

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 193**

51 Int. Cl.:
C07K 14/34 (2006.01)
C12N 15/77 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09176267 .4**
96 Fecha de presentación: **21.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2174950**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

54 Título: **Procedimiento de fermentación para la producción de toxina diftérica**

30 Prioridad:
23.03.2005 GB 0505996

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.04.2012

73 Titular/es:
**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:
**Dehottay, Phillippe Marc Helene;
Dessoy, Sandrine;
Laloux, Olivier Marc Serge Ghislain y
Orval, Marc Roger Fernand**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 378 193 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fermentación para la producción de toxina diftérica.

La presente invención se refiere al campo de los antígenos diftéricos, en particular toxinas (incluyendo formas mutantes de la toxina diftérica, como CRM197) y a procedimientos de fermentación para la fabricación de cultivos heterogéneos de dichos antígenos.

La toxina diftérica es una exotoxina de proteínas producida por la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. Se produce como un polipéptido único que se divide fácilmente para formar dos subunidades unidas por un puente disulfuro, Fragmento A y Fragmento B, como resultado de la escisión en el residuo 190, 192 ó 193 (Moskaug et al Biol. Chem. 264: 15709-15713, 1989). El Fragmento A es la parte catalíticamente activa y es una ADP-ribosiltransferasa dependiente de NAD que se dirige específicamente a un factor de síntesis de proteínas EF-2, inactivando de este modo al EF-2 y deteniendo la síntesis de proteínas en una célula.

La inmunidad a una toxina bacteriana como la toxina diftérica puede adquirirse de forma natural durante el curso de una infección, o de forma artificial por inyección de una forma desintoxicada de la toxina (toxóide) (Germanier, er, Bacterial Vaccines, Academic Press, Orlando, FL., 1984). Los toxoides se han preparado tradicionalmente mediante modificación química de toxinas nativas (Lingood et al Brit. J. Exp. Path. 44; 177, 1963), haciéndolos no tóxicos, mientras que se conserva la antigenicidad que protege al animal vacunado contra la posterior exposición a la toxina natural. Como alternativa, se han descrito varias toxinas diftéricas mutadas que tienen toxicidad reducida (documentos US-4709017, US-4950740).

CRM197 es una forma no tóxica de la toxina diftérica pero que es inmunológicamente indistinguible de la toxina diftérica. CRM197 es producida por *C. diphtheriae* infectada por la fase no toxinógena β 197tox- creada por mutagénesis con nitrosoguanidina del corinefago toxinógeno b (Uchida et al., Nature New Biology (1971) 233; 8-11). La proteína CRM197 tiene el mismo peso molecular que la toxina diftérica pero difiere de ella en un único cambio de base en el gen estructural. Esto conduce a un cambio de glicina por glutamina del aminoácido en posición 52 que hace al fragmento A incapaz de unirse a NAD y, por lo tanto, no tóxico (Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem. 46; 69-94, Rappuoli Applied and Environmental Microbiology Sept 1983 págs. 560-564).

El toxóide diftérico y una forma mutante con toxicidad reducida, CRM197, son componentes de muchas vacunas que proporcionan inmunidad contra *Corynebacterium diphtheriae*. Se conocen varias vacunas de combinación que pueden prevenir *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y opcionalmente virus de Hepatitis B y/o *Haemophilus influenzae* de tipo b (véase, por ejemplo, los documentos WO-93/24148 y WO-97/00697, WO-02/055105).

También se han usado toxina diftérica y formas mutantes que incluyen CRM197 en vacunas como vehículos seguros y eficaces dependientes de células T para sacáridos. CRM197 se usa actualmente en la vacuna conjugada con CRM197 de oligosacárido de *Haemophilus influenzae* de tipo b (HibTitré®; Lederle Praxis Biologicals, Rochester, N.Y.).

Los métodos para preparar toxóide diftérico (TD) se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el TD puede producirse mediante purificación de la toxina a partir de un cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* seguido de desintoxicación química, o puede prepararse mediante purificación de un análogo recombinante, o desintoxicado genéticamente de la toxina (por ejemplo, CRM197, u otros mutantes como se describe en los documentos US-4.709.017, US-5.843.711, US-5.601.827 y US-5.917.017). *Corynebacterium diphtheriae* se cultiva en condiciones aerobias. Rappuoli et al (Biotechnology febrero de 1985, pág. 161-163) sugieren que la pO₂ debe regularse al 25% mediante aireación con una mezcla de aire y oxígeno que se regula automáticamente para mantener la pO₂ deseada.

La producción de cantidades significativas de toxinas diftéricas tales como CRM197 para su uso en vacunas se ha visto obstaculizada debido a la baja abundancia de proteínas. Este problema se ha abordado previamente mediante la introducción de copias adicionales de un gen que codifica la toxina diftérica o una forma mutante en *Corynebacterium diphtheriae* (documentos US-4.925.792; US-5.614.382). Dichos métodos conducen a un aumento en la producción de aproximadamente tres veces. Los métodos para mejorar adicionalmente los rendimientos de toxina diftérica en una forma reproducible serían beneficiosos para permitir niveles más altos de producción de estos valiosos antígenos.

Por consiguiente, la presente solicitud proporciona un procedimiento de fermentación mejorado que comprende una etapa de fermentación de cultivar una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* en medio en un fermentador en condiciones de agitación suficiente para mantener un cultivo homogéneo y aireación limitada de manera que la pO₂ dentro del cultivo desciende a menos del 4% durante la mayoría de la etapa de fermentación.

La fermentación tiene lugar en condiciones aerobias, aunque de aireación limitada, de modo que se usa oxígeno hasta que entra en el cultivo durante la mayoría de la fermentación, es decir, después de la fase inicial en la que la densidad de *C. diphtheriae* es relativamente baja y los niveles de pO₂ pueden ser más altos. Los inventores han descubierto que el cultivo en dichas condiciones da como resultado una expresión más eficaz y/o coherente de toxina diftérica o mutante en comparación con los métodos de fermentación realizados a una pO₂ más alta. El

procedimiento de la invención es más robusto que la fermentación a niveles más altos de oxígeno, y permite rendimientos de toxina diftérica que se mantienen altos incluso cuando el medio de cultivo contiene hierro añadido o cuando se usan materias primas complejas de calidad variable.

5 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para fabricar una preparación de toxina diftérica o mutante de la misma que comprende realizar el procedimiento de fermentación de la invención y aislar la toxina diftérica o mutante de la misma a partir del cultivo. Aunque la toxina diftérica y los mutantes se describen en este documento, se prevé que puede aislarse cualquier antígeno de *C. diphtheriae* usando el procedimiento de la invención.

10 El uso de dicho método da como resultado rendimientos más elevados de toxina diftérica o mutante, por ejemplo CRM197, en comparación con cuando se mantiene la pO₂ al 5% o superior, por ejemplo al 20%.

Descripción de las figuras

15 Figura 1 - Gráficos que muestran el perfil de oxigenación y su uso para determinar el K_{La} de una fermentación. El panel A muestra la evolución temporal de la oxigenación después de un desplazamiento de nitrógeno a aire. El panel B muestra una representación de ln(100-pO₂) con respecto al tiempo que permite la evaluación del K_{La} mediante la determinación del gradiente de la línea.

Figura 2 - Visión general de un procedimiento de fermentación para *C. diphtheriae*.

Figura 3 - Gráfico que muestra la cinética típica de crecimiento de un cultivo de *C. diphtheriae*. La línea con marcadores circulares muestra la DO a 650 nm después de diversos tiempos de cultivo. La línea marcada con rombos muestra el pH del cultivo.

20 Figura 4 - Geles SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivo. Pista 1 - marcadores de peso molecular, pista 2-1 µg de CRM197 estándar, pista 3-0,5 µg de CRM197 estándar, pista 4-0,25 µg de CRM197 estándar, pistas 5-11, sobrenadantes de fermentaciones de *C. diphtheriae*. El Gel A muestra los sobrenadantes de CDT082 en la pista 5, CDT198 en las pistas 6-8 (el sobrenadante se retiró a las 22,5 horas para la pista 6, 24 horas para la pista 7 y 28 horas para la pista 8), CDT199 en las pistas 9, 10 y 11 (el sobrenadante se retiró a las 22 horas 45 minutos en la pista 9, 24 horas 45 minutos en la pista 10 y después de la posterior microfiltración y filtración en la pista 11). El Gel B muestra sobrenadantes de CDT082 en la pista 5, de CDT205 en las pistas 6-9 (pista 7 después de 21 horas 43 min de fermentación, pista 8 después de 23 horas de fermentación, pista 9 después de 24 horas de fermentación) y de CDT206 en las pistas 10-13 (pista 10 después de 22 horas 10 minutos de fermentación, pista 11 después de 23 horas 49 minutos de fermentación, pista 12 después de 24 horas 30 minutos de fermentación, pista 13 después de microfiltración y filtración).

Figura 5 - Gráfico que muestra el K_{La} de un fermentador de 150 litros a diferentes velocidades de agitación en condiciones de aireación de 23 litros por minuto.

Descripción detallada de la invención

35 Las expresiones “que comprende”, “comprenden” y “comprende” en este documento pretenden según los inventores ser sustituibles opcionalmente por las expresiones “que está constituido/a por”, “constituidos/as por” y “constituido/a”, respectivamente, en cada caso.

40 Un aspecto de la invención es un procedimiento de fermentación que comprende una etapa de fermentación de cultivo de una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* en medio en un fermentador en condiciones de agitación suficiente para mantener un cultivo homogéneo (por ejemplo suficiente para producir un tiempo de mezclado inferior a 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 segundos) y aireación limitada de manera que la pO₂ dentro del cultivo caiga por debajo del 5%, 4%, 3%, 1% o 0,5% durante la mayoría de la etapa de fermentación. En una realización preferida, la pO₂ cae a aproximadamente cero, preferiblemente durante la mayoría de la etapa de fermentación.

45 Por ejemplo, la pO₂ dentro del cultivo cae a menos del 5%, 4%, 3%, 1% o 0,5% desde el momento en el que la *Corynebacterium diphtheriae* se ha cultivado a una densidad suficiente para que consuma la mayor parte del oxígeno en cuanto el oxígeno entra en el cultivo (la fase de latencia, por ejemplo a partir de al menos 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 horas después del inicio de la fermentación), hasta el punto en la fermentación en el que la concentración de pO₂ vuelve a subir, cerca del final de la etapa de fermentación (por ejemplo 16, 18, 20, 22 ó 24 horas después de la fase de latencia). La fermentación termina normalmente y el cultivo se recoge cuando la pO₂ sube por encima de las condiciones de aireación limitada. Debe observarse que, en diferentes condiciones de inoculación, por ejemplo 50 cuando se inocula el fermentador con un cultivo mucho mayor de *C. diphtheriae*, las condiciones de aireación limitada comienzan inmediatamente después del inicio de la de fermentación (por ejemplo, 1, 5, 10, 20, 30, 40 ó 60 minutos después del inicio de la fermentación).

55 Una pO₂ del 100% es la cantidad de oxígeno presente cuando el medio (en ausencia de un cultivo) se satura con oxígeno después del burbujeo de aire comprimido a través del medio a 34,5°C y una presión de 0,5 bares. Para un fermentador de 150 litros, la tasa de aireación y la velocidad de agitación deben ajustarse a 23 litros/minuto y 240

rpm, mientras que para un fermentador de 20 litros, la tasa de aireación y la velocidad de agitación deben ajustarse a 3 litros/minuto y 300 rpm. Puede ajustarse como la cantidad de oxígeno presente en un medio de fermentación totalmente aireado antes de la inoculación.

5 Un cultivo homogéneo es un cultivo en el que las bacterias están dispersadas uniformemente por todo el fermentador de modo que al menos el 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10% de las bacterias están presentes en el 10% superior del medio de cultivo.

10 Una etapa de fermentación se define como la etapa en la que se cultiva *Corynebacterium diphtheriae* dentro del fermentador. La etapa de fermentación comienza con la introducción del precultivo en el fermentador y termina cuando, en las condiciones de aireación limitada descritas en este documento, la pO₂ aumenta eventualmente hasta más del 10%. La etapa de fermentación dura típicamente más de 12, 14, 16, 18, 20 ó 24 horas, por ejemplo entre 16 y 40 horas, o por ejemplo entre 22 y 28 horas.

15 La agitación se realiza opcionalmente agitando el cultivo en el fermentador, pero puede realizarse mediante cualquier otro medio adecuado, por ejemplo por agitación, vibromezclador y/o burbujeo de gas. La agitación es suficiente para producir un tiempo de mezclado para el cultivo de menos de 20, 15, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 segundos.

Puede medirse un tiempo de mezclado de un cultivo en un fermentador de vidrio. Éste es el tiempo transcurrido después de la introducción de una solución acuosa coloreada para que la solución acuosa coloreada se disperse uniformemente en todo el medio de cultivo.

20 Un fermentador es cualquier aparato adecuado para la producción industrial de cultivos bacterianos. Sin embargo, este término no incluye matraces de cultivo que se usan típicamente para el cultivo de bacterias a menor escala.

La mayoría de la etapa de fermentación se define como un tiempo de más del 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la duración total de la etapa de fermentación. La fermentación es normalmente en condiciones de aireación limitada durante 12, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ó 28 horas.

25 La aireación limitada describe las condiciones de aireación que permiten a *C. diphtheriae* usar respiración aerobia y siguen limitando la cantidad de oxígeno disponible de manera que, después de que el cultivo haya aumentado en densidad (por ejemplo después de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 horas de fermentación) el oxígeno se consume muy pronto después de entrar en el cultivo, de modo que la pO₂ es inferior al 5, 4, 3, 2, 1 ó 0,5%. Debe observarse que, al aumentar la cantidad de cultivo usado para inocular en el fermentador, las condiciones de aireación limitada podrían conseguirse muy pronto después de la inoculación (por ejemplo después de 1, 5, 10, 20 ó 30 minutos después del inicio de la fermentación).

Dichas condiciones de aireación limitada conducen a una expresión robusta de una toxina como toxina diftérica o mutantes de la misma.

35 Una pO₂ que cae a aproximadamente cero se consigue siendo la tasa de aireación y agitación de modo que el oxígeno introducido en el cultivo sea consumido por el cultivo para respiración inmediatamente después de su introducción en el cultivo, de modo que a pesar de la aireación del cultivo, la pO₂ se lee como cero o cercana a cero en un monitor de oxígeno.

40 Durante la etapa de fermentación, la pO₂ empezará en un nivel más elevado para un ajuste de agitación y una tasa de aireación dadas. Esto se debe a que la densidad de bacterias en el cultivo es baja al inicio de la etapa de fermentación y aumenta durante la etapa de fermentación. Se requiere típicamente un periodo de tiempo (por ejemplo, hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 horas) antes de que la pO₂ descienda a menos del 5%. Desde este momento en adelante, la pO₂ permanece por debajo del 5, 4, 3, 2, 1 ó 0,5%, preferiblemente en un nivel de aproximadamente cero hasta cerca del fin de la etapa de fermentación, por ejemplo hasta la recogida del fermentador.

45 Opcionalmente, la etapa de fermentación se efectúa a KLa constante durante toda la etapa de fermentación. Como alternativa, la etapa de fermentación se efectúa a uno o más KLa de manera que la aireación limitada se consiga a los valores de KLa presentes durante la mayoría (al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) de la etapa de fermentación.

50 El KLa es una medición de la tasa a la que el oxígeno entra en el cultivo. Cuanto más alto es el KLa, mayor es la tasa a la que se introduce oxígeno en el cultivo. Varios factores, como el volumen y la composición, la agitación, la aireación, la presión, la temperatura del medio y la posición y las características de las partes móviles del fermentador influirán en el KLa de una etapa de fermentación particular.

55 Típicamente, el oxígeno se introduce en el cultivo de fermentación haciendo burbujear aire comprimido a través del cultivo. Cuando hay diferentes concentraciones de oxígeno presentes en el aire introducido en el cultivo, el caudal debe adaptarse para tener esto en cuenta. Por ejemplo, cuando se introduce un suministro de oxígeno al 100% en el cultivo, el caudal sería consecuentemente más bajo. Cuando se introduce gas que contiene menos oxígeno que el

aire en el cultivo, podría aplicarse un caudal más alto.

El KLa puede medirse usando el método descrito en el Ejemplo 1. El método implica el ajuste del fermentador con las condiciones de volumen, temperatura, presión, agitación y aireación del medio para las que se va a medir el KLa, expulsión de gas sustituyendo el aire por gas nitrógeno, introducción de gas restaurando la aireación con aire y midiendo la tasa a la que la pO₂ recupera su nivel de estado estacionario.

$$\ln(100-pO_2) = -KLa \cdot T + C$$

Al representar gráficamente $\ln(100-pO_2)$ frente al tiempo, el gradiente (o coeficiente angular) de la línea es -KLa.

En el KLa de una etapa de fermentación influyen una serie de factores como la cantidad de agitación del cultivo y la tasa de aireación del cultivo. Puede mantenerse un KLa constante mientras, por ejemplo, se reduce la agitación del cultivo y se incrementa la tasa de aireación o viceversa. Sin embargo, en una realización, tanto la agitación del cultivo como la tasa de aireación son constantes durante la etapa de fermentación.

La etapa de fermentación se realiza, por ejemplo, a un KLa de entre 10-200 h⁻¹, 10 - 150 h⁻¹, 10 - 100 h⁻¹, 10-80 h⁻¹, 10-50 h⁻¹, 10-40 h⁻¹, 10-30 h⁻¹, 20-150 h⁻¹, 20-100 h⁻¹, 20-50 h⁻¹, 20-60 h⁻¹, 20-80 h⁻¹, 20-30 h⁻¹, 20-40 h⁻¹, 30-60 h⁻¹, 60-80 h⁻¹, 60-150 h⁻¹ ó 60-200 h⁻¹.

El KLa del procedimiento de fermentación de la invención puede diferir, dependiendo del tamaño del cultivo de fermentación. Para cultivos de 10-30 litros, puede usarse un KLa de 10-30 h⁻¹, 15-30, 20-30 ó 22-28 h⁻¹. Para cultivos de 30-250 litros, puede usarse un KLa de 30-60 o 40-50 h⁻¹. Para cultivos de 250-800 litros puede usarse un KLa de 30-50, 40-50, 40-60, 30-60, 30-80 ó 60-150 h⁻¹. Para cultivos de 800-3000 litros puede usarse un KLa de 30-50, 40-50, 40-60, 30-60, 30-80, 60-150 ó 60-200 h⁻¹.

Para un tamaño de cultivo de fermentación de 10-30 litros, se consigue un KLa de 10-30 h⁻¹ usando, por ejemplo, un flujo de aire o tasa de aireación de 1 a 5 litros/minuto y una velocidad de agitación de 200 a 400 rpm, por ejemplo una tasa de aireación de 2 a 4 litros/minuto y una velocidad de agitación de 250 a 350 rpm.

Para un cultivo de fermentación de 30-250 litros, se consigue un KLa de 30 a 60 h⁻¹ usando, por ejemplo, un caudal de aire de 15 a 25 litros/minuto y una velocidad de agitación de 150 a 250 rpm, por ejemplo usando un caudal de aire de 20 a 25 litros/minuto y una velocidad de agitación de 200 a 250 rpm, por ejemplo usando un caudal de aire de 15 a 20 litros/minuto y una velocidad de agitación de 200 a 250 rpm.

El pH del cultivo de *C. diphtheriae* en medio CY durante la etapa de fermentación depende de las condiciones de aireación y agitación del cultivo (Nikolajewski et al J. Biological Standardization, 1982, 10; 109-114). Al inicio de la etapa de fermentación, el pH del medio CY es 7,4. En el caso de baja aireación o KLa, el pH desciende a aproximadamente 5. En el caso de alta aireación, el pH aumenta hasta aproximadamente 8,5. En una realización de la invención, *C. diphtheriae* se cultiva en medio CY o medio SOC (Sambrook J et al 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) o medios similares. El pH dentro del fermentador puede mantenerse entre 7,0 y 7,8, mediante el grado de aireación, sin requerir opcionalmente adición de ácido o base.

El procedimiento de la invención puede usarse con cualquier cepa de *Corynebacterium diphtheriae*. Dichas cepas pueden producir toxina diftérica de tipo silvestre, proteínas de fusión que incluyen toxina diftérica o un fragmento de la misma (por ejemplo, las descritas en el documento US-5863891) o formas mutantes o fragmentos de toxina diftérica, preferiblemente aquellas que tienen toxicidad reducida. Algunos ejemplos de dichas toxinas mutantes son CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Marcel Dekker Inc, 1992; delección o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones desveladas en los documentos US-4709017 o US-4950740; mutación de al menos uno o más restos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones descritas en los documentos US-5917017 o US-6455673; o fragmento descrito en el documento US-5843711. En una realización, la cepa de *C. diphtheriae* produce CRM197.

En una realización, se usan las siguientes cepas de *C. diphtheriae* en los procedimientos de la invención; ATCC39255, ATCC39526, ATCC11049, ATCC11050, ATCC11051, ATCC11951, ATCC11952, ATCC13812, ATCC14779, ATCC19409, ATCC27010, ATCC27011, ATCC27012, ATCC296, ATCC43145, ATCC51280 o ATCC51696.

El medio para su uso en la invención puede contener uno o más de los siguientes constituyentes: 5-20 g/l, 10-16 g/l o 10 g/l de casaminoácidos o hidrolizado de caseína, 5-20 g/l, 7-15 g/l o 9-12 g/l de peptona de soja y/o 10-40 g/l, 14-32 g/l o 18-22 g/l de extracto de levadura.

Se sabe que el contenido de hierro del medio de cultivo puede afectar al crecimiento de *C. diphtheriae* e influir en la producción de toxinas (véase el documento WO-00/50449). El hierro es esencial para el crecimiento bacteriano, sin embargo, se ha demostrado que el hierro en grandes concentraciones inhibe la producción de toxina. Durante el procedimiento de la invención, el contenido de hierro del medio tiene un nivel inferior de 10, 50, 75, 100, 120 ó 150

ppb y un límite superior de 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000 ó 5.000 ppb. Por ejemplo, las concentraciones de hierro en el medio son: 50-1.000 ppb, 100-1.000 ppb, 200-1.000 ppb, 400-1.000 ppb, 500-1.500 ppb, 700-1.300 ppb, 50-2.000 ppb, 100-2.000 ppb, 200-2.000 ppb, 400-2.000 ppb, 700-2.000 ppb, 50-3.000 ppb, 100-3.000 ppb, 200-3.000 ppb, 400-3.000 ppb, 700-3.000 ppb, 1.000-3.000 ppb, 1.500-3.000 ppb, 1.700-3.000 ppb, 50-4.000 ppb, 100-4.000 ppb, 200-4.000 ppb, 400-4.000 ppb, 700-4.000 ppb, 1.000-4.000 ppb, 1.500-4.000 ppb, 1.700-4.000 ppb o 2.000-4.000 ppb. El hierro puede estar en forma de Fe²⁺ y/o Fe³⁺.

En una realización, el procedimiento de la invención es suficientemente tolerante a la presencia de sales de hierro en el medio, de modo que no se requiere tratamiento del medio para retirar el hierro antes del uso.

La etapa de fermentación tiene lugar a una temperatura adecuada para el cultivo de *C. diphtheriae*, por ejemplo 25-45°C, 25-40°C, 30-38°C o 34-35°C.

La etapa de fermentación está sujeta a una gran cantidad de producción de espuma. Para controlar la formación de espuma, se añade opcionalmente un agente antiespumante al fermentador. Opcionalmente se usa una sonda de espuma o un dispositivo mecánico rompedor de espuma en el fermentador, por ejemplo, así como el agente antiespumante.

Un segundo aspecto de la invención es un procedimiento para fabricar una preparación de un antígeno, por ejemplo, toxina diftérica o mutante o fragmento de la misma, que comprende las etapas de realizar el procedimiento de fermentación de la invención, como se ha descrito anteriormente y aislar el antígeno, por ejemplo, toxina diftérica o mutante o fragmento de la misma, a partir del cultivo.

La toxicidad de la toxina diftérica se reduce opcionalmente mediante tratamiento químico que incluye tratamiento con reactivos reticulantes para formar un toxoide. Las referencias a una toxina incluyen toxoides.

La toxina diftérica, o mutante de la misma, por ejemplo CRM197, o fragmento de la misma preparado usando el procedimiento de la invención puede formularse con polisacáridos u oligosacáridos capsulares obtenidos de uno o más de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos del Grupo A, estreptococos del Grupo B, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*. Por ejemplo, la composición farmacéutica o inmunógena puede comprender polisacáridos capsulares obtenidos de uno o más de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *Neisseria meningitidis*. Por ejemplo los serogrupos A y C; A y W, A e Y; C y W, C e Y, W e Y; A, C y W; A C e Y; A, W e Y; C, W e Y o A, C, W e Y pueden formularse con CRM197. En otro ejemplo, la composición inmunógena comprende polisacáridos capsulares obtenidos de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de polisacáridos capsulares de neumococos se seleccionan preferiblemente entre serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (de la forma más preferible de serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Un ejemplo adicional contendría los polisacáridos (u oligosacáridos) capsulares PRP de *Haemophilus influenzae* de tipo b. Un ejemplo adicional contendría polisacáridos capsulares de Tipo 5, Tipo 8, 336, PNAG o dPNAG de *Staphylococcus aureus*. Un ejemplo adicional contendría los polisacáridos capsulares de Tipo I, Tipo II, Tipo III o PIA de *Staphylococcus epidermidis*. Un ejemplo adicional contendría los polisacáridos capsulares de Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II o Tipo III de estreptococos del Grupo B. Un ejemplo adicional contendría los polisacáridos capsulares de estreptococos del Grupo A, comprendiendo opcionalmente además al menos una proteína M y más preferiblemente múltiples tipos de proteína M.

Los polisacáridos bacterianos pueden ser de longitud completa, siendo polisacáridos nativos purificados. Como alternativa, los polisacáridos tienen un tamaño entre 2 y 20 veces, por ejemplo de 2-5 veces, de 5-10 veces, de 10-15 veces o de 15-20 veces, de modo que los polisacáridos tengan un menor tamaño para una mayor manejabilidad. Los oligosacáridos contienen normalmente entre 2 y 20 unidades de repetición.

Dichos polisacáridos capsulares pueden estar no conjugados o conjugados a una proteína portadora como un toxoide tetánico, fragmento C de toxoide tetánico, toxoide diftérico o CRM197 (ambos preparados, por ejemplo, mediante el método de la invención), neumolisina o Proteína D (documento US-6342224). La toxina tetánica, la toxina diftérica y la neumolisina se desintoxican mediante mutación genética y/o mediante tratamiento químico.

El conjugado de polisacáridos u oligosacáridos puede prepararse mediante cualquier técnica de acoplamiento conocida. Por ejemplo, el polisacárido puede acoplarse por medio de un enlace tioéter. Este método de conjugación se basa en la activación del polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse de este modo directamente o por medio de un grupo separador a un grupo amino en la proteína portadora. Opcionalmente, el éster de cianato se acopla con hexanodiamina y el polisacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora usando química de heteroligamiento que implica la formación del enlace tioéter. Dichos conjugados se describen en la solicitud publicada PCT W0-93/15.760 de la Uniformed Services University.

Los conjugados pueden prepararse también mediante métodos de aminación reductora directa según se describe en los documentos US-4365170 (Jennings) y US-4673574 (Anderson). Otros métodos se describen en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.

Un método adicional implica el acoplamiento de un polisacárido activado con bromuro de cianógeno derivatizado con

hidrazida de ácido adípico (ADH) para la proteína portadora mediante condensación de carbodiimida (Chu C. et al Infect. Immunity, (1983) 245; 256).

5 En ejemplos particulares, la toxina diftérica o fragmento de mutante de la misma (por ejemplo CRM197) se conjuga con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 antígenos adicionales de la composición farmacéutica. En una realización, se conjuga con componente(s) de polisacáridos, por ejemplo polisacáridos bacterianos que incluyen los enumerados anteriormente.

10 Una composición farmacéutica o inmunógena puede comprender además componentes adicionales de proteínas. Se formula opcionalmente con antígenos que proporcionan protección contra una o más de infecciones por tétanos y *Bordetella pertussis*. El componente de pertussis puede ser B. pertussis (Pw) de células completas inactivadas o pertussis acelular (Pa) que contiene al menos un antígeno (preferiblemente dos o los tres) de PT, FHA y pertactina de 69 kDa. Algunas otras formulaciones de pertussis acelular contienen aglutinógenos como Fim 2 y Fim 3 y estas vacunas se consideran también para su uso en la invención. Típicamente, el antígeno que proporciona protección contra tétanos es toxoide tetánico que es toxinas inactivadas químicamente (por ejemplo, después de tratamiento con formaldehído) o inactivadas mediante la introducción de una o más mutaciones puntuales.

15 Una composición farmacéutica o inmunógena comprende opcionalmente antígenos de proteínas de neumococos, por ejemplo aquellas proteínas de neumococos que están expuestas en la superficie externa del neumococo (que pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario de un huésped durante al menos parte del ciclo vital del neumococo), o son proteínas que son secretadas o liberadas por el neumococo. Por ejemplo, la proteína puede ser una toxina, adhesina, transductor de señales de 2 componentes o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o fragmentos de la misma. Los ejemplos de dichas proteínas incluyen, aunque no se limitan a: neumolisina (preferiblemente desintoxicada mediante tratamiento químico o mutación) [Mitchell et al. Nucleic Acids Res. 11 de julio de 1990; 18(13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 y 2", Mitchell et al. Biochim Biophys Acta 23 de enero de 1989; 1007(1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties, documento WO-96/05859 (A. Cyanamid), documento WO 90/06951 (Paton et al), documento WO-99/03884 (NAVA)]; PspA y variantes de delección transmembrana de la misma (documento US 5804193 - Briles et al.); PspC y variantes de delección transmembrana de la misma (documento WO-97/09994 - Briles et al); PsaA y variantes de delección transmembrana de la misma (Berry & Paton, Infect Immun diciembre de 1996; 64(12): 5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); proteínas de unión a colinas de neumococos y variantes de delección transmembrana de las mismas; CbpA y variantes de delección transmembrana de la misma (documentos WO-97141151; WO-99/51266); Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Infect. Immun. 1996 64: 3544); HSP70 (documento WO-96/40928); PcpA (Sanchez-Beato et al. FEMS Microbiol Lett 1998, 164: 207-14); proteína tipo M (documento EP-0837130) y adhesina 18627 (documento EP-0834568). Antígenos de proteínas de neumococos adicionales para su inclusión en la composición inmunógena son los descritos en los documentos WO-98/18931, WO-98/18930 y PCT/US99/30390.

40 Los ejemplos de proteínas de Neisseria que se formularán con una composición inmunógena incluyen TbpA (documentos WO93/0686, EP586266; WO92/03467; US5912336), TbpB (documentos WO93/06861; EP586266), Hsf (documento WO99/31132), NspA (documento WO96/29412) Hap (documento PCT/EP99/02766), PorA, PorB, OMP85 (también conocido como D15) (documento WO00/23595), PilQ (documento PCT/EP99/03603), PldA (documento PCT/EP99/06718), FrpB (documento WO96/31618 véase SEC ID N° 38), FrpA o FrpC o una parte conservada en común para ambos, de al menos 30, 50, 100, 500, 750 aminoácidos (documento WO92/01460), LbpA y/o LbpB (documento PCT/EP98/05117; Schryvers et al Med. Microbiol. 1999 32: 1117), FhaB (documento WO98/02547 SEC ID N° 38), HasR (documento PCT/EP99/05989), lipo02 (documento PCT/EP99/08315), MltA (documento WO99/57280) y ctrA (documento PCT/EP00/00135). Las proteínas de Neisseria se añaden opcionalmente en forma de proteínas purificadas o como parte de una preparación de membrana externa.

Una composición farmacéutica o inmunógena puede comprender uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra *Haemophilus influenzae* no tipificable, VRS y/o uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra el virus de la gripe.

50 Los ejemplos de antígenos de proteínas de *H. influenzae* no tipificable incluyen proteína Fimbrina (documento US-5766608) y fusiones que comprenden péptidos de la misma (por ejemplo, Fusión LB1) (documento US 5843464 - Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, proteína D, TbpA, TbpB, Hia, Hmw1, Hmw2, Hap y D15.

55 Los ejemplos de antígenos de virus de la gripe incluyen virus enteros, vivos o inactivados, virus de la gripe divididos, cultivados en huevos o células MDCK, o células Vero o virosomas de la gripe enteros (según describe R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como HA, NP, NA o proteínas M, o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de antígenos de VRS (Virus Respiratorio Sincitial) incluyen la glucoproteína F, la glucoproteína G, la proteína HN, la proteína M o derivados de las mismas.

Debe observarse que las composiciones antigénicas de la invención pueden comprender uno o más polisacáridos

capsulares de una sola especie de bacterias. Las composiciones antigénicas también pueden comprender polisacáridos capsulares obtenidos de una o más especies de bacterias.

Opcionalmente, una composición inmunógena o vacuna puede contener una cantidad de un adyuvante suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria al inmunógeno. Los adyuvantes adecuados incluyen, aunque no se limitan a, sales de aluminio, mezclas de escualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de paredes celulares de micobacteria, lípido A monofosforílico, derivados de ácido micólico, tensioactivos de copolímeros de bloque no iónicos, Quil A, subunidad de toxina B del cólera, polifosfaceno y derivados, y complejos inmunoestimulantes (ISCOM) como los descritos por Takahashi et al., (1990) Nature 344: 873-875. Para uso veterinario y para la producción de anticuerpos en animales, pueden usarse componentes mitógenos de adyuvante de Freund.

Como con todas las composiciones inmunógenas o vacunas, las cantidades inmunológicamente eficaces de los inmunógenos deben determinarse empíricamente. Los factores que deben considerarse incluyen la inmunogenicidad, forme o no el inmunógeno complejos con o se una covalentemente a un adyuvante o proteína portadora u otro vehículo, vía de administraciones y el número de dosis de inmunización a administrar. Dichos factores son conocidos en la técnica de las vacunas y se sitúan bien dentro de la técnica de los inmunólogos realizar dichas determinaciones sin experimentación innecesaria.

El agente activo puede estar presente en concentraciones variables en la composición farmacéutica o vacuna de la invención. Típicamente, la concentración mínima de la sustancia es una cantidad necesaria para lograr su uso pretendido, mientras que la concentración máxima es la cantidad máxima que permanecerá en solución o suspendida de forma homogénea dentro de la mezcla inicial. Por ejemplo, la cantidad mínima de un agente terapéutico es preferiblemente una que proporcionará una dosis única terapéuticamente eficaz. Para sustancias bioactivas, la concentración mínima es una cantidad necesaria para bioactividad después de la reconstitución y la concentración máxima está en el punto en el que no puede mantenerse una suspensión homogénea. En el caso de unidades de dosis única, la cantidad es la de una única aplicación terapéutica. Generalmente, se espera que cada dosis comprenderá de 1-100 µg de antígeno de proteína, preferiblemente de 5-50 µg y con de la forma más preferible de 5-25 µg. Las dosis preferidas de polisacáridos bacterianos son de 10-20 µg, de 10-5 µg, de 5-2,5 µg o de 2,5-1 µg. La cantidad preferida de la sustancia varía de una sustancia a otra, pero puede ser determinada fácilmente por un especialista en la técnica.

Las preparaciones de vacunas de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un mamífero (por ejemplo, un paciente humano) susceptible de infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de una vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir inyección por las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración mucosal a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como una única dosis, los componentes de la misma también pueden coadministrarse conjuntamente al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, si están presentes polisacáridos en una vacuna, estos podrían administrarse por separado al mismo tiempo o de 1-2 semanas después de la administración de la combinación de proteínas bacterianas para coordinación óptima de las respuestas inmunitarias unas con respecto a las otras). Además de una sola vía de administración, pueden usarse 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, los antígenos virales pueden administrarse ID (por vía intradérmica), mientras que las proteínas bacterianas pueden administrarse IM (por vía intramuscular) o IN (por vía intranasal). Si están presentes polisacáridos, pueden administrarse IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden administrarse IN (o ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse IM para dosis iniciales e IN para dosis de recuerdo.

La preparación de vacunas se describe en general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (ed. Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación en liposomas se describe en Fullerton, Patente de Estados Unidos N° 4.235.877.

La invención se ilustra en los ejemplos adjuntos. Los ejemplos a continuación se realizan usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y rutinarias para los especialistas en la técnica, excepto se describen en detalle de otro modo. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medición de KLa

Para medir el KLa de una etapa de fermentación, se llenó el fermentador con el volumen deseado de agua y se aplicaron los parámetros de fermentación (por ejemplo temperatura, presión, agitación y aireación) y se dejó que el sistema alcanzara un estado estacionario. La sonda de pO₂ se calibró al 100%.

Se cambió rápidamente la aireación a gas nitrógeno, mientras se mantenía el mismo caudal. La pO₂ se siguió hasta que la pO₂ cayó a menos del 5%. Cuando se alcanzó este punto, se cambió la aireación rápidamente a aire mientras se mantenía el mismo caudal. Se siguió el nivel de pO₂ y se registró en varios puntos temporales como un porcentaje del nivel al 100% del estado estacionario original.

Se calculó el KLa representando gráficamente el log (100-pO2%) frente al tiempo. El coeficiente angular de la parte lineal del gráfico corresponde a -KLa. Típicamente, sólo se consideran los datos entre el 20% y el 80% de la pO2.

Resultados

En la Tabla 1 a continuación se muestran las lecturas de la pO2 en diversos puntos temporales.

5

Tabla 1

| Tiempo (segundos) | Tiempo (horas) | pO2 (%) | ln(100-pO2) |
|-------------------|----------------|---------|-------------|
| 200 | 0,056 | 20 | 4,382026635 |
| 210 | 0,058 | 21,9 | 4,357990057 |
| 220 | 0,061 | 23 | 4,343805422 |
| 230 | 0,064 | 25 | 4,317488114 |
| 240 | 0,067 | 27 | 4,290459441 |
| 250 | 0,069 | 29 | 4,262679877 |
| 260 | 0,072 | 32 | 4,219507705 |

Los resultados se representaron gráficamente como se muestra en la figura 1 y el KLa se determinó a partir del coeficiente angular de la línea en la figura 1B.

Ejemplo 2: Fermentación de la cepa ATCC 39255 de *C. diphtheriae* a escala de 150 litros

10 La bacteria usada en la preparación de CRM197 (Material de Reacción Cruzada) es una cepa mutante de *Corynebacterium diphtheriae* obtenida mediante tratamiento con nitrosoguanidina de acuerdo con el método de A. Pappenheimer (Nature New Biol. 233: 8-11, 1971). Ésta expresa una toxina diftérica desintoxicada (aa 52: mutación de glicina a ácido glutámico). Se obtuvo a partir de la ATCC en la que tiene la referencia 39255. El esquema general del procedimiento de fermentación se muestra en la figura 2.

15 Se retiró una siembra de trabajo que contenía $1,1 \times 10^{10}$ ufc/m del congelador (-70°C) y se descongeló a temperatura ambiente. Inmediatamente después de la descongelación, se centrifugó en vórtice el vial y se recogieron 250 µl de la siembra con una jeringa de 1 ml con aguja.

20 Este volumen se inyectó en 100 ml de solución salina estéril (0,9%). Se agitó el matraz. Se tomaron dos ml de la suspensión con una jeringa de 2 ml con aguja y se usaron para inocular un erlenmeyer de 3 l que contenía 500 ml del medio descrito en el documento US4.925.792. Se incubó el matraz a $34,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ a velocidad de agitación de 250 rpm hasta que la densidad óptica (650 nm) alcanzó de 4,0 a 6,0 (después de 16 a 19 h de incubación).

Se esterilizó un fermentador de 150 litros y se transfirieron asépticamente 100 l de medio de cultivo al fermentador. Se llenó el frasco de ácido con 500 ml de H₃PO₄ al 25% (V/V); el pH del medio era inicialmente de aproximadamente 7,4 y no se ajustó.

25 Se preparó el fermentador un día antes de la inoculación y se mantuvo en condiciones de espera de 34,5°C de temperatura, 0,5 bares de presión, flujo de aire de 23 N l/min en el espacio superior y velocidad de agitación de 50 rpm durante 16-20 h, hasta la inoculación.

30 Antes de la inoculación, se ajustó el fermentador a las condiciones de cultivo de 34,5°C de temperatura, 0,5 bares de presión, flujo de aire de 23 N l/min insuflado en el medio y velocidad de agitación de 240 rpm. Una agitación de 240 rpm da una velocidad de la punta de 1,76 m/s y un tiempo teórico de mezclado de 3,9 segundos. El oxígeno disuelto no se regula, sólo se monitoriza, se activó el sistema de control de espuma y se dejó que el pH alcanzara 7,8 y posteriormente se mantuvo mediante adición de H₃PO₄. Antes de inoculación, se ajustó la sonda de pO2 al 100%.

35 La velocidad de agitación se ajustó a 240 rpm, correspondiente a una velocidad periférica de 1,76 m/s. La velocidad de agitación de 240 rpm combinada con una tasa de aireación de 23-Umin dio como resultado un KLa (20-80%, agua a 30°C, 0,5 bares) estimado a 42 h-1 (véase la figura 6).

Se inoculó el fermentador a través del orificio de entrada del inóculo con 400 ml del cultivo de siembra descrito anteriormente.

40 La fermentación continuó hasta que se cumplieron las dos condiciones siguientes. Habían transcurrido 20 horas de fermentación y el nivel de oxígeno disuelto había aumentado al 10%. La duración de fermentación total estaba generalmente entre 22 y 28 h.

Al final de la fermentación, se cambió la temperatura a un ajuste de 20°C, se desactivó la regulación del pH, se cambió el flujo de aire en el espacio superior para limitar la formación de espuma, se desactivó el sistema de control de espuma, y los demás parámetros no se cambiaron.

5 Se conectó el sistema de microfiltración al fermentador y cuando la temperatura de la suspensión alcanzaba 21°C, comenzó la microfiltración. La microfiltración se realizó en dos fases: una concentración y una diafiltración. Durante la fase de concentración, los parámetros fueron: presión de entrada: 0,6 bares, presión de salida: -0,1 bares, flujo de permeado: mantenido constante a 2 l/minuto usando una bomba peristáltica calibrada (la presión del permeado era de aproximadamente 0,3 bares). Se concentró la suspensión hasta que ocurrió primero uno de los siguientes sucesos. La presión de entrada alcanzaba 0,9 bares o bien se recuperaban 75 litros de permeado.

10 Durante la fase de diafiltración, se usaron los siguientes parámetros: la presión de entrada se mantuvo en la presión alcanzada al final de la etapa de concentración (0,9 bares máximo); se añadió agua a 2 litros/minuto; el agua total añadida era de 3 volúmenes del retenido.

15 Se filtró el retenido en una membrana de 0,22 µm y se almacenó a +4°C. Se comprobó la estabilidad del CRM 197 en dicha suspensión después de hasta 4 días de almacenamiento a +4°C o a temperatura ambiente (+20°C < TA < 23°C). No se observó degradación ni diferencias mediante cuantificación por ELISA o en SDS-page. Se realizó un ensayo para confirmación de ausencia de crecimiento en agar BAB incubado a 36°C.

Resultados

20 Se realizaron dos fermentaciones a escala de 150 l usando el protocolo de fermentación descrito anteriormente (CDT 199 y CDT 206). Las condiciones de precultivo y cultivo se muestran en las Tablas 2 y 3 y los rendimientos de CRM197 se muestran en la Tabla 4. La figura 3 muestra un gráfico de la cinética de crecimiento típica de un precultivo. Cuando la D.O. (650 nm) estaba entre 4,0 y 6,0, el cultivo estaba claramente en una fase exponencial de crecimiento y el pH cambiaba sólo ligeramente.

Tabla 2 Condiciones de precultivos

| Nº de cultivo | Duración del precultivo (H:min) | D.O. 650 del precultivo | pH final |
|---------------|---------------------------------|-------------------------|----------|
| CDT199 | 16:44 | 5,88 | 7,30 |
| CDT206 | 17:53 | 4,03 | 7,25 |

25

Tabla 3 Condiciones de cultivos

| Nº de cultivo | Duración de la fermentación (h:min) | H3PO4 al 25% usado (g) | D.O. 650 final | Cantidad total de antiespumante necesaria (g) | Estimación de UFC (bact/ml) |
|---------------|-------------------------------------|------------------------|----------------|---|-----------------------------|
| CDT199 | 24:45 | 2 | 17,2 | 102 | 4,9 E9 |
| CDT206 | 24:31 | 2 | 13,9 | 119 | No se realizó |

Tabla 4 Estimación de CRM 197

| Nº de cultivo | Densito. En SDS-page (mg/l) | Elisa (mg/l) |
|---------------|-----------------------------|--------------|
| CDT199 | 89/106 | 138 |
| CDT206 | 92/83 | 116 |

Durante la fermentación, se observaron diferentes fases.

30 La primera fase se caracterizaba por una disminución del oxígeno disuelto hasta que se alcanzaba el 0% (duración de aproximadamente 6 a 7 h). Durante esta fase, el pH permanece estable o disminuye ligeramente (aproximadamente 0,1 unidades de pH).

35 Durante la segunda fase, el pH aumentaba y alcanzaba un periodo de estabilidad a aproximadamente pH 7,8. En este nivel, se activó la regulación del pH, sin embargo a menudo no hubo que añadir ningún ácido en estas condiciones de fermentación. Durante este periodo de estabilidad de pH, se observó un aumento del nivel de oxígeno disuelto por encima del 0% seguido por una caída al 0%.

La tercera fase se caracterizaba por una disminución del pH a aproximadamente 7,4.

Finalmente, se observó un aumento de pO₂ entre 22 y 24 h de fermentación. Ésta es la señal para la recogida.

Se analizaron los gases de escape del fermentador mediante un espectrómetro de masas. Se observó un perfil típico de la producción de CO₂.

- 5 Las dos fermentaciones presentadas se prolongaron después de la señal de recogida para estimar la cinética de producción de CRM 197. Se observó que el nivel de CRM 197 no aumenta después de que se alcanzara la señal de recogida pero había un aumento en la producción de espuma. Para limitar el consumo de antiespumante, es preferible detener la fermentación en la señal de recogida. Sin embargo, el CRM 197 no parece afectado por una formación de espuma excesiva y no se producía degradación.

10 Microfiltración

Se muestran datos para la microfiltración de CDT206.

Se recogieron 74,3 l de permeado cuando la presión de entrada alcanzaba los 0,9 bares. La presión de salida estaba entre 0,15 y 0,10 bares durante toda la etapa de concentración. La presión del permeado era de 0,3 a 0,4 bares durante toda la etapa de concentración y la etapa de concentración duraba 36 minutos.

- 15 Para la fase de diafiltración, se añadieron progresivamente 75 l de agua (2 Umin) mientras que se extrajo el permeado con el mismo caudal. La presión de entrada era de 0,9 bares al comienzo y caía a 0,7 bares al final de la diafiltración. La presión de salida era estable a 0,1 bares. La duración de la etapa de diafiltración era de 39 min.

Cuantificación de CRM197

- 20 El nivel de expresión de CRM197 en condiciones de baja aireación era generalmente de 2 a 4 veces superior al conseguido en condiciones de mayor aireación cuando la pO₂ se mantenía en el 5% o superior durante toda la fermentación.

SDS-page con tinción para sobrenadantes de cultivo

- 25 Se aplicaron geles de SDS-PAGE (figura 4) de los sobrenadantes del cultivo en condición de reducción, de modo que era posible detectar posibles bandas de degradación (después del corte, pueden detectarse 2 subunidades de 35 y 23 kD, respectivamente). Posteriormente se sometieron a tinción con azul de Coomassie.

Resultados

- 30 En la figura 4A se muestran los geles teñidos con coomassie de muestras de las dos fermentaciones (CDT 199) y 4B (CDT 206). El CRM 197 aparecía en el peso molecular esperado (PM teórico: 58,4 kD). El CRM 197 no se degradaba ya que no se observaba ningún cambio en el patrón en las muestras tomadas después de la señal de fin de fermentación (figura 4A, pistas 9 y 10). La cantidad de CRM 197 no resultaba afectada por la microfiltración y la filtración final a 0,22 µM ya que las pistas 9 y 11 de la figura 4A muestran cantidades equivalentes de CRM197.

La temperatura puede tener un efecto negativo sobre la estabilidad de CRM (figura 4B pista 12). Esta muestra se tomó mientras la válvula de muestra estaba caliente y se redujo la cantidad de CRM197 presente en esta muestra.

Ejemplo 3: Fermentación de la cepa ATCC 39255 de *C. diphtheriae* a escala de 20 litros

- 35 Se usó un método similar al descrito en el ejemplo 2 para fermentar *C. diphtheriae*, excepto que se usó un fermentador de 20 litros. Se agitó el cultivo a 300 rpm y se ajustó el flujo de aire a 3 litros/minuto. No se requirió adición de ácido o base durante la fermentación ya que el pH se mantuvo aproximadamente neutro durante toda la fermentación.

- 40 El cultivo creció hasta una DO final (650 nm) de 18,3. Se descubrió que el rendimiento de CRM197 fue de 103 mg/litro según lo evaluado mediante densitometría en un gel teñido.

Ejemplo 4: Fermentación de la cepa ATCC 39255 de *C. diphtheriae* a diferentes escalas

- 45 El procedimiento de fermentación de cultivo de *C. diphtheriae* en condiciones de KLa constante puede adaptarse para su uso en fermentadores de otros tamaños y diferentes diseños. Se consiguieron buenos rendimientos de producción de CRM197 siguiendo las condiciones de tamaño del fermentador, flujo de aire y velocidad de agitación indicadas en la Tabla 5. Las tres fermentaciones de escala de 150 l se efectuaron en fermentadores de diferente diseño.

Tabla 5

| Escala (l) | Flujo de aire (l/min) | Velocidad de agitación (rpm) | KLa (h-1) |
|------------|-----------------------|------------------------------|-----------|
| 20 | 3 | 300 | 22-28 |
| 150 | 23 | 240 | ~42 |
| 150 | 23 | 185 | ~50 |
| 150 | 17 | 200 | ~40 |

5 Como se muestra en la tabla 5, el KLa era más importante que la elección específica de las condiciones de flujo de aire y velocidad de agitación. De este modo, un flujo de aire menor podría compensarse con una velocidad de agitación mayor para producir un KLa similar y seguir consiguiéndose los buenos rendimientos de CRM197. La velocidad de agitación debe ser suficiente para producir una suspensión homogénea y la aireación se limita para mantener una pO₂ baja. N.B. Se usaron diferentes fermentadores para las fermentaciones de 20 litros. Las diferentes geometrías de los diferentes fermentadores condujeron al intervalo de valores de KLa mostrado en la tabla 5.

10 Sin embargo, diferentes condiciones de KLa fueron óptimas para diferentes escalas de fermentación. De ahí que para la fermentación en un fermentador de 20 litros, fuera óptimo un KLa menor de 22 a 28 h-1.

Las condiciones óptimas de KLa son las que permiten aireación limitada de manera que la pO₂ dentro del cultivo descienda a niveles bajos. Un especialista en la técnica debe ser capaz fácilmente de determinar dichas condiciones para un tamaño y una geometría concretos del fermentador.

15 **Ejemplo 5: Efecto de la concentración de hierro sobre el rendimiento de las fermentaciones a diferentes pO₂**

20 Se realizaron una serie de fermentaciones de la cepa ATCC 39255 de *C. diphtheriae* a escala de 20 litros siguiendo el método expuesto en el Ejemplo 3 de manera que la pO₂ fue baja durante la mayoría de la fermentación o a un ajuste constante de la pO₂ al 5%. La cantidad de Fe³⁺ presente se modificó entre ausencia de adición de Fe³⁺, adición de 250 ppb de Fe³⁺, adición de 500 ppb de Fe³⁺ y adición de 500 ppb de Fe²⁺. El rendimiento de CRM197 al final de la fermentación se midió por densitometría de un gel de SDS-PAGE. Este método tiende a dar resultados aproximadamente un 20% inferiores a los obtenidos mediante ELISA.

Resultados

Tabla 6

| Condiciones de fermentación | Rendimiento de CRM197 (mg/litro) |
|---|----------------------------------|
| Medio con pO ₂ al 5% sin adición de Fe ³⁺ | 38 |
| Medio con pO ₂ al 5% con 250 ppb de Fe ³⁺ añadidas | 14 |
| Medio con pO ₂ al 5% con 500 ppb de Fe ³⁺ añadidas | 18 |
| | |
| Medio con pO ₂ al 5% con 500 ppb de Fe ²⁺ añadidas | 13 |
| pO ₂ baja, KLa constante, medio sin adición de Fe ³⁺ | 100 |
| pO ₂ baja, KLa constante, medio con adición de 250 ppb de Fe ³⁺ | 88 |
| pO ₂ baja, KLa constante, medio con adición de 500 ppb de Fe ³⁺ | 97 |

25 Como se muestra en la tabla 6, cuando se fermenta *C. diphtheriae* a pO₂ al 5%, la adición de hierro conduce a una reducción del rendimiento. Sin embargo, cuando se reduce el nivel de pO₂ y la fermentación se realiza en las condiciones de pO₂ baja a KLa constante, como se describe en el ejemplo 3, se consiguieron rendimientos más altos y en el rendimiento no influía la adición de Fe³⁺.

Ejemplo 6: Efecto de la concentración de hierro sobre el rendimiento de TD o CRM197 en condiciones de baja aireación

5 El intervalo de concentración de hierro que no afecta a la expresión de CRM197 se determinó en microplacas. Las microplacas simulan las condiciones de aireación limitada que existen en el procedimiento de fermentación de la invención.

El cultivo en microplacas se realizó en el mismo medio que se usó en las fermentaciones descritas anteriormente (en un medio similar a medio CY). Se añadió Fe³⁺ a partir de una solución madre de FeCl₃.6H₂O a 1 g/l de ión Fe³⁺.

Los pocillos de las placas de microvaloración se llenaron con el medio y se inocularon a 8 E5 bact/ml.

10 Las placas de microvaloración se incubaron a 34,5°C en agitación de 250 rpm durante 46 h en el caso de *Corynebacterium diphtheriae* que expresa CRM197 y *Corynebacterium diphtheriae* que expresa toxina diftérica.

Las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm.

15 La expresión se midió mediante un método de densitometría en SDS-page (XT Criterion 4-12% bis tris de BioRad) teñido con azul de Coomassie (tinción de azul Gelcode de Pierce). La referencia usada para la cuantificación fue el mutante CRM de toxina diftérica de List Biological Laboratories INC, introducido a diferentes concentraciones en el gel.

Resultados

20 La Tabla 7 muestra la expresión de CRM197 a diferentes concentraciones de hierro para *C. diphtheriae* cultivada en condiciones de aireación limitada en pocillos de microvaloración. La expresión de CRM197 fue escasamente sensible a represión por Fe³⁺ y no se vio afectada significativamente por la adición de 1 ppm o 2 ppm de Fe³⁺. Sólo a 3 ppm se produjo una caída significativa en la expresión de CRM197. Incluso a este nivel de Fe³⁺, la expresión de CRM197 seguía siendo del 79% de la conseguida sin adición de Fe³⁺.

Tabla 7 Corynebacterium diphtheriae que expresa CRM197

| Fe ³⁺ añadido (ppm) | Densidad óptica 46 h | pH | CRM (%) |
|---|----------------------|------|---------|
| 0 | 18,1 | 7,66 | 100 |
| 200 ppb | 17,9 | 7,72 | 96 |
| 300 ppb | 16,9 | 7,77 | 97 |
| 400 ppb | 16,9 | 7,8 | 106 |
| 500 ppb | 17,2 | 7,83 | 109 |
| 600 ppb | 17,7 | 7,81 | 112 |
| 700 ppb | 17,2 | 7,77 | 109 |
| 800 ppb | 17,2 | 7,77 | 103 |
| 900 ppb | 16,5 | 7,79 | 101 |
| 1 ppm | 16,9 | 7,75 | 96 |
| 2 ppm | 17 | 7,79 | 88 |
| 3 ppm | 16,9 | 7,83 | 79 |
| Los rendimientos de CRM197 se expresan como un porcentaje del rendimiento conseguido sin adición de Fe ³⁺ extra. | | | |

25 Los resultados de la expresión de TD se muestran en la Tabla 8 para *C. diphtheriae* cultivada en pocillos de microvaloración en las condiciones indicadas. La producción de TD en condiciones de aireación limitada también era escasamente sensible a la represión por Fe³⁺. La expresión de TD aumentaba al aumentar la concentración de Fe³⁺ con una producción máxima de TD conseguida a 700 ppb. La expresión de TD empezaba a descender sólo cuando la concentración de Fe³⁺ aumentaba a 3 ppm.

Tabla 8 *Corynebacterium diphtheriae* que expresa Toxina diftérica

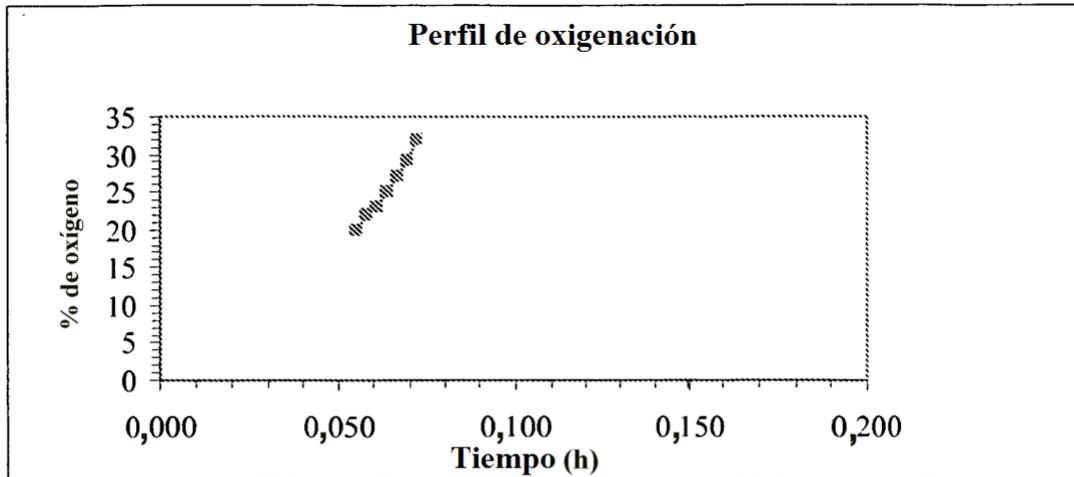
| Fe3+ añadido (ppm) | Densidad óptica 46 h | pH | DT (%) |
|--------------------|----------------------|------|--------|
| 0 | 4,16 | 8,66 | 100 |
| 200 ppb | 4,72 | 8,42 | 106 |
| 300 ppb | 4,6 | 8,47 | 107 |
| 400 ppb | 4,9 | 8,51 | 125 |
| 500 ppb | 4,22 | 8,59 | 155 |
| 600 ppb | 4,48 | 8,51 | 148 |
| 700 ppb | 4,04 | 8,63 | 167 |
| 800 ppb | 4,28 | 8,52 | 164 |
| 900 ppb | 4,58 | 8,62 | 168 |
| 1 ppm | 4,48 | 8,64 | 166 |
| 2 ppm | 4,7 | 8,68 | 176 |
| 3 ppm | 4,2 | 8,68 | 141 |

Los rendimientos de TD se expresan como un porcentaje del rendimiento conseguido sin adición de Fe3+ extra.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de fermentación que comprende una etapa de fermentación de cultivar una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* en medio en un fermentador en condiciones suficientes para mantener un cultivo homogéneo y aireación limitada, de modo que la pO₂ dentro del cultivo caiga a menos del 4% durante la mayoría de la etapa de fermentación y en el que se usa un agente antiespumante y/o una sonda de espuma o dispositivo mecánico rompedor de espuma en el fermentador.
2. El procedimiento de fermentación de la reivindicación 1, en el que la pO₂ cae hasta aproximadamente cero durante la mayoría de la etapa de fermentación.
- 10 3. El procedimiento de fermentación de la reivindicación 1 ó 2, en el que la pO₂ de menos del 4% se mantiene desde el momento en el que la *Corynebacterium diphtheriae* ha crecido a una densidad suficiente para que la pO₂ caiga a menos del 4% debido al rápido consumo de oxígeno, hasta que la etapa de fermentación esté completa.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la etapa de fermentación se realiza a un KLa constante.
- 15 5. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de fermentación se realiza a una velocidad de agitación y una tasa de aireación constantes.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la etapa de fermentación se realiza en condiciones de KLa variables.
7. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de fermentación se realiza a un KLa de 10-50 h⁻¹.
- 20 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la etapa de fermentación tiene lugar en un fermentador de 10-30 litros y a un KLa de 10-30 h⁻¹.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la etapa de fermentación tiene lugar en un fermentador de 100-250 litros a un KLa de 30-60 h⁻¹.
- 25 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la etapa de fermentación tiene lugar en un fermentador de 250-800 litros a un KLa de 60-150 h⁻¹.
11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la etapa de fermentación tiene lugar con un flujo de aire comprimido de 1-5 U_{min} y una velocidad de agitación de 200-400 rpm.
12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la etapa de fermentación tiene lugar con un flujo de aire comprimido de 15-25 U_{min} y una velocidad de agitación de 150-250 rpm.
- 30 13. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el medio es CY, SOC o un medio similar y el pH dentro del fermentador se mantiene entre 7,0 y 7,8 mediante el grado de aireación sin que se requiera la adición de un ácido o una base.
14. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* produce toxina diftérica o un mutante de la misma, en particular CRM197.
- 35 15. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* es ATCC29255.
16. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el medio contiene entre 10 y 4000 ppb de hierro.
- 40 17. Un procedimiento para fabricar una preparación de un antígeno de *C. diphtheriae* que comprende las etapas de realizar el procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 y aislar el antígeno de *C. diphtheriae* a partir del cultivo.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el antígeno de *C. diphtheriae* es toxina diftérica o un fragmento o un mutante de la misma (por ejemplo CRM197).
19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 17-18, que comprende una etapa de añadir uno o más antígeno o antígenos adicionales al antígeno de *C. diphtheriae*.
- 45 20. El procedimiento de la reivindicación 19, que comprende además una etapa de conjugar la toxina diftérica o un fragmento o un mutante de la misma con uno o más antígeno o antígenos adicionales

A



B

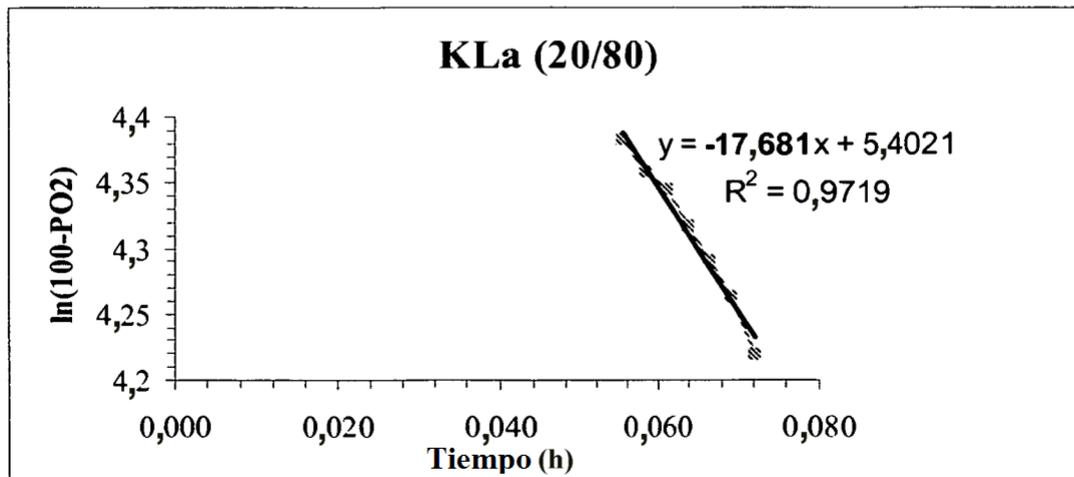


Figura 1

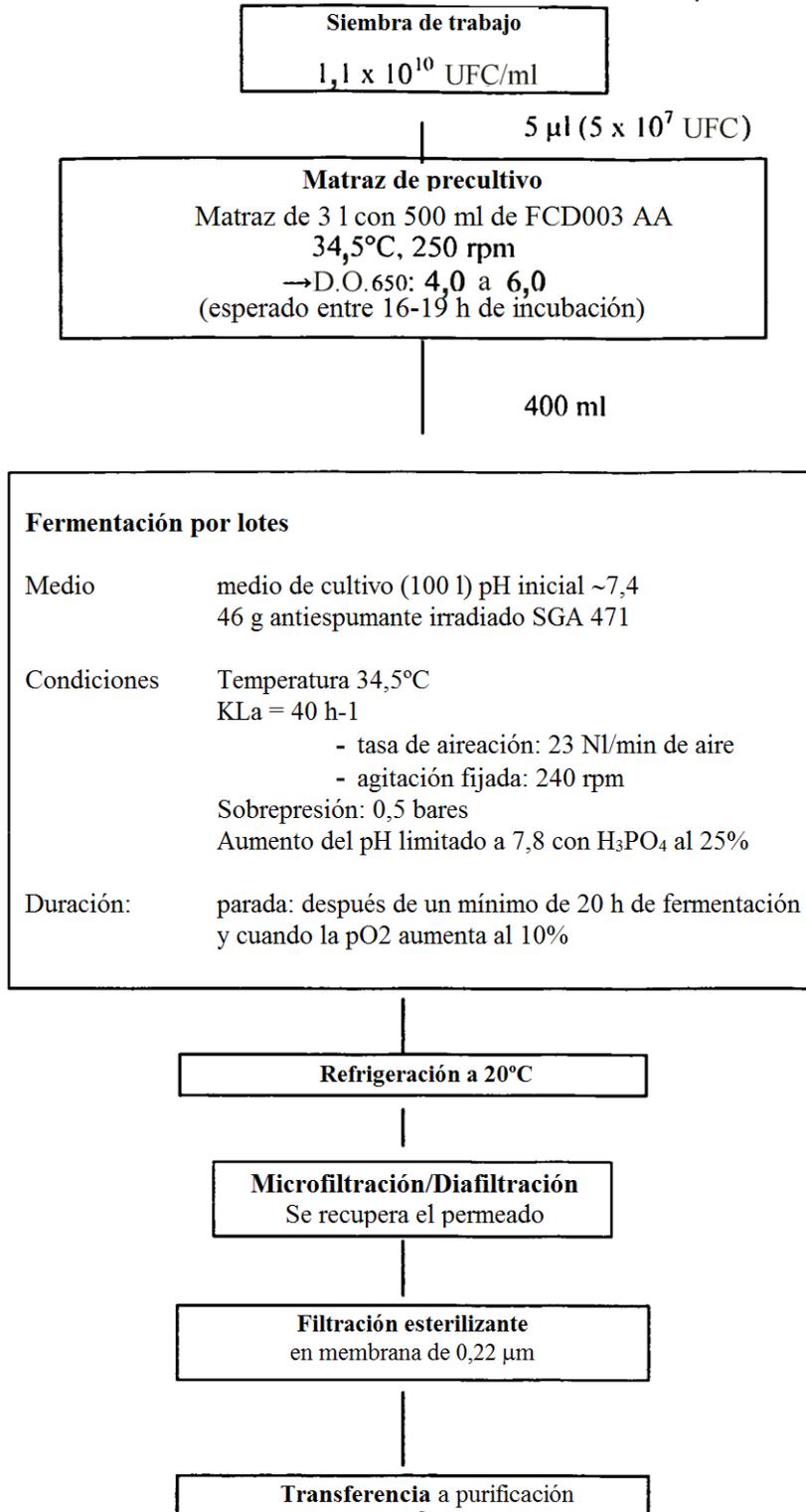


Figura 2

Figura 3

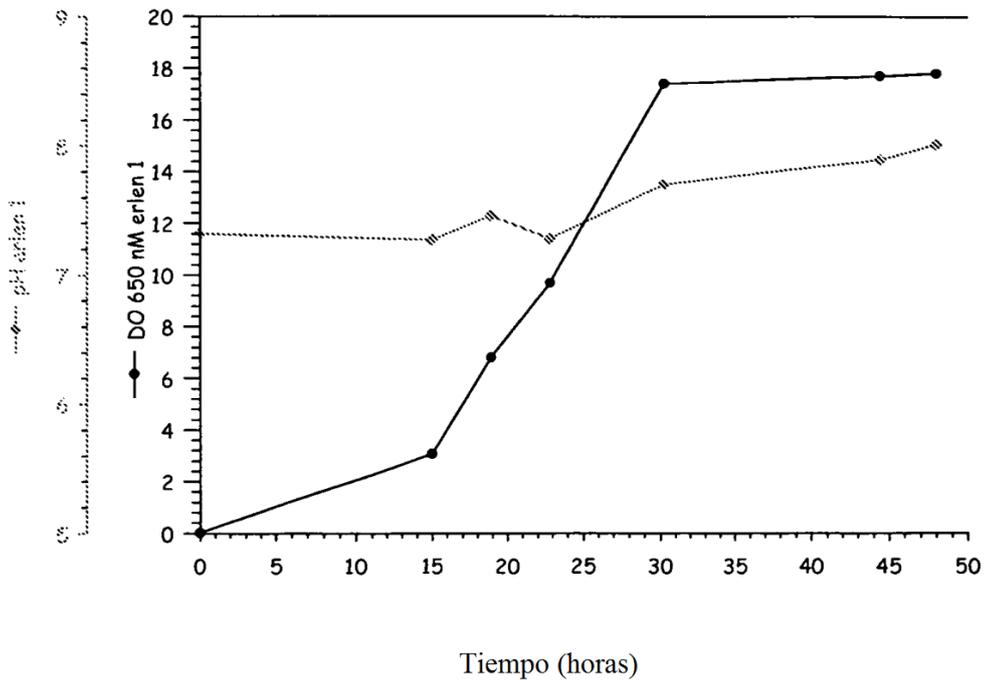


Figura 4A

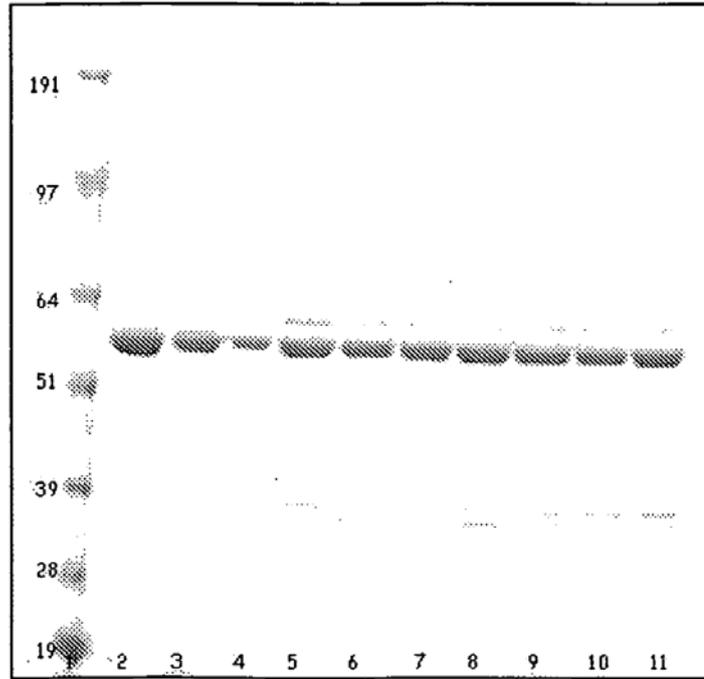


Figura 4B

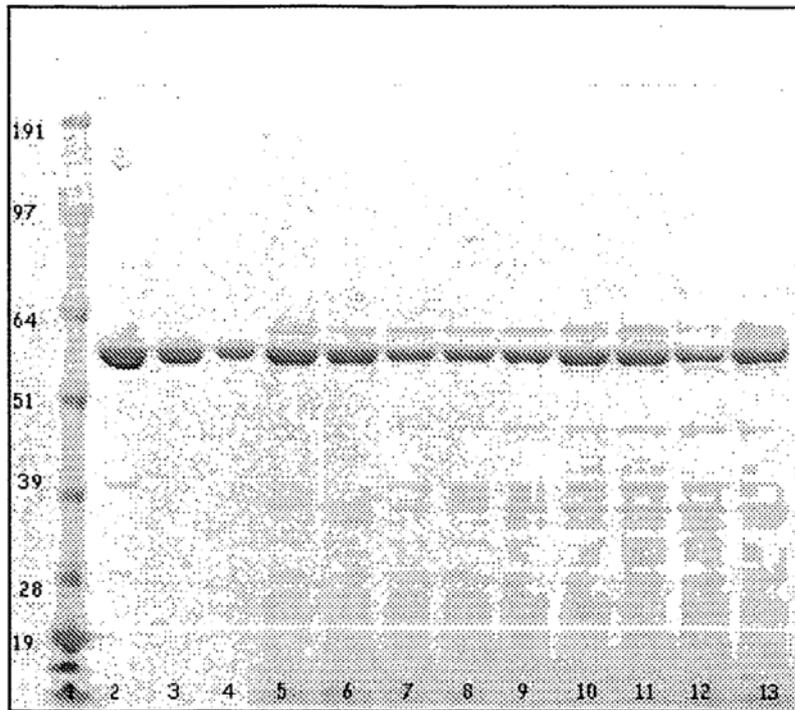


Figura 5

