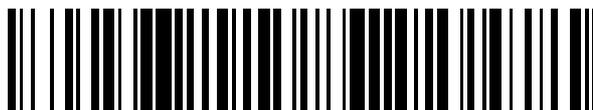


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 095**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2009 E 09756520 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2370590**

54 Título: **Procedimiento para producir la toxina APXI de Actinobacillus pleuropneumoniae empleando un medio de cultivo que contiene borogluconato de calcio**

30 Prioridad:

27.11.2008 EP 08105881
01.12.2008 US 118770 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.04.2014

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim De Körverstraat 31
5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

SLAGMAN, SIMEN-JAN;
SMITS, CHRISTIAN, THEODOOR, GERARDUS y
BULUT, BAYRAM

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 458 095 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir la toxina APXI de *Actinobacillus pleuropneumoniae* empleando un medio de cultivo que contiene borogluconato de calcio

5 La presente invención se refiere a un método para producir la toxina RTX ApxI cultivando bacterias *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un medio de cultivo que soporta el crecimiento de las bacterias, a cuyo medio se añade una sal de calcio para formar iones calcio en el medio y que contiene borogluconato, para formar un complejo de borogluconato de calcio en el medio.

10 La pleuroneumonía porcina, una grave enfermedad respiratoria en cerdos, está mundialmente extendida y causa graves pérdidas económicas a la industria porcina debido a las muertes peragudas, al tratamiento de cerdos con enfermedad aguda y a los retrasos en la comercialización de animales crónicamente infectados. El agente etiológico es *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Se transmite principalmente por contacto directo entre los animales y la infección resultante produce un curso clínico que varía de peragudo a crónico. La enfermedad es principalmente una infección del tracto respiratorio que cursa con los signos clínicos de fiebre alta, distrés respiratorio severo, tos y anorexia. La instauración de la enfermedad es rápida y la morbilidad y la mortalidad son altas. Una de las formas de control de las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (de ahora en adelante también denominado "APP") es mediante programas de vacunación. En el pasado, se han utilizado bacterinas en dichos programas, pero se las conocía por sus graves efectos colaterales. Actualmente, se usan comúnmente vacunas subunitarias basadas en las toxinas de APP.

25 APP produce las así llamadas toxinas RTX (RTX representa "repeat-in-toxin"). Es la presencia de estas toxinas RTX lo que contribuye en gran medida al carácter patogénico de esta bacteria. Las toxinas RTX han sido extensamente revisadas en el pasado y descritas en la literatura. Como es comúnmente sabido, no todos los serotipos de APP producen todas las toxinas RTX. Por ejemplo, los serotipos 1, 5, 9 y 11 producen ApxI y ApxII. Los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 producen ApxII y ApxIII. El serotipo 10 produce ApxI sólo y los serotipos 7 y 12 producen ApxII sólo. Las vacunas comercializadas actuales contra APP se basan en las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII. Bastante recientemente, se ha visto que todos los serotipos de APP producen una cuarta toxina RTX, ahora denominada ApxIV (véase EP 0.875.574).

35 Es comúnmente sabido cómo producir la toxina RTX ApxI cultivando *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un medio de cultivo al que se añade una sal de calcio (es decir, un compuesto químico, basado en un ácido, formado reemplazando todos o parte de los iones hidrógeno del ácido con uno o más iones calcio). En particular, EP 0.453.024 ya describe dicho método (véase el "Ejemplo 2", párrafo 2, "Purificación y caracterización de la hemolisina", subpárrafo "Métodos"). Obsérvese que se solía hacer referencia a ApxI como "HLY" (véase Frey *et al.*, en "J. Gen. Microbiol.", Agosto de 1993, 139(8): 1723-8"). Por esta patente EP, se conoce la adición de un compuesto de calcio (CaCl₂) al medio. Ciertamente, en Microbiol. Pathogenesis 37 (2004), 29-33, se dice que la actividad transcripcional del operón ApxI aumenta por la adición de calcio al medio de crecimiento. De esta forma, se pueden obtener altos niveles de ApxI. El medio debe soportar el crecimiento de bacterias APP. Es comúnmente sabido cómo constituir un medio que soporte el crecimiento de bacterias. Los medios de cultivo clásicos fueron originalmente desarrollados por Eagle, Ham y otros en los años 50 y 60. Vieron que un medio que cumpla con las necesidades básicas para el crecimiento debe incluir sales inorgánicas, una fuente de nitrógeno (por ejemplo, en forma de compuestos que contienen nitrógeno, tales como péptidos o proteínas), una fuente de carbono y vitaminas. Los medios son ventajosamente tamponados para evitar que se vuelvan demasiado ácidos o demasiado alcalinos. Dentro de esta receta básica, se dispone de muchas constituciones diferentes. Por ejemplo, se podría optar por componentes derivados de animales para aportar los aminoácidos, pero también se podrían escoger aminoácidos químicamente definidos. Para los otros compuestos, también son posibles numerosas variaciones. Ciertamente, constituir un medio que soporte el crecimiento de bacterias es relativamente simple. Sin embargo, la optimización del crecimiento y/o la producción de metabolitos puede llevar algún tiempo de desarrollo, en particular cuando se prefiere un medio que esté libre de suero u otros componentes derivados de animales. Se conocen, sin embargo, comúnmente en la técnica estrategias para mejorar el rendimiento del medio de fermentación, y se describen elaboradamente en la literatura (véase, por ejemplo, un artículo de revisión de Kennedy y Krouse en el Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1999), 23, 456-475). Dicha optimización forma parte de los experimentos rutinarios en un laboratorio de fermentación. En el caso del cultivo de APP, el NAD (dinucleótido de nicotinamida y adenina) forma parte inherentemente del medio, ya que el APP es dependiente de NAD. Sin NAD, el medio no soportará el crecimiento de las bacterias *Actinobacillus pleuropneumoniae* y no puede ser, por lo tanto, considerado como un medio líquido para soportar el crecimiento de APP en el sentido de la presente solicitud y de las reivindicaciones adjuntas. Se dispone comercialmente de medios para soportar el crecimiento de bacterias o de componentes para constituir dichos medios de diversas compañías, tales como Sigma Aldrich, Quest International, Oxoid, Becton Dickinson, Pharmacia, VGD Inc., Mediatech, Invitrogen, Marcor, Irvin Scientific, etc.

65 Aunque los métodos de la técnica anterior son suficientes para obtener un rendimiento económicamente relevante de la toxina ApxI, el solicitante reconoció que podría haber una posibilidad de mejora. Durante la fermentación, a saber, el medio se vuelve opaco. Fue un mérito de los solicitantes darse cuenta de que esto podría deberse a una precipitación de una o más sales de calcio. APP específicamente produce dióxido de carbono, que en el medio da

lugar a iones carbonato. El carbonato de calcio es una sal con una solubilidad particularmente baja. Como consecuencia, se pueden producir varios problemas. En primer lugar, se cree que la precipitación hace que los iones calcio implicados queden fuera del alcance de las bacterias APP. En segundo lugar, las sales de calcio precipitadas originan problemas en el procesamiento secuencia abajo. En particular, los filtros tienden a obstruirse. Por lo tanto, el solicitante añadió diversos agentes acomplejantes al medio para ver si podían o no prevenir la precipitación de la sal. Ciertamente, por ejemplo añadiendo EDTA, el medio puede permanecer más o menos transparente. Sin embargo, el rendimiento de la producción de ApxI resulta negativamente influenciado por el uso de dichos agentes acomplejantes. La hipótesis, por lo tanto, podría ser errónea o incompleta. Existe aún un continuo deseo de mejorar la producción de ApxI.

Sorprendentemente, se ha visto que, cuando se usa borogluconato (v.g., en forma de 2,3-dihidroxi-3-[2-hidroxi-5-(hidroximetil)-1,3,2-dioxaborolan-4-il]propanoato; véase también Herbert Taylor MacPherson y James Stewart, del Moredun Institute, en el *Biochemical Journal*, "Investigations on the nature of calcium borogluconate, vol. 32, nº 1, páginas 76-78, Enero de 1938) para acomplejar los iones calcio, se puede producir ApxI en gran nivel en comparación con los métodos de la técnica anterior, que no usan agentes acomplejantes (añadidos) o que se basan en otros agentes acomplejantes. Aparentemente, utilizando este agente acomplejante particular, de tal forma que el medio contiene el borogluconato de calcio complejo (v.g., disponible como ácido D-glucónico, 4,5-éster cíclico con ácido bórico, sal de calcio 2:1), se puede evitar una precipitación substancial de los iones calcio con otros iones negativos, estando al mismo tiempo los iones calcio aún disponibles para aumentar la actividad transcripcional del operón ApxI de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Aparentemente, los iones calcio permanecen atrapados en el complejo salino, donde los enlaces "atrapadores", por un lado, son lo suficientemente fuertes como para evitar que los iones calcio formen un precipitado con, por ejemplo, carbonato u otros iones negativos, pero por otro lado no evitan que la propia bacteria use los iones calcio como si estuvieran en solución libre (es decir, acomplejados sólo por moléculas de agua). Aparentemente, el borogluconato cumple exactamente con el equilibrio crítico necesario para la producción de ApxI por APP.

En una realización, la concentración de borogluconato es inferior a 60 mmol/l. Por encima de esta concentración, parece que la producción de ApxI disminuye hasta bajos niveles. Aunque es aún utilizable, se prefiere que la concentración permanezca por debajo de esta cifra. Son incluso más preferidas concentraciones de entre 25 y 45 mmol/l, en particular de 40 mmol/l, la cual parece ser óptima para varios medios.

Aunque no es esencial para la presente invención, el medio puede estar libre de componentes animales. Un inconveniente de muchos métodos de la técnica anterior es que se basan en el uso de medios que contienen componentes derivados de animales, tales como el caldo Columbia. Otros componentes derivados de animales mencionados en la técnica anterior son, por ejemplo, el Caldo Columbia Modificado o el caldo de Infusión de Cerebro y Corazón. Como es comúnmente sabido, el uso de componentes animales tiene algunos serios inconvenientes. En primer lugar, la composición química puede variar considerablemente entre lotes de producción. Además, los suplementos de origen animal pueden estar contaminados con agentes infecciosos. Un temor importante es la presencia de priones que causen EET en humanos o animales. Se podría optar simplemente por un medio libre de componentes animales (al que con frecuencia se hace referencia como un medio "ACF"). "Componente animal" en este sentido significa cualquier componente que esté presente como tal en un animal (por ejemplo, sangre o una proteína) o que derive de dicho componente (por ejemplo, suero modificado derivado de la sangre, o aminoácidos derivados de la proteína). El solicitante vio, sin embargo, que la eficacia en la producción de ApxI es muy inferior cuando se usan dichos medios ACF en comparación con medios que contienen componentes derivados de animales, incluso cuando la concentración de calcio tiene un nivel suficiente. Sin inclinarnos por la teoría, puede ser que, con el uso de suero, el problema con la precipitación de sales de calcio no sea tan grave debido a la presencia de agentes que forman complejos solubles de los iones calcio. En cualquier caso, cuando se usa borogluconato para acomplejar los iones calcio, se puede obtener también en estos medios un significativo aumento en el rendimiento de ApxI.

En otra realización, la sal de calcio es borogluconato de calcio. Aunque se podría, por ejemplo, utilizar aún cloruro de calcio como fuente de calcio y añadir una sal borogluconato para acomplejar los iones calcio, se prefiere añadir el calcio como la sal borogluconato. De esta forma, no hay necesidad de esperar el equilibrio entre las diversas reacciones físicas (precipitación, disolución, destrucción de complejos, formación de complejos) que tienen lugar en el medio. Esto ahorra tiempo y es, por lo tanto, económicamente favorable.

En aún otra realización, durante el cultivo se pasa aire a través del medio líquido, cuyo aire contiene dióxido de carbono por encima del nivel atmosférico. Sorprendentemente, se ha visto que el dióxido de carbono mejora incluso más la velocidad de producción de ApxI. Se hace notar que generalmente se conoce la utilización de un mayor nivel de dióxido de carbono durante el cultivo de colonias de bacterias en placas (véase v.g., US 6.019.984: Ejemplos "Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento"). Sin embargo, esto concierne al cultivo de colonias de bacterias, cuyas bacterias son entonces utilizadas para inocular fermentadores. En esta etapa, la producción de toxinas RTX no es relevante. E incluso más, se entiende, en general (véase, v.g., *Microbial Pathogenesis* 37 (2004), 29-33), que la máxima producción de ApxI tiene lugar a altas densidades celulares en los fermentadores, y por lo tanto al final de la fase de crecimiento exponencial. En esta etapa, se entiende que el dióxido de carbono ya no es relevante como factor estimulante. Por lo tanto, no se ha intentado con anterioridad aumentar la producción de ApxI usando mayores

niveles de dióxido de carbono. En particular, el solicitante reconoció que, cuando el aire contiene un 5 % v/v de dióxido de carbono (volumen de dióxido de carbono puro con respecto a volumen de aire simple), la producción de ApxI ocurre a un muy alto nivel. Se hace notar que se pueden emplear muchas técnicas para pasar aire a través del medio en esta realización, normalmente, sin embargo, mediante un dispositivo que deja que las burbujas de aire se escapen a algún lugar del medio (es decir, bajo la superficie del medio). "Aire", en el contexto de la presente invención, significa un medio gaseoso que tiene uno o más componentes gaseosos que están normalmente presentes en el aire atmosférico, tales como oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, helio, neón, argón, xenón, radón, etc.

10 La invención será además explicada utilizando los siguientes ejemplos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana y medios

15 Los estudios fueron realizados usando una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* productora de ApxI, serotipo 10, en adelante denominada APP 10. En todos los casos, se reconstituyó una semilla de trabajo de esta cepa usando placas de Blood AgarBASE (BAB) Columbia (de Becton Dickinson, EE.UU.). Los medios líquidos utilizados eran, o bien caldo Columbia (de Becton Dickinson, EE.UU.) mantenido a un pH de 7,3 usando NaOH y ácido acético, o bien un medio libre de componentes animales (denominado "medio ACF"). Este último medio contiene 20 MgSO₄ (0,75 g/l), cisteína.HCl (0,1 g/l), FeCl₃ (0,1 g/l), NaNO₃ (0,1 g/l), KCl (0,1 g/l), elementos traza (v.g., 2,5 ml de solución SL-10 como se menciona en el Handbook of Microbiological Media, 3ª edición, Ronald Atlas, CRC Press, 2004), solución de glucosa al 50 % (10 ml) y una solución de aminoácidos 10 mM (que contiene los 20 aminoácidos, a excepción del triptófano), tampón HEPES (6 g/l; v.g., de Sigma Aldrich) y extracto de levadura (10 g/l; v.g., de Becton Dickinson).

25 Estos medios fueron utilizados en los precultivos y en las fermentaciones. Se usaron dinucleótido de nicotinamida y adenina (0,01 %) y calcio (varias concentraciones) en los precultivos y en las fermentaciones. Todos los medios fueron esterilizados por filtración a través de 0,22 µm. Antes de su utilización en las fermentaciones, los medios fueron calentados a 85 °C durante un minuto.

Cultivo

35 Se plaqueó una semilla de trabajo de la cepa APP 10 sobre una placa de BAB Columbia y se incubó durante aproximadamente 24 horas a 37 °C. Se recogieron varias colonias para inocular una botella de 500 ml que contenía 75 ml de caldo Columbia. Se incubó la botella durante aproximadamente 6 horas a 37 °C bajo agitación, para formar un precultivo. Con este precultivo se llevaron a cabo varias fermentaciones. Algunas de éstas tuvieron lugar en botellas de 500 ml. En ese caso, se inocularon 75 ml del medio con 1 ml del precultivo. Se incubaron las botellas a 37 °C con agitación. Alternativamente, el cultivo tuvo lugar en fermentadores SIXFORS (Infors AG, Suiza) que 40 contenían aproximadamente 400 ml de medio de cultivo, a los que se añadieron 20 ml del precultivo como inóculo. La temperatura de cultivo era también de 37 °C.

Análisis

45 Se determinó el crecimiento celular midiendo la densidad óptica (DO) a 660 nm. Se midió la concentración de antígeno ApxI por determinación ELISA de rutina.

RESULTADOS

50 Se realizó el primer experimento para determinar si el calcio, a pesar de estar acomplejado con borogluconato, está o no aún disponible para las bacterias APP. Se realizó este experimento en las botellas descritas anteriormente. A continuación, se indican los resultados en la tabla 1.

Tabla 1

Medio	Antígeno ApxI (U/ml)
Caldo Columbia, sin Ca añadido	0
Caldo Columbia, con adición de Ca-borogluconato 25 mM	7

55 Como indican los datos de la Tabla 1, se puede obtener un buen rendimiento en ApxI cuando se acomplejan los iones calcio con borogluconato. Una importante ventaja de esta acomplejación es que las precipitaciones de sales de calcio ya no influyen significativamente en el procesamiento secuencia abajo.

60 Se realizó el segundo experimento para ver qué efecto tiene el borogluconato en el medio libre de componentes animales. Con este fin, comparamos la adición de CaCl₂ 20 mM con la adición de Ca-borogluconato 20 mM. En la Tabla 2 se representan los resultados.

Tabla 2

Medio	Antígeno Apxl (U/ml)
ACF, con adición de CaCl ₂ 20 mM	1
ACF, con adición de Ca-borogluconato 20 mM	24

- Se obtienen dos resultados. En primer lugar, está claro que la obtención de cantidades suficientes de Apxl en un medio ACF es difícil cuando se usa cloruro de calcio, incluso cuando se crean niveles de calcio normales. Cuando se acompleja el calcio con borogluconato, se puede obtener un elevado rendimiento en Apxl. Se pueden obtener resultados comparables en otros medios. Realizamos dicho experimento en un medio que no contenía ni cloruro de hierro ni sulfato de magnesio ("ACF-alt"), pero que por lo demás era el mismo que el medio ACF antes descrito. Una vez más, se obtuvieron niveles significativamente aumentados cuando se acomplejó el calcio con borogluconato.
- Se realizó un tercer experimento para estudiar la influencia de la concentración de borogluconato. Utilizamos tres concentraciones diferentes, a saber, 20, 40 y 60 mM de borogluconato de calcio. En la Tabla 3 se representan los resultados.

Tabla 3

Medio	Antígeno Apxl (U/ml)
ACF, con adición de Ca-borogluconato 20 mM	4
ACF, con adición de Ca-borogluconato 40 mM	31
ACF, con adición de Ca-borogluconato 60 mM	1

- Como queda claro por la Tabla 3, una concentración de alrededor de 40 mM parece ser ideal. En un cuarto experimento, estudiamos el efecto de mayores niveles de dióxido de carbono sobre el rendimiento en la producción de Apxl. Para ello, usamos el medio ACF-alt antes descrito y aumentamos el nivel de nitrato de sodio a 0,5 g/l. Se varió la concentración de borogluconato entre 40, 50 y 70 mM. Se consiguió la mayor concentración de CO₂ manteniendo un flujo de aire constante en el fermentador de 1 wm (= volumen de gas por volumen de medio por minuto) para una mezcla de aire/CO₂ 95/5 v/v. Los experimentos fueron llevados a cabo en un fermentador SIXFORS como se ha descrito anteriormente. En la Tabla 4 se representan los resultados.

Tabla 4

Medio	ELISA Antígeno Apxl (U/ml)
ACF-alt, con adición de Ca-borogluconato 40 mM, 5 % de CO ₂	520
ACF-alt, con adición de Ca-borogluconato 50 mM, 5 % de CO ₂	357
ACF-alt, con adición de Ca-borogluconato 70 mM, 5 % de CO ₂	222

- Por los resultados, puede concluirse que el dióxido de carbono tiene una influencia positiva sobre el rendimiento en la producción de Apxl: incluso a una concentración de borogluconato de calcio 70 mM, se pueden producir niveles aceptables de Apxl. Una vez más, 40 mM parece ser una concentración óptima.

30 **CONCLUSIÓN**

- El solicitante vio que, en un medio de cultivo líquido que soporta el crecimiento de bacterias APP, el borogluconato puede proporcionar el equilibrio crítico entre la prevención de la precipitación de iones calcio con iones de carga negativa por un lado, y el mantenimiento de los iones calcio disponibles para estimular la producción por *Actinobacillus pleuropneumoniae* de Apxl por el otro. Esto puede ser ventajosamente utilizado en cualquier medio de cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que contenga iones negativos que formen un precipitado con iones calcio. Ciertamente, dependiendo del medio seleccionado y de la optimización de sus constituyentes, las propias bacterias APP producirán niveles mayores o menores de Apxl. Pero, como la acción protectora del borogluconato operará independientemente de la velocidad real de producción de las propias bacterias, esta solución puede ser eficazmente aplicada a todos los medios, en particular porque todos los medios contienen de manera inherente iones carbonato, que son iones que pueden formar un precipitado con iones calcio.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir toxina RTX ApxI cultivando bacterias *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un medio de cultivo que soporta el crecimiento de las bacterias, medio al que se añade una sal de calcio para formar iones de calcio en el medio, **caracterizado por que** el medio de cultivo contiene borogluconato para formar un complejo de borogluconato de calcio en el medio.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la concentración de borogluconato es menor de 60 mmol/l.
3. Método según la reivindicación 2, **caracterizado por que** la concentración está entre 25 y 45 mmol/l.
4. Método según la reivindicación 3, **caracterizado por que** la concentración es de 40 mmol/l.
- 15 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la sal de calcio es borogluconato de calcio.
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** durante el cultivo se pasa aire a través del medio líquido, conteniendo dicho aire dióxido de carbono por encima del nivel atmosférico.
7. Método según la reivindicación 6, **caracterizado por que** el aire contiene un 5 % v/v de dióxido de carbono.