含む上記のM2およびM3培地は、それゆえ、本発明の範囲に含まれる。

【0081】

それゆえ、本発明はまた、上記の培地M2またはM3中で使用される方法によって製造された過剰産生黄色ブドウ球菌株（特にReynolds、Becker、CYL770およびCYL1892株）に関する。

【0082】

別の態様によれば、本発明はそれゆえ、以下の工程を包含する莢膜多糖の製造方法に関する：

（a）上記の培地M1またはM2またはM3上で、上記の黄色ブドウ球菌株を培養する工程、

（b）このようにして製造された培養物を不活性化する工程、および

（c）莢膜多糖を回収する工程。

【0083】

莢膜多糖の製造方法の培養工程（a）は、過剰産生株の製造方法の工程（a）に関連して上記したものと同一条件下で実施され得、そしてまた上記の前培養工程によって先行され得る。

【0084】

工程（a）から得られた培養物は、次いで、不活性化工程に供される。

【0085】

不活性化工程は、培養物を2%（容量、終濃度）の割合のフェノール/エタノール（V/V）混合物で処理し、次いで、例えばマグネチックバーによって周囲温度において6時間～48時間（処理されるべきバイオマスに依存する）撹拌することによって実施され得る。不活性化は、死亡率試験によって確認される。これを行うために、100μlの処理された培養物はColumbia agar 2%NaCl上にプレーティングされ、同時に、100μlの処理された培養物が30分の1のウマ血清を補充したtrypticase soy broth中に播種される。培養物は、48時間37℃において静置位置において培養され、ブロスフラスコの栓はゆるめたままである。培養物の不活性化は、37℃

において16～18時間振盪するTSB培地（血清の添加なし）中での増幅工程を包含する方法によって制御され得、次いで、Columbia agar 2%NaClのペトリ皿に、150μlのこのようにして増幅された培養物が接種される。ペトリ皿自体は37℃において16～18時間置かれ、次いで観察される。コロニーの欠如は、処理され

た培養物の不活性化の成功を証明する。生存細菌の欠如は、24時間37℃においてインキュベートした後の増殖の欠如によって反映される。一旦培養物の死亡率が確立されると、莢膜多糖が回収される。回収工程は、細胞から多糖を抽出することを含む。種々の抽出技術が文献に記載されており、本発明の関連において使用され得る。例えば、Lee J. C. Infect. Immun. 1993; 67:1853-1858; Dassý B. et al J. Gen. Microbiol. 1991; 137:1155-1162による論文を参照し得る。121におけるオートクレーブによる抽出方法は、実施例2.3において説明される。リゾスタフィンを使用する抽出技術は、実施例2.5に記載される。

【0086】

10

CYL770株の場合、大部分の多糖は培養上清に分泌され、それゆえ直接後者から回収され得る。これを行うために、培養の終わりに、培地は遠心分離され、そして細胞ペレットは除去される。

【0087】

次いで、必要に応じて、得られた莢膜多糖は精製され得る。種々の精製技術が文献に記載されており、そして本発明の関連において使用され得る。例えば、Lee J. C. et al 1987; 55:2191-2197; Fattom A. et al Infect. Immun. 1990; 58:2367-2374による論文を参照し得る。精製技術は、実施例2.5において説明される。

【0088】

20

単糖のモル組成分析および500MHzにおける陽子NMR分析は、70%より高いO-アセチル化の程度および少なくとも70%の純度を有して、その構造が文献の記載に従う多糖が得られることを示す。残留物質が最終産物中に、約0.5~3%(w/w)のタンパク質型の残留物質、ならびに0.1%(w/w)未満の残留核酸、ならびに5%(w/w)未満の残留リポテイコ酸および残留テイコ酸の比率で存在する。

【0089】

得られた莢膜多糖の量は、実施例2.4に記載のようなELISA技術によって評価され得る。

【0090】

本発明によるPSの製造方法は、それゆえT5多糖（好ましくはReynold株（例えば、CIP103313）から）およびT8多糖（好ましくはCYL770株から）を製造するために有利に使用され得る。

30

【0091】

別の態様によれば、本発明はそれゆえ、黄色ブドウ球菌の培養に適切な上記の培地M0に関する。

【0092】

本発明の関連において、表現「黄色ブドウ球菌の培養に適切な培地」は、第1に680nmにおける吸光度を測定することによって決定される少なくとも10の係数でのバイオマスの増加、および第2にOD/CFU比率が少なくとも1 ODユニット=10⁸ CFU/mlであるような生存率を得ることを可能にする培地を意味することが意図される。このOD/CFU比率を決定するために、細菌懸濁液（分光光度計を使用してその吸光度が測定されている）は、10倍希釈を使用してPBS緩衝液中に希釈される。これらの希釈物中に含まれるCFUの数は、栄養素培地（例えば、Columbia agar）を含むペトリ皿上への後者の播種の後に評価される。24時間の37℃におけるインキュベーションの後、生存細菌が計数され、従って生存細菌数（コロニー形成単位（CFU）として表される）と吸光度（OD）との間の対応が確立され得る。

40

【0093】

別の態様によれば、本発明はまた、黄色ブドウ球菌莢膜多糖の過剰産生に適切な上記の培地M1、M2およびM3に関する。

【0094】

50

本発明の関連において、表現「莢膜多糖の過剰産生に適切な培地」は、同じ培養条件下であるがポートレル培地上で同じ出発株を培養することによって産生されるものより、少なくとも3倍、好ましくは少なくとも5倍、特に少なくとも10倍高い莢膜多糖の産生（実施例2、4において定義されるELISAアッセイによって決定される）をもたらす、黄色ブドウ球菌株が莢膜多糖を分泌する能力の増加を生じる培地を意味することが意図される。

【0095】

組換え株の場合、それが、同じ培養条件下であるがTSB培地上で同じ出発株を培養することによって産生されたものの少なくとも2倍の莢膜多糖の産生（実施例2、4に記載のELISAアッセイによって決定される）をもたらす、組換え黄色ブドウ球菌株が莢膜多糖を分泌する能力の増加を生じる場合、培地は莢膜多糖の過剰産生に適切であると考えられる。

10

【0096】

ここで、本発明は、以下の実施例においてより詳細に記載される。実施例は、純粋に本発明の説明として与えられるのであって、本発明の範囲の制限としては決して考慮されない。

【実施例】

【0097】

実施例1：培地の調製

まず、各構成物のストック溶液を調製する。これを行うために、構成物を精密天秤上で秤量し、そして限外濾過水に溶解する（ほかに示さない場合）。次いで、このようにして得られた溶液を、0.22 μm sterile cupを通して濾過し、+4において暗所に保存する。コムギペプトン、酵母エキスおよび FeCl_3 のストック溶液を用時調製する。

20

【0098】

1.1 - ポートレル培地

Poutrelら（Poutrel, Bet al. (1995). Clin Diagn Lab Immunol 2, 166-171）による論文において示されるように、種々のストック溶液を混合することによってポートレル培地を調製する。次いで、30% NaOHを添加することによってpHを7に調整し、培地を、0.22 μm を通して濾過する。

30

【0099】

培地の最終組成（g/l）は以下のとおりある：L-シスチン：0.24 g/l；L-アスパラギン酸：2.4 g/l；L-グルタミン酸：2.4 g/l；L-プロリン：2.4 g/l；L-アルギニン：0.36 g/l；L-グリシン：2.4 g/l；L-ヒスチジン：0.48 g/l；L-リジンHCl：0.6 g/l；L-セリン：2.4 g/l；L-バリン：0.48 g/l；L-チロシン：0.18 g/l；L-スレオニン：2.4 g/l；L-アラニン：2.4 g/l；L-イソロイシン：0.6 g/l；L-ロイシン：0.6 g/l；L-フェニルアラニン：0.2 g/l；L-トリプトファン：0.06 g/l；L-メチオニン：0.18 g/l；D-グルコース：10 g/l；ニコチン酸：11.94 mg/l；チアミンHCl：0.6 mg/l；硫酸アンモニウム：6.84 g/l；リン酸二水素カリウム：1.34 g/l；二リン酸ナトリウム：14.38 g/l；塩化カルシウム：5 mg/l；塩化コバルト六水和物：2.4 mg/l；硫酸銅：0.5 mg/l；硫酸マンガン：5.6 mg/l；塩化ナトリウム：5.8 mg/l；塩化亜鉛：3.4 mg/l；塩化鉄：27 mg/l；硫酸マグネシウム：247 mg/l。

40

【0100】

1.2 - 寒天培地M0、液体培地M0、M1培地

寒天培地M0について

まず、3gの寒天を150mlの限外濾過 H_2O に溶解することによって、150ml

50

の寒天ベースを調製する。寒天の粒子が消失するまで（約30分間）、得られた組成物を沸騰水浴中に入れ、次いで116において30分間オートクレーブ中で滅菌する。

【0101】

次いで、種々のストック溶液を混合し（下記の組成において示される順序で）、得られた混合物を0.22 μm sterile cupを通して濾過し、そしてこのようにして得られた混合物（50 ml）を寒天ベースに添加して、以下（g/l）：

コムギペプトン：3.87 g；酵母エキス：5 g；D-グルコース H_2O ：1 g；NaCl：6 g； $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ：0.4 g； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ：6.8 g； NH_4Cl ：6 g； $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ： 120×10^{-3} g； ZnCl_2 ： 5×10^{-3} g； $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ： 10×10^{-3} gを含む培地を得ることによって寒天培地M0を調製する。

10

【0102】

次いで、8つのペトリ皿に注ぐ。

【0103】

使用したコムギペプトンは、Organotechnie (ref. 19559)からのコムギペプトンに対応する。使用した酵母エキスは、Beckton Dickinson (ref. 212750)からのエキスに対応する：

【0104】

液体培地M0について：

種々のストック溶液を混合し（下記の組成において示される順序で）、そして得られた混合物を0.22 μm sterile cupを通して濾過して、以下（g/l）：

20

コムギペプトン：30 g；酵母エキス：5 g；D-グルコース H_2O ：1 g；NaCl：6 g； $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ：0.4 g； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ：6.8 g； NH_4Cl ：6 g； $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ： 120×10^{-3} g； ZnCl_2 ： 5×10^{-3} g； $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ： 10×10^{-3} gを含み、pH = 6.5である培地を得ることによって、液体培地M0を調製する。

【0105】

培地M1について

種々のストック溶液を混合し（下記の組成において示される順序で）、そして得られた混合物を0.22 μm sterile cupを通して濾過して、以下（g/l）：

30

コムギペプトン：30 g；酵母エキス：5 g；D-グルコース H_2O ：1 g；NaCl：58.5 g； $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ：0.4 g； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ：6.8 g； NH_4Cl ：6 g； $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ： 120×10^{-3} g； ZnCl_2 ： 5×10^{-3} g； $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ： 10×10^{-3} gを含む培地を得ることによって、培地M1を調製する。

【0106】

1.3 - Columbia agar 2% NaCl

1 lの培地について、44 gのColumbia「Blood Agar Base」（Difco ref. 279240）を秤量し、次いで500 mlの滅菌限外濾過 H_2O を添加する。得られた混合物を100の水浴中で約30分間（完全な溶解および透明な溶液が得られるまで）インキュベートする。次いで、500 mlの滅菌限外濾過 H_2O を添加する。溶液を200 ml Schottフラスコに分注し、次いで116において30分間オートクレーブすることによって滅菌する。次いで、ペトリ皿に注ぐ（25 ml / ペトリ皿）前に、55（水浴）において培地を保持する。ペトリ皿に注ぐ前に、2%（= 2 g / 100 ml）の終濃度を得るように、200 ml フラスコあたり13.3 mlの30% NaCl（0.22 μm を通して濾過した）を添加する。

40

【0107】

1.4 - Tryptic Soy Agar (GTS)

1 lの培地について、40 gの「Tryptic Soy Agar」（Difco ref. 236950）を秤量し、次いで500 mlの滅菌限外濾過 H_2O を添加する

50

。得られた混合物を100の水浴中で約30分間（完全な溶解および透明な溶液が得られるまで）インキュベートする。次いで、500mlの滅菌限外濾過H₂Oを添加する。溶液を200ml Schottフラスコに分注し、次いで116において30分間オートクレーブすることによって滅菌する。次いで、ペトリ皿に注ぐ（25ml/ペトリ皿）前に、55（水浴）において培地を保持する。

【0108】

1.5 - 「Bacto Tryptic Soy」Broth (TSB)

1lの培地について、30gの「Bacto Tryptic Soy」(Difco ref. 211825)を秤量し、次いで500mlの滅菌限外濾過H₂Oを添加する。得られた混合物を100の水浴中で約30分間（完全な溶解および透明な溶液が得られるまで）インキュベートする。次いで、500mlの滅菌限外濾過H₂Oを添加する。溶液を200ml Schottフラスコに分注し、次いで116において30分間オートクレーブすることによって滅菌する。次いで、ペトリ皿に注ぐ（25ml/ペトリ皿）前に、55（水浴）において培地を保持する。

10

【0109】

実施例2：種々の培養条件下での5型莢膜多糖（CP5）製造の評価

2.1 - Reynolds株の培養

動物起源の化合物を含まない条件下または標準的な条件下のいずれで操作することが所望されるかに依存して、2つの異なる方法で凍結材料を調製した。標準的な条件については、出発凍結乾燥材料をColumbia agar + 2% NaCl上に取り出す。後者を18時間37で、株に依存してCO₂有りまたは無しで培養する。対数増殖期の微生物を得るために、4時間37において新たな寒天ペトリ皿上で培養物を再度継代培養する。次いで、培養物をtryptic soy broth中に回収し、そこに20%のグリセロールを添加する。動物起源の化合物を含まない条件が必要とされる場合、前培養を培地M0上で18時間37において実施し、次いで接種物を使用して液体培地M0を継代培養する。また、20%グリセロール添加後、凍結を実施する。

20

【0110】

上記の第1の方法によって得られた100μlの凍結Reynolds材料を、900μlのPBS中に取り出す。

【0111】

2つの寒天培地M0のペトリ皿および2つのColumbia agar 2% NaClのペトリ皿に、ペトリ皿あたり150μlの細菌懸濁物の層を播種し、そして18~20時間37においてインキュベートする。

30

【0112】

層をかき取り、5mlのPBS中に再懸濁する。懸濁物のOD_{680nm}を測定する。これはOD_{680nm} = 0.2で50ml三角フラスコに播種するために必要な前培養物の容量を決定することを可能にする。

【0113】

Columbia agar 2% NaCl上での前培養物を、ポートル培地を含む三角フラスコに播種するために使用し、寒天M0上での前培養物（18~20時間、37において）を、液体培地M0を含む三角フラスコおよび培地M1を含む三角フラスコに播種するために使用する。容量はアッセイによって変動し得、そして最も一般的には50mlである。適正な酸素負荷を維持するために、培地の容量は三角フラスコの容量の20%以下である。

40

【0114】

初期OD_{680nm}値の確認後、37において三角フラスコを振盪する（×100rpm）。

【0115】

680nmにおけるODをt₀、t_{8h}、t_{24h}、t_{32h}、t_{48h}、t_{56h}、およびt_{72h}において測定することによって培養物をモニターし、pHを最初および培

50

養 7 2 時間において測定する。5 0 m l の培養物について得られた結果を、下記の表 1 および 2 において報告する。

【 0 1 1 6 】

【表 1】

表1:

株	前培養培地	OD680=1についてのOD/CFU	標準偏差
Reynolds	Columbia agar 2%NaCl	5.3E+08	8.2E+07
Reynolds	寒天M0	4.2E+08	1.7E+08

10

【 0 1 1 7 】

【表 2】

表2:OD680nm測定

時間(時間)	ポートレ	液体M0	M1
0	0.2	0.2	0.2
8	2.8	2.6	2.7
24	6.7	6.2	4.0
32	9.1	8.0	4.7
48	10.1	8.4	6.1
56	8.6	8.7	6.4
72	8.1	8.6	5.7
初期pH	7	6.5	6.5
最終pH	8.5	8.5	8.5

20

【 0 1 1 8 】

30

2 . 2 - 培養物の不活性化

7 2 時間において、培養物を各々 7 5 0 m l の培養物を含む 4 つの 1 l S c h o t t フラスコに分注する。

【 0 1 1 9 】

7 5 0 m l の培養物について 1 5 m l のフェノール/エタノール (v / v) (すなわち、2 % の終濃度) を添加し、混合物をマグネチックバーを使用して周囲温度において約 4 8 時間撹拌する。

【 0 1 2 0 】

死亡率試験を以下の方法で実施する：

1 0 0 μ l の処理された培養物を C o l u m b i a 2 % N a C l 上にプレーティングし、そして 1 0 0 μ l の処理された培養物を t r y p t i c s o y b r o t h + 3 0 分 の 1 ウマ血清に播種し、次いで 4 8 時間 3 7 ° C においてインキュベートする (t r y p t i c s o y b r o t h のフラスコの栓はゆるめたままにする) 。このようにして不活性化された培養物を使用して、多糖を抽出し、そして製造された量を E L I S A によって評価する。

40

【 0 1 2 1 】

2 . 3 - 製造された多糖の抽出

次いで、不活性化された 7 2 時間培養物を、3 0 分間 3 5 0 0 r p m で + 4 ° C において遠心分離し、培養上清を分離し、そして + 4 ° C で保存する。ペレットを 5 m l の P B S 中に取り出し、6 0 分間 1 2 1 ° C においてオートクレーブし、次いで 3 0 分間 2 5 0 0 0 g

50

および + 4 で遠心分離する。上清（抽出物 1）を回収する。ペレットを 5 ml の PBS 中に取り出し、60 分間 121 においてオートクレープし、30 分間 25000 g および + 4 において遠心分離する。上清（抽出物 2）を回収する。抽出物 1 および 2 を合し、そして 50 μ g/ml のプロテイナーゼ K を用いて 1 時間 37 において処理し、次いで 20 分間 75 においてタンパク質を不活性化する。

【0122】

2.4 - ELISA による、製造された多糖の量の評価

Karakawa et al., J Clin Microbiol. 1985 Sep; 22(3): 445 - 7 に記載の方法によって、5 型または 8 型莢膜に対するポリクローナル血清を製造した。使用するモノクローナルは、Hochkeppel et al., J Clin Microbiol. 1987 Mar; 25(3): 526 - 30 に記載のプロトコルによって製造され、パスツール研究所によって本発明者らに供与された。

10

【0123】

製造された莢膜多糖の量を ELISA によって決定する。これを行うために、サンドイッチ ELISA アッセイを、96 ウェルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) 上で実施する。第 1 の工程において、抗 CP5 モノクローナル抗体 (0.05 M 炭酸ナトリウム緩衝液、pH = 9.6 (Sigma) 中 1 μ g/ml - 100 ng/ウェル) をウェル中に入れ、そしてプレートを一晚 4 においてインキュベートする。次いで、プレートを 4 回 1 ウェルあたり 300 μ l の、0.05 % の tween 20 (Sigma) を補充した PBS 緩衝液 (Eurobio) (PBS - Tween) を用いて洗浄し、次いで、1 時間 37 において 1 ウェルあたり 250 μ l の、1 % (容量/重量) の BSA (Eurobio) を補充した PBS - Tween (PBS - Tween - BSA) を用いて飽和させる。次いで、プレートを 3 回 PBS - Tween 溶液を用いて洗浄する。

20

【0124】

工程 2.3 由来の抽出物の段階 2 倍希釈物を、PBS - Tween - PBS 溶液を使用して調製し、100 μ l/ウェルの割合で添加する。プレートを 90 分間 37 においてインキュベートし、次いで 4 回 PBS - Tween を用いて洗浄する。Karakawa (Karakawa et al., 1985, J. Clin. Microbiol. 1985, Sep; 22(3): 445 - 7) のプロトコルに従って製造された抗 CP5 ウサギポリクローナル抗体を PBS - Tween - BSA 中で希釈し (1/2000)、次いで 100 μ l/ウェルの割合でウェルに添加し、そしてプレートを 90 分間 37 でインキュベートする。次いで、プレートを 4 回 PBS - Tween を用いて洗浄する。PBS - Tween - BSA 中で希釈した (1/6000) 抗ウサギヤギ IgG ペルオキシダーゼ結合体 (Southern biotech) を、100 μ l/ウェルの割合で添加し、そしてプレートを 1 時間 37 においてインキュベートする。プレートを 300 μ l/ウェルの PBS - Tween を用いて 8 回洗浄し、そして 100 μ l/ウェルの TMB 基質 (TEBU) 溶液を添加し、続いて暗所で 15 分間周囲温度 (約 22) においてインキュベートする。酵素反応を、1 ウェルあたり 100 μ l の 1 M H_3PO_4 1 M (Sigma) を添加することによって停止させる。

30

40

【0125】

次いで、自動プレートリーダー (Versamax) で 450 nm における吸光度を測定する。コントロールの値を差し引き、そして標準曲線と比較することによって量を評価する。

【0126】

結果を、下記の表 3 において報告する。

【0127】

【表 3】

培地	前培養	培養容量 (ml)	初期 OD680	最終 OD680	CP5 ELISAアッセイ(×3)	
					平均 (μ g/ml 培地)	標準偏差
ポートル	Columbia agar 2% NaCl	50	0.2	8.1	3.6	0.3
液体M0	寒天M0	50	0.2	8.6	9.7	1.2
M1	寒天M0	50	0.2	5.7	36.0	1.5

10

【0128】

2.5 - 多糖CP5の抽出および精製

Reynolds株を項目2.1に記載のように、寒天培地M0上での前培養および次いで三角フラスコ中の400mlの培地M1中での培養を含むプロトコルに従って培養する。培養物を合して、3lの培養物を得、そこから製造されたT5多糖を抽出および精製する。

【0129】

培養物全体をフェノール-エタノール(終濃度2%V/V)での処理によって不活性化し、次いで30分間25000gにおいて遠心分離する。1lの培養物あたり約10.9gの湿潤不活性化微生物のペレットを得る。

20

【0130】

微生物を、0.5g/ml 50mMトリス、2mM $MgSO_4$ 、pH7.5の割合で懸濁する。100 μ g/mlの終濃度を得るように、リゾスタフィン水溶液(5mg/ml)を添加する。4時間37におけるマグネチック攪拌を用いてのインキュベーションの後、benzonase溶液(5U/mlの終濃度)を添加し、そしてインキュベーションを2時間37においてマグネチック攪拌を用いて実施する。

【0131】

遠心分離(25000g、30分)後、抽出上清を回収し、合し、そして限外濾過した。限外濾過システムに十分な容量を得るように、事前に上清を H_2O 中で1/4に希釈する。限外濾過を、以下の条件下で2UF 59kDカセット上で実施する： H_2O ：10倍容量；次いで50mMトリス、pH8.0：3倍容量。限外濾過の間、保持物(retentate)の容量は一定のままである。保持物は、CP5抽出物と呼ばれるものを構成する。

30

【0132】

CP5抽出物を、37において $MgCl_2$ (1mMの終濃度)およびbenzonase(5U/mlの終濃度、すなわち、約40U/g処理湿潤微生物)の存在下で攪拌しながらインキュベートする。3時間のインキュベーション後、benzonaseを5U/mlの終濃度で添加し、そしてインキュベーションを3時間継続する。4U/mlの終濃度(すなわち、約30U/g処理湿潤微生物)が得られるように、プロナーゼ水溶液(10mg/ml)を添加し、 $CaCl_2$ を1mMの終濃度で補充する。次いで、混合物を15時間37においてインキュベートする。核酸およびタンパク質フラグメントを除去するために、2つのUF 50kDカセット上で、以下の条件下、50kD限外濾過を実施する： H_2O ：10倍容量、次いで50mMトリス、pH8.0：3倍容量。限外濾過の間、保持物の容量は一定のままである。上記で得られた保持物に、以下を添加し： $MgCl_2$ (1mMの終濃度)、benzonase(0.1U/mlの終濃度)、そしてマグネチック攪拌用いて混合物を3時間インキュベートする。

40

【0133】

$CaCl_2$ を1mMの終濃度で補充したプロナーゼ水溶液(10mg/ml)を0.1

50

U / m l の終濃度で添加し、次いで混合物を 2 時間 3 7 においてインキュベートする。

【 0 1 3 4 】

次いで、2 つの U F 3 0 K D カセット上での限外濾過を、以下の条件下で実施する：
H₂O : 1 0 倍容量、次いで 5 0 m M トリス、p H 7 . 5 : 3 倍容量。得られた保持物は、白っぽい沈殿物 / 濁りを示し、8 0 0 0 g で 3 0 分間遠心分離することによってそれを除去する。

【 0 1 3 5 】

次いで、イオン交換クロマトグラフィー上での精製工程を実施する。

【 0 1 3 6 】

それは、残留物質（特に、テイコ酸（T A）およびリポテイコ酸（L T A））を除去することを可能にする。

10

【 0 1 3 7 】

以下の条件を使用する：3 つの 5 m l H i T r a p Q H P カラムを直列に連結する（R e f : A m e r s h a m 1 7 - 1 1 5 4 - 0 1）；平衡緩衝液：2 0 m M トリス、p H 7 . 5；流速：2 m l / 分；サンプルを平衡緩衝液中で注入。

【 0 1 3 8 】

溶出：

- 2 0 m M トリス、p H 7 . 5 : 5 倍カラム容量
- 2 0 m M トリス、p H 7 . 5、0 ~ 0 . 5 M N a C l の勾配：1 0 倍カラム容量
- 2 0 m M トリス、0 . 5 M N a C l、p H 7 . 5 : 5 倍カラム容量
- 2 0 m M トリス、p H 7 . 5、0 . 5 ~ 1 M N a C l の勾配：5 倍カラム容量
- 2 0 m M トリス、1 M N a C l、p H 7 . 5 : 5 倍カラム容量
- 2 0 m M トリス、p H 7 . 5 : 5 倍カラム容量

20

【 0 1 3 9 】

2 0 6 および 2 8 0 n m における吸光度の測定によって、溶出をモニターする。C Z E 分析は、クロマトグラフィーの間に溶出される種々の構成物を同定することを可能にする。

【 0 1 4 0 】

C P 5 多糖を、0 . 2 M ~ 0 . 3 M の間の N a C l 濃度において溶出する。使用するクロマトグラフィー条件下で、多糖は残留物質（特に、0 . 3 6 M ~ 0 . 4 8 M の間の N a C l で溶出されるテイコ酸、および 0 . 7 4 M ~ 0 . 8 6 M の間の N a C l で溶出されるリポテイコ酸）から明確に分離される。

30

【 0 1 4 1 】

C P 5 を含む画分を合し、そして + 4 において 2 0 倍容量の 0 . 5 M N a C l 水溶液（2 ~ 3 浴（bain））、次いで 2 0 倍容量の限外濾過水（3 ~ 4 浴）に対して透析する。このようにして、トリスを除去する。

【 0 1 4 2 】

精製産物を凍結乾燥し、- 2 0 において保存する。

【 0 1 4 3 】

3 1 の培養物から、精製の終わりに 7 4 m g の T 5 莢膜多糖が得られる。産物の特性を、下記の表 4 において報告する。

40

【 0 1 4 4 】

【表 4】

表4:

	CP5アッセイ	O-アセチル (CP 粉末重量)		O-アセチル (CP CEアッセイ)		タンパク質	DNA
分析方法	NMR	比色分析				Micro BCA direct	Picogreen
単位	% (粉末重量に 対する相対)	Mmol/ mg CP	Mol/ mol UR	Mmol/ mg CP	Mol/ mol UR	%W/W (粉末重量に 対する相対)	%W/W (粉末重量に 対する相対)
結果	80%	1.32	0.87	1.65	1.08	2.7%	<0.1%

10

【0145】

実施例3：種々の培養条件下での8型莢膜多糖(CP8)生産性の評価

評価を、BeckerおよびCYL770株に対して実施する。

【0146】

3.1 - Becker株の培養

20

動物起源の化合物を含まない条件下または標準的な条件下のいずれで操作することが所望されるかに依存して、2つの異なる方法で凍結材料を調製する。標準的な条件については、初期凍結乾燥材料を、Columbia agar + 2% NaCl上に取り出す。後者を、18時間37℃において株に依存してCO₂有りまたは無しで培養する。対数増殖期の微生物を得るために、培養物を新たな寒天ペトリ皿上で4時間37℃において再度継代培養する。次いで、tryptic soy broth中に培養物を回収し、そこに20%のグリセロールを添加する。動物起源の化合物を含まない条件が必要とされる場合、前培養を培地M0上で18時間37℃において実施し、次いで接種物を使用して液体培地M0を継代培養する。20%グリセロール添加後、凍結をまた実施する。

【0147】

30

tryptic soy broth法によって調製されたBecker凍結材料100μlを、900μlのPBS中に取り出す。3つの寒天M0のペトリ皿、2つのColumbia agar 2% NaClのペトリ皿、および1つのGTSペトリ皿に、ペトリ皿あたり150μlの細菌懸濁液の層を播種する。ペトリ皿を、18/20時間37℃ + 5% CO₂においてインキュベートする。

【0148】

層をかき取り、そして5mlのPBS中に再懸濁する。

【0149】

懸濁物のOD_{680nm}を測定する。これはOD_{680nm} = 0.2で50ml三角フラスコに播種するために必要とされる前培養物の容量を決定することを可能にする。

40

【0150】

Columbia agar 2% NaCl上の前培養物をポートレル培地を含む三角フラスコに播種するために使用し、GTS上の前培養物をTSBを含む三角フラスコに播種するために使用し、そして寒天培地M0上の前培養物を液体培地M0を含む三角フラスコおよび培地M1を含む三角フラスコに播種するために使用する。適正な酸素負荷を維持するために、培地の容量は三角フラスコの容量の20%以下である。

【0151】

初期OD_{680nm}値の確認後、三角フラスコを37℃において振盪(100rpm)する。

【0152】

50

同様の実験を、400 ml の培地を含む三角フラスコ中で実施する。

【0153】

3.2 - C Y L 7 7 0 株の培養

組換え C Y L 7 7 0 株について、凍結材料を調製する方法は、T S B 培地上または液体培地 M 0 上での初期凍結材料の継代培養を使用する。培養を、5 時間 3 7 において振盪しながら実施する。培地に 2 0 % グリセロールを添加後、凍結を実施する。

【0154】

このようにして得られた 1 つの凍結 C Y L 7 7 0 材料 1 ml を、1 0 ml の液体培地 M 0 を用いて取り出し、次いで 5 0 ml 三角フラスコ中に入れ、そして 1 8 / 2 0 時間 3 7 において振盪しながら (1 0 0 r p m) インキュベートする。第 2 の凍結 C Y L 7 7 0 材料を、1 0 ml の T S B 培地中に取り出し、次いで振盪しながら、以前と同じ条件下に置く。

10

【0155】

液体前培養物の OD_{680nm} を測定する。これは $OD_{680nm} = 0.2$ で 5 0 ml 三角フラスコに播種するために必要とされる前培養物の容量を決定することを可能にする。

【0156】

T S B 中の前培養物は、T S B を含む三角フラスコに播種することを可能にし、そして液体 M 0 中の前培養物は、培地 M 1 を含む三角フラスコに播種することを可能にする。適正な酸素負荷を維持するために、培地の容量は三角フラスコの容量の 2 0 % 以下である。

20

【0157】

初期 OD_{680nm} 値の確認後、三角フラスコを 3 7 において振盪 (1 0 0 r p m) する。

【0158】

同様の実験を、400 ml の培地を含む三角フラスコ中で実施する。

【0159】

3.3 - 培養物のモニター

680 nm における OD を t_0 、 t_{8h} 、 t_{24h} 、 t_{32h} 、 t_{48h} 、 t_{56h} および t_{72h} で測定することによって、培養物をモニターする。

【0160】

30

最初および培養 7 2 時間において pH を測定する。5 0 ml の培養物の結果を、下記の表 5 において報告する。

【0161】

【表 5】

	Becker				CYL770	
時間 (時間)	ポートレル	液体M0	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
初期pH	7	6.5	6.5	7	7	6.5
最終pH	9	8.5	8.5	9	9	8.5

10

【 0 1 6 2 】

3 . 4 - 培養物の不活性化

20

上記の項目 2 . 2 のものと同じプロトコルによって、培養物を不活性化する。上記の項目 2 . 3 のものと同じプロトコルによって、製造された多糖の抽出を実施する。

【 0 1 6 3 】

3 . 5 - E L I S A による、製造された多糖の量の評価

使用される抗体が抗 C P 8 抗体であり、そしてペレット抽出物および培養上清に対してアッセイを実施することを除いて上記の項目 2 . 4 のものと同じ E L I S A アッセイを使用して、製造された多糖の量の評価を実施する。2 0 0 0 0 分の 1 に希釈したモノクローナル K 8 - 2 4 を含む腹水を用いて吸着を実施し、そしてウサギポリクローナル抗体が 1 0 0 0 分の 1 に希釈した吸着血清である。

【 0 1 6 4 】

30

下記の表 6 において、5 0 m l および 4 0 0 m l の培養物について得られた結果を報告する。4 0 0 m l の培養物について、5 0 m l の培養物の単一サンプルに対して毎回分析を実施し、次いで総量を算出して、表 6 において報告する。

【 0 1 6 5 】

【表 6】

表6:

株	培養	前培養	CP8のELISAアッセイ(×2)			
			ペレット		上清	
			平均 (μg/ml培養物)	標準 偏差	平均 (μg/ml培養物)	標準 偏差
Becker (50ml)	ポットレル	Columbia agar 2% NaCl	1.3	0	1.8	0
	液体M0	寒天M0	1.9	na	3.6	na
	M1	寒天M0	14.0	1.6	43.2	2.2
	TBS	GTS	0	0	0	0
Becker (400ml)	M1	寒天M0	23.04		57.6	
CYL770 (50ml)	M1	液体M0	8.7	0.5	534.2	75.2
	TSB	TSB	4.7	1.3	244	na
CYL770 (400ml)	M1	液体M0	27.18	na	579.6	na
	TSB	TSB	3.6	na	216	na

na:適用不可

【0166】

3.6 - 製造されたPSの回収および精製

T5多糖の取得について実施例2に記載した方法を使用して、培地M1中でのBecker株の400ml三角フラスコ培養物から、T8多糖を回収した。

【0167】

また、培地M-1中のCYL770株の400ml三角フラスコ培養物およびTSB培地上の培養物からT8多糖を精製した。これを行うために、上記の方法に従ってフェノール-エタノールでの処理によって、800mlの培養物を不活性化し、次いで30分間25000gで遠心分離する。720mlの上清を得た。

【0168】

4%の酢酸ナトリウムの終濃度を得られるような量の酢酸ナトリウムを、500mlのこの上清に添加する。30分間周囲温度において懸濁物を撹拌する。次いで、50%のエタノールの終濃度を得られるような量のエタノールを添加する。次いで、周囲温度において30分間懸濁物を撹拌し、次いで撹拌せずに一晚+4において保存する。

【0169】

15000gで30分間の遠心分離の後、上清を回収する。4%の酢酸ナトリウムおよび85%のエタノールの終濃度を得られるように、この上清に酢酸ナトリウムおよびエタノールを添加する。30分間周囲温度において懸濁物を撹拌し、次いで撹拌せずに一晚4において保存する。15000gで30分間の遠心分離の後、ペレットを回収する。

【0170】

このようにして得られたペレットを100mlの限外濾過水を用いて取り出す(遠心分離した培養上清の容量に関して5倍濃度)。ペレットが完全に溶解するまで周囲温度においてマグネチック撹拌した後、得られた懸濁物を21の限外濾過水に対して、周囲温度に

おけるその日の間の3回の浴交換、およびそれに続く4 における一晚の工程を行って透析する。次いで、50 mMのトリスおよび1 mMの $MgCl_2$ の終濃度が得られるように、トリスおよび $MgCl_2$ をこのようにして得られた懸濁物に添加する。37 においてbenzonaseの存在下(5 U/mlの終濃度)で攪拌しながら、この溶液をインキュベートする。3時間のインキュベーション後、benzonaseを5 U/mlの終濃度で添加し、インキュベーションを3時間継続する。

【0171】

4 U/mlの終濃度が得られるようにプロナーゼ水溶液(10 mg/ml)を添加し、 $CaCl_2$ (1 mMの終濃度)を補充する。次いで、15時間37 においてこの工程をインキュベートする。可視の濁り/乳白色が出現する場合、8000 gで30分間の遠心分離を実施する。

10

【0172】

以下の条件下で、タンパク質および核酸のフラグメントを除去するために、30 kDa限外濾過を実施する： H_2O ：10倍容量；次いで20 mMトリス、pH 7.5：3倍容量。

【0173】

保持物の容量は限外濾過の間一定のままであり、非常にわずかに着色した透明な溶液が得られる。

【0174】

得られた保持物が少しでも濁り/乳白色を示す場合、8000 gで30分間の遠心分離によって後者を除去する。

20

【0175】

次いで、残留物質(特に、テイコ酸(TA)およびリポテイコ酸(LTA))の除去を完了するために、以下の条件下で、イオン交換クロマトグラフィー工程を実施する：Q sepharose HPゲル；20 ml Hi Trap Q HPカラム；平衡緩衝液：20 mMトリス、pH 7.5；流速：2 ml/分；サンプルを平衡緩衝液中で注入。125 mlの培養上清/20 mlゲルの等価物を注入する；溶出：

- 20 mMトリス、pH 7.5：5倍カラム容量
- 20 mMトリス、pH 7.5、0 ~ 0.5 M NaClの勾配：20倍カラム容量
- 20 mMトリス、0.5 M NaCl、pH 7.5：5倍カラム容量
- 20 mMトリス、1 M NaCl、pH 7.5：5倍カラム容量
- 20 mMトリス、pH 7.5：5倍カラム容量。

30

【0176】

206および280 nmにおける吸光度を測定することによって、溶出をモニターする。CZE分析は、クロマトグラフィーの間に溶出される種々の構成物を同定することを可能にする。

【0177】

このようにして、本発明者らは、CP8多糖が0.2 M ~ 0.3 Mの間のNaCl濃度において溶出されることを決定することができた。使用されるクロマトグラフィー条件下で、このクロマトグラフィー工程の後、多糖は残留物質(その量はわずかである)から明確に分離される；特に0.36 M ~ 0.48 Mの間のNaClで溶出されるテイコ酸、および0.74 M ~ 0.86 Mの間のNaClで溶出されるリポテイコ酸。

40

【0178】

CP8を含む画分を合し、そして+4 において20倍容量の0.5 M NaCl水溶液(2 ~ 3浴)、次いで20倍容量の限外濾過水(3 ~ 4浴)に対して透析する。高NaCl濃度における工程は、トリスの効果的な除去を可能にする。

【0179】

このようにして精製された産物を凍結乾燥し、そして-20 において保存する。

【0180】

下記の表7において、得られた結果を報告する。

50

【 0 1 8 1 】

【 表 7 】

表7:

	CP8アッセイ	O-アセチル (CP 粉末の重量)		O-アセチル (CP CEアッセイ)		タンパク質	DNA
分析方法	CZE	比色分析				Micro BCA direct	Picogreen
単位	% (粉末重量 に対する相対)	mmol/ mg CP	mol/mol UR	mmol/ mg CP	mol/mol UR	%W/W (粉末重量 に対する相対)	%W/W (粉末重量 に対する相対)
Becker (P005) ペレット 液体M0/M1	71%	0.93	0.61	1.31	0.86	2.2%	nd
CYL770 (P006) 上清 液体M0/M1	85%	1.03	0.68	1.22	0.80	0.5%	<0.1%
CYL770 (P007) 上清 TSB/TSB	62%	1.08	0.71	1.75	1.14	3.5%	nd

nd=決定せず

【 0 1 8 2 】

実施例 4 : 3 0 l 発酵槽中での黄色ブドウ球菌 R e y n o l d s 5 型株の培養

4 . 1 - B T S 培地 + N a C l 上の培養

項目 2 . 1 の第 1 の方法によって調製された凍結 R e y n o l d s 株材料を、0 . 5 % (重量) の割合で、N a C l (5 5 g / l) を補充した 2 0 0 m l の t r y p t i c s o y b r o t h を各々が含む 2 つの 2 l バッフル三角フラスコ (E 1 および E 2) に接種する。3 7 °C において 5 ± 1 時間 (E 1) または 4 8 時間 (E 2) 1 7 5 r p m で振盪しながら、三角フラスコをインキュベートする。

【 0 1 8 3 】

2 0 l の同じ培地を含む 3 0 l B r a u n 発酵槽に、約 $1 . 3 8 \times 1 0 ^ { 1 1 } C F U$ である見積られる前培養物 (E 1) (約 5 時間の培養、および三角フラスコ中の最終 O D $6 0 0 n m$ 4 付近) 7 0 m l を接種する。以下の条件下で培養を実施する：温度：3 7 °C；培養期間：4 8 ± 2 時間；2 5 % N H ₄ O H および 1 0 % H ₃ P O ₄ を用いて 6 . 5 0 に調節された pH；3 0 % P O ₂ (カスケードでの調節：撹拌 2 0 ~ 8 0 %、空気 2 0 (1 v v m) ~ 6 0 % (3 v v m)、酸素富化 0 ~ 1 0 0 %)；圧力：1 0 0 m b a r；5 0 分の 1 s t r u k t o l を用いる消泡調節。

【 0 1 8 4 】

6 0 0 n m における O D を確認するために、定期的なサンプルを取ることにによって最初の数時間の間、そしてまた培養の 2 0 ± 2 時間、培養の 2 4 ± 2 時間、および培養の 4 2 ± 2 時間において培養物をモニターし；乾燥重量を決定し；生存率を決定し；形態を観察し；グルコースをアッセイし；酢酸をアッセイし、そして培養の 4 ± 2 時間、1 8 ± 2 時間、2 4 ± 3 時間、4 4 ± 3 時間および 4 8 ± 2 時間後に、O D = 5 0 のペレット 6 個についての E L I S A アッセイによって多糖生産性を決定する。

【 0 1 8 5 】

培養の 48 ± 2 時間後に 1 l 遠心分離バケット中に細胞を回収し (1 2 バケット / 2 0 l 培養物)、そして 2 0 分間 7 0 0 0 g で 4 において遠心分離する。上清の除去後、湿重量を決定する。フェノール / エタノールを用いた微生物不活性化、次いで実施例 2 の方法による T 5 多糖の回収および精製からなる工程まで、ペレットを - 2 0 において保存する。

【 0 1 8 6 】

培養の 1 0 時間、2 4 時間および 4 8 時間における C P 5 莢膜の生産性を追跡するために 4 8 時間にわたって第 2 の三角フラスコ (E 2) をモニターする。

【 0 1 8 7 】

4 . 2 - ポートレル培地上での培養

項目 2 . 1 に記載の第 1 の方法によって調製された黄色ブドウ球菌 *Reynolds 5* 型株の凍結材料を、1 % (容量) の割合で、2 0 0 m l のポートレル培地を各々含む 2 つの 2 l バッフル三角フラスコ (E 1 および E 2) に接種する。3 7 において 1 7 5 r p m で 16 ± 2 時間、三角フラスコをインキュベートする。前培養物をプールし、そして発酵槽に接種するために使用する。以下の条件下で、2 0 l のポートレル培地を含む 3 0 l

B . B r a u n 発酵槽中での培養を実施する：温度：3 7 ；培養期間： 48 ± 2 時間；2 5 % NH_4OH および 1 0 % H_3PO_4 を用いて 6 . 5 0 に調節された p H ；3 0 % PO_2 (カスケードでの調節：2 0 ~ 8 0 % 攪拌、空気 2 0 (1 v v m) ~ 6 0 % (3 v v m)、酸素富化 0 ~ 1 0 0 %) ；圧力：1 0 0 m b a r ；5 0 分の 1 s t r u k t o l を用いる消泡調節。

【 0 1 8 8 】

最初の数時間の間、そしてまた培養の 24 ± 2 時間および培養の 30 ± 2 時間において、6 0 0 n m における O D を確認するためにサンプルを取るによって培養物をモニターし；乾燥重量を決定し；生存率を決定し；形態を観察し；グルコースをアッセイし；酢酸をアッセイし、遊離アミノ酸をアッセイし、そして E L I S A アッセイによって多糖生産性を決定する。

【 0 1 8 9 】

培養の 48 ± 2 時間後に細胞を回収する。

【 0 1 9 0 】

2 l の回収物を 2 l の S c h o t t フラスコ中に回収し、そして 2 % (v / v) の終濃度のフェノール / エタノール (v / v) で処理する。この混合物を、6 時間 $\pm$ 1 時間 22 ± 3 において攪拌する。培養物の残りから上清を除去した後、細菌ペレットを最小容量の P B S 緩衝液を用いて取り出し、次いで上記の実施例 2 に記載の方法によって多糖を不活性化および回収するためにオートクレーブする。

【 0 1 9 1 】

培養物の残りを 1 l 遠心分離バケット中に回収し (1 2 バケット / 1 8 l 培養物)、2 0 分間 7 0 0 0 g で 4 において遠心分離する。上清の除去後、湿重量を決定する。0 . 4 5 μm 濾過および 1 2 1 における 5 5 分間のオートクレーブの後、2 l の上清を - 2 0 において保存する。

【 0 1 9 2 】

1 2 個のペレットを、u l t r a t u r a x を使用して、最小容量の P B S 緩衝液 (約 6 5 0 m l) 中に再懸濁する。懸濁物をプールし、ホモジナイズし、1 2 1 において 5 5 分間オートクレーブする前に 3 つの 5 0 0 m l S c h o t t フラスコに均等に分注する (約 3 0 0 m l / S c h o t t フラスコ)。次いで、オートクレーブした懸濁物をプールし、そして上記の実施例 2 に記載のプロトコルによって多糖を回収する。

【 0 1 9 3 】

4 . 3 - C o l u m b i a m e d i u m + N a C l 上での培養

項目 2 . 1 の第 1 の方法によって調製された凍結黄色ブドウ球菌 *Reynolds 5* 型材料を、1 % (容量) の割合で、2 0 0 m l の c o l u m b i a m e d i u m + 2 0 g

10

20

30

40

50

／1のNaCl (Difco ref. 2944201)を各々含む2つの2 l バッフル三角フラスコに接種する。三角フラスコを、37 °Cにおいて 24 ± 2 時間175 rpmで振盪しながらインキュベートする。 24 ± 2 時間後、前培養物をブールし、そして発酵槽に接種するために使用する。以下の条件下で、20 l の同じ培地を含む30 l B. Braun発酵槽中での培養を実施する：温度：37 °C；培養期間： 24 ± 2 時間後；25 % NH_4OH および10 % H_3PO_4 を用いて7.00に調節されたpH；30 % PO_2 （カスケードでの調節：20 ~ 80 % 攪拌、空気20 (1 vvm) ~ 60 % (3 vvm)、酸素富化0 ~ 100 %)；圧力：100 mbar；50分の1 s t r u k t o lを用いる消泡調節。

【0194】

10

600 nmにおけるODを確認するために定期的なサンプルを取ることによって、定期的に培養物をモニターし；乾燥重量を決定し；生存率を決定し；形態を観察し；グルコースをアッセイし；酢酸をアッセイし、そしてELISAアッセイによって多糖生産性を決定する。

【0195】

次いで、培養の 24 ± 2 時間において細胞を回収する。最終培養物を1 l 遠心分離バケツト中に移し（12バケツト／20 l 培養物）、20分間7000 gで4 °Cにおいて遠心分離する。上清の除去後、湿重量を決定する。遠心分離後、ultra t u r a xを使用して12個のペレットを1 ~ 1.2 l の間の最小容量のPBS緩衝液中に再懸濁する。懸濁物をブールし、ホモジナイズし、そして500 ml S c h o t t フラスコ中に均等に分配し、次いで12 l において55分間オートクレーブする。次いで、オートクレーブした懸濁物をブールし、そして上記の実施例2に記載のプロトコルによって多糖を回収する。

20

【0196】

4.4 - 培地M1上での培養

上記の項目2.1に記載の第1の方法によって調製された凍結黄色ブドウ球菌Reynolds 5型材料を、1 C PBS緩衝液中に9 ml の緩衝液あたり1 ml の凍結材料の割合で取り出して、寒天培地M0のペトリ皿約10個に150 μl / ペトリ皿の割合で播種する。

【0197】

30

ペトリ皿を37 °Cにおいて15 ~ 18時間インキュベートする。15 ~ 18時間37 °Cにおいてインキュベートした後、各三角フラスコにおいて0.2付近の初期OD_{600 nm}を有するように同一組成の2つの三角フラスコ（200 ml / 2 l - E1およびE2）に接種するために、培地M1中に再懸濁する前に、形成された層をかき取る。三角フラスコを、37 °Cにおいて175 rpmで振盪しながら約5時間（対数増殖期の培養物、E1）または72時間（E2）インキュベートする。

【0198】

E1培養物（3付近のOD_{600 nm}）の一部を、0.02付近の初期OD_{600 nm}を有するように、20 l の培地M1を含む30 l B. Braun発酵槽に接種するために使用する。以下の条件下で培養を実施する：温度：37 °C；培養期間： 72 ± 4 時間；25 % NH_4OH および10 % H_3PO_4 を用いて6.50に調節されたpH；30 % PO_2 （カスケードでの調節：20 ~ 80 % 攪拌、空気20 (1 vvm) ~ 60 % (3 vvm)、酸素富化0 ~ 100 %)；圧力：100 mbar；50分の1 s t r u k t o lを用いる消泡調節。

40

【0199】

次いで、1 l の培養物を遠心分離バケツト中に回収し、そして上清の除去後に湿重量を決定するために20分間7000 gで4 °Cにおいて遠心分離する。

【0200】

ペレットを - 20 °Cにおいて保存する。

【0201】

50

培養物の残りを50 l NaI g e n中に回収し、そしてフェノール/エタノール(2 % V / Vの終濃度)を用いて不活性化し、そして上記の実施例2に記載のプロトコルによって多糖を回収する。

【0202】

得られた全ての結果を、下記の表8において報告する。

【0203】

【表8】

表8

培地	Columbia+NaCl	ホートレル	BTS+NaCl	M1
最終OD	21	16	17	16
[CP5] 抽出 リゾスタフィン	nd	6.6mg/l	nd	130mg/l
[CP5] 抽出 オートクレーブ	0.2mg/l	3.7mg/l	3.5mg/l	40mg/l
比収量 (μ g/OD)	0.01	0.23	0.21	2.5

10

20

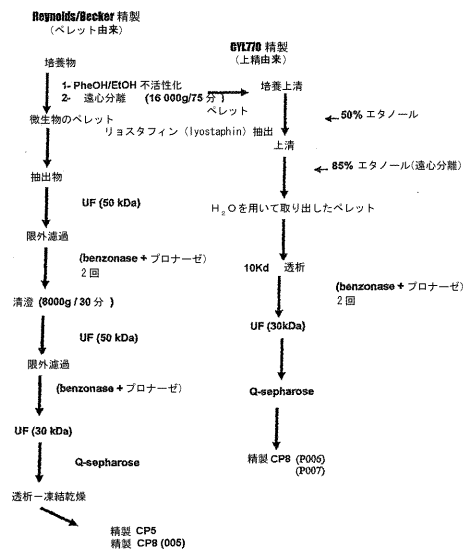
【図面の簡単な説明】

【0204】

(原文に記載なし)

【図1】

FIGURE 1



 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 1/20 E
 C 1 2 R 1:445
 C 1 2 P 19/04 C
 C 1 2 R 1:445

(72)発明者 バシュラ・ロクビ
 フランス、エフ - 6 9 0 0 3 リヨン、リュ・ヴァンドーム 2 5 4 番

(72)発明者 セリーヌ・ラフォン
 フランス、エフ - 6 9 5 9 0 サン・サンフォリアン・シュール・コワーズ、リュ・デ・ファンジュ
 1 4 番

審査官 水落 登希子

(56)参考文献 特開 2 0 0 1 - 2 7 5 6 5 7 (J P , A)
 Clin.Diag.Lab.Immunol. , 1 9 9 5 年 , Vol.2, No.2 , p.166-171
 Infect.Immunity , 1 9 9 3 年 , Vol.61, No.5 , p.1853-1858
 Infect.Immunity , 2 0 0 2 年 , Vol.70, No.7 , p.3389-3395
 Appl.Env.Microbiol. , 1 9 9 1 年 , Vol.57, No.2 , p.618-621
 J.Appl.Bacteriol. , 1 9 8 9 年 , Vol.66 , p.319-329
 J.Gen.Microbiol. , 1 9 9 1 年 , Vol.137 , p.1155-1162

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
 C 1 2 P 1 9 / 0 0 - 1 9 / 6 4
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)