

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 096**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2014 PCT/IB2014/064428**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15036953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2014 E 14766824 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 3044308**

54 Título: **Medio químicamente definido para el cultivo a escala industrial de una especie de Bordetella**

30 Prioridad:

13.09.2013 GB 201316351

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

12.12.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**DEHOTTAY, PHILIPPE MARC HELENE;
GOFFIN, PHILIPPE;
BRANCO DOS SANTOS, FILIPE y
TEUSINK, BAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 646 096 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

Medio químicamente definido para el cultivo a escala industrial de una especie de *Bordetella*

Antecedentes

5 El género *Bordetella* es el agente causante de varias enfermedades bacterianas, por ejemplo, *Bordetella pertussis* (también conocida como *Haemophilus pertussis*) es responsable de la tosferina, una enfermedad respiratoria que puede ser grave en bebés y niños pequeños. El curso clínico de la enfermedad se caracteriza por paroxismos de toses rápidas seguidos por esfuerzo inspiratorio, a menudo asociado con un sonido "chillón" característico. En casos graves, la privación de oxígeno puede dar lugar a daños cerebrales; sin embargo, la complicación más habitual es neumonía secundaria.

10 La tosferina se considera habitualmente causada por *B. pertussis*, pero ocasionalmente se aísla *B. Parapertussis* de pacientes con signos típicos y síntomas de tosferina. La infección por *B. parapertussis* es de menor frecuencia que *B. pertussis* con un 5-10 % de tosferina asociada con *B. parapertussis* (Mertsola (1985) Eur J Clin Microbiol 4; 123; Lautrop (1971) Lancet 1(7711) 1195-1198) *B. parapertussis* está asociada con síntomas clínicos leves que, combinados con su reactividad cruzada serológica con *B. pertussis*, hace que *B. parapertussis* sea difícil de diagnosticar.

15 La primera generación de vacunas contra *B. pertussis* eran vacunas de células completa, compuestas de bacterias inactivadas completas. Estas se introdujeron en muchos países en la década de 1950 y de 1960 y fueron satisfactorias en reducir la incidencia de la tosferina. Un problema con las vacunas de células completas de *B. pertussis* es el alto nivel de reactividad asociada con las mismas. Las vacunas acelulares que contienen proteínas purificadas de *B. pertussis* son menos reactivas y se han adoptado para los programas de vacunación de muchos países. Las vacunas acelulares que típicamente contienen la toxina tosferínica (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y la pertactina (PRN) bastante frecuente, se usan ampliamente y proporcionan protección eficaz contra la gravedad de la tosferina.

20 Las toxinas de *Bordetella* para su uso en dichas vacunas se generan fermentando *Bordetella* y aislando los factores de virulencia producidos, sin embargo, las especies de *Bordetella* son organismos exigentes que son difíciles de cultivar en altas concentraciones (Doern Clin. infect. dis. 2000, 30 166-173), además, es difícil expresar los factores de virulencia de *Bordetella* tales como FHA (hemaglutinina filamentosa), pertactina (PRN) y toxina tosferínica (PT) de *Bordetella pertussis* a altos niveles.

25 *Bordetella* puede cultivarse en medios químicamente definidos. Por ejemplo, Stainer y Scholte (Journal of General Microbiology (1971), 63, 211-220) divulgan un medio químicamente definido simple para la producción de *pertussis*. El cultivo en medios químicamente definidos proporciona ventajas ya que los medios no definidos pueden variar en su contenido nutritivo que da lugar a un crecimiento y expresión impredecibles.

30 Sin embargo, el medio químicamente definido puede ser caro y difícil de fabricar en grandes cantidades, además es difícil diseñar medios químicamente definidos equilibrados que mantengan altos niveles de producción de toxina. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que pueden hacerse varias modificaciones a un medio químicamente definido para una especie de *Bordetella pertussis* para formar medios simples que mantengan altos niveles de producción de factor de virulencia.

Breve resumen

35 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un medio químicamente definido para una especie de *Bordetella*, en el que el medio químicamente definido comprende una o más de las siguientes modificaciones:

- (i) el medio químicamente definido comprende menos de 0,035 mM, menos de 0,030 mM, menos de 0,020 mM o menos de 0,010 mM de sulfato;
- (ii) el medio químicamente definido comprende una fuente de cisteína seleccionada del grupo que consiste en cisteína y cistina, en el que la fuente de cisteína está a una concentración de menos de 0,50 mM, menos de 0,30 mM, menos de 0,25 mM, menos de 0,20 mM, menos de 0,15 mM, menos de 0,10 mM, menos de 0,05 mM o menos de 0,03 mM;
- (iii) el medio químicamente definido comprende una fuente inorgánica de azufre seleccionada del grupo que consiste en tiosulfato, tritronato, tetratiónato, peroxodisulfato, sulfuro y sulfito;
- (iv) el medio químicamente definido no comprende una fuente orgánica de azufre;
- 45 (v) el medio químicamente definido comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinaetanosulfónico) y PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico));
- (vi) el medio químicamente definido comprende más de 2 μ M, más de 3 μ M, más de 4 μ M, más de 5 μ M o más de 6 μ M de cobre;
- 50 (vii) el medio químicamente definido comprende más de 2 μ M, más de 5 μ M, más de 10 μ M, más de 50 μ M, más de 100 μ M o más de 400 μ M de magnesio;
- (viii) el medio químicamente definido comprende una única fuente aminoácidos;

- (ix) el medio químicamente definido no comprende una fuente de aminoácidos;
- (x) el medio químicamente definido comprende un aditivo seleccionado del grupo que consiste en zinc, cobalto, tiamina, riboflavina y pantotenato;
- (xi) el medio químicamente definido comprende un aditivo seleccionado del grupo que consiste en más de 0,4 μM de biotina, más de 50 μM de calcio, más de 15 μM de niacina y más de 25 μM de ácido ascórbico; o
- (xii) el medio químicamente definido comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en aspartato a una concentración de más de 1000 μM , glicina a una concentración de más de 1000 μM , metionina a una concentración de más de 500 μM y leucina a una concentración de más de 1500 μM .

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un medio químicamente definido para una especie de *Bordetella*, en el que el medio químicamente definido comprende al menos dos componentes y en el que los al menos dos componentes se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) carbono y fósforo a una relación de más de 100:1, más de 125:1, más de 150:1, más de 175:1 o más de 200:1 (carbono:fósforo) (mol/mol);
- b) glutamato y fósforo a una relación de más de 20:1, más de 22:1, más de 24:1 o más de 25:1 (glutamato:fósforo) (mol/mol);
- (c) carbono y magnesio a una relación de menos de 600:1, menos de 500:1, menos de 400:1 o menos de 300:1 (carbono:magnesio) (mol/mol);
- (d) glutamato y magnesio a una relación de menos de 115:1, menos de 110:1, menos de 105:1 o menos de 100:1 (glutamato:magnesio) (mol/mol);
- (e) carbono y cobre a una relación de más de 3000:1, más de 3500:1, o más de 4000:1 (carbono:cobre) (mol/mol);
- (f) glutamato y cobre a una relación de más de 170:1, más de 180:1, más de 200:1 o más de 250:1 (glutamato:cobre) (mol/mol);
- (g) carbono y hierro a una relación de más de 9500:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (carbono:hierro) (mol/mol);
- (h) glutamato y hierro a una relación de más de 1600:1, más de 1800:1, más de 2000:1 o más de 2500:1 (glutamato:hierro) (mol/mol);
- (i) carbono y glicina a una relación de menos de 500:1, menos de 400:1, menos de 300:1 o menos de 250:1 (carbono:glicina) (mol/mol);
- (j) glutamato y glicina a una relación de menos de 100:1, menos de 80:1, menos de 75:1 o menos de 60:1 (glutamato:glicina) (mol/mol);
- (k) carbono y leucina a una relación de menos de 440:1, menos de 400:1, menos de 350:1 o menos de 300:1 (carbono:leucina) (mol/mol);
- (l) glutamato y leucina a una relación de menos de 75:1, menos de 70:1, menos de 60:1 o menos de 50:1 (glutamato:leucina) (mol/mol);
- (m) carbono y metionina a una relación de menos de 1200:1, menos de 1000:1, menos de 800:1 o menos de 750:1 (carbono:metionina) (mol/mol);
- (n) glutamato y metionina a una relación de menos de 200:1, menos de 175:1, menos de 150:1 o menos de 120:1 (glutamato:metionina) (mol/mol);
- (o) carbono y calcio a una relación de más de 3750:1, más de 4000:1, más de 4500:1 o más de 5000:1 (carbono:calcio) (mol/mol);
- (p) glutamato y calcio a una relación de más de 620:1, más de 650:1, más de 675:1 o más de 750:1 (glutamato:calcio) (mol/mol);
- (q) carbono y cobalto a una relación de más de 3000:1, más de 3500:1, más de 4750:1 o más de 5000:1 (carbono:cobalto) (mol/mol);
- (r) glutamato y cobalto a una relación de más de 750:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (glutamato:cobalto) (mol/mol);
- (s) carbono y zinc a una relación de más de 3000:1, más de 3500:1, más de 4000:1 o más de 5000:1 (carbono:zinc) (mol/mol);
- (t) glutamato y zinc a una relación de más de 750:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (glutamato:zinc) (mol/mol);
- (u) carbono y equivalentes de sulfato a una relación de más de 750:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (carbono:equivalentes de sulfato) (mol/mol); y
- (v) glutamato y equivalentes de sulfato a una relación de más de 130:1, más de 150:1, más de 175:1 o más de 200:1 (glutamato: equivalentes de sulfato) (mol/mol).

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de fermentación para cultivar una especie de *Bordetella* en un medio químicamente definido (CDM), que comprende

- (a) inocular el medio químicamente definido de la invención con una especie de *Bordetella*;
- (b) mantener la especie de *Bordetella* en el medio químicamente definido durante un periodo de tiempo suficiente para permitir acumulación de biomasa.

En un cuarto aspecto de la invención se proporciona un factor de virulencia que se puede obtener por el procedimiento de fermentación de la invención.

En un quinto aspecto de la invención, se proporciona un factor de virulencia obtenido por el procedimiento de fermentación de la invención.

En un sexto aspecto de la invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende el factor de virulencia de la invención.

- 5 En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención.

En un octavo aspecto de la invención, se proporciona un uso de la composición inmunogénica de la invención o la vacuna de la invención en la prevención o tratamiento de enfermedades.

- 10 En un noveno aspecto de la invención, se proporciona un uso de una composición inmunogénica de la invención o la vacuna de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades bacterianas.

En un décimo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de prevención o tratamiento de enfermedades, que comprende administrar la composición inmunogénica de la vacuna a un paciente.

Descripción detallada

- 15 Medios químicamente definidos

Los medios químicamente definidos (CDM) a menudo se consideran beneficiosos ya que, a diferencia de los medios no químicamente definidos, los medios químicamente definidos contienen una concentración precisa de cada nutriente, reduciendo por tanto la variabilidad del medio y mejorando la calidad del producto fermentado. Sin embargo, puede ser difícil crear un medio químicamente definido óptimo equilibrado ya que es difícil predecir los nutrientes/componentes del medio necesarios para diferentes bacterias. De forma ideal, el medio químicamente definido debe estar sustancialmente equilibrado, es decir, al completarse la fermentación no deben tener un exceso de ningún componente particular del medio debido a la presencia de demasiado de ese componente del medio para que las bacterias lo metabolicen, ya que los medios equilibrados mantienen un crecimiento más eficaz y son más rentables. Se ha diseñado un medio semisintético para *Bordetella pertussis* por Goldner (J. Gen. Microbiol. (1966), 44, 439-444), sin embargo, era demasiado complicado y caro para usarse a escala industrial. Stainer Scholte intentó diseñar un medio más simple que sería más apropiado para fermentación a escala industrial, sin embargo, este no es óptimo para la producción de factores de virulencia (Journal of General Microbiology (1971), 63, 211-220). Los presentes inventores han descubierto que pueden realizarse ciertas modificaciones a este medio químicamente definido para simplificar el medio o para aumentar significativamente el rendimiento de los factores de virulencia obtenidos de *Bordetella* cultivada en dichos medios.

20
25
30

Estas modificaciones incluyen:

- (i) el medio químicamente definido comprende menos de 0,035 mM, menos de 0,030 mM, menos de 0,020 mM o menos de 0,010 mM de sulfato;
- 35 (ii) el medio químicamente definido comprende una fuente de cisteína seleccionada del grupo que consiste en cisteína y cistina, en el que la fuente de cisteína está a una concentración de menos de 0,50 mM, menos de 0,30 mM, menos de 0,25 mM, menos de 0,20 mM, menos de 0,15 mM, menos de 0,10 mM, menos de 0,05 mM o menos de 0,03 mM;
- (iii) el medio químicamente definido comprende una fuente inorgánica de azufre seleccionada del grupo que consiste en tiosulfato, tritronato, tetratronato, peroxodisulfato, sulfuro y sulfito;
- 40 (iv) el medio químicamente definido no comprende una fuente orgánica de azufre;
- (v) el medio químicamente definido comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en MOPS, MES, HEPES y PIPES;
- (vi) el medio químicamente definido comprende más de 2 mM, más de 3 mM, más de 4 mM, más de 5 mM o más de 6 mM de cobre;
- 45 (vii) el medio químicamente definido comprende más de 2 mM, más de 5 mM, más de 10 mM, más de 50 mM, más de 100 mM o más de 400 mM de magnesio;
- (viii) el medio químicamente definido comprende una única fuente de aminoácidos;
- (ix) el medio químicamente definido no comprende una fuente de aminoácidos;
- (x) el medio químicamente definido comprende un aditivo seleccionado del grupo que consiste en zinc, cobalto,
- 50 tiamina, riboflavina y pantotenato;
- (xi) el medio químicamente definido comprende un aditivo seleccionado del grupo que consiste en más de 0,4 μ M de biotina, más de 50 μ M de calcio, más de 15 μ M de niacina y más de 25 μ M de ácido ascórbico; o
- (xii) el medio químicamente definido comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en aspartato a una concentración de más de 1000 μ M, glicina a una concentración de más de 1000 μ M, metionina a una
- 55 concentración de más de 500 μ M y leucina a una concentración de más de 1500 μ M.

Por tanto, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un medio químicamente definido para una especie de *Bordetella*, en el que el medio químicamente definido comprende una o más de las modificaciones

descritas anteriormente.

Además, los intentos de formular nuevos medios químicamente definidos a menudo implican tomar un medio complejo y reemplazar el componente del medio complejo (tal como hidrolizado de casaminocaseína) con las cantidades equivalente de componentes químicamente definidos individuales. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la relación entre los componentes del medio puede variar de forma importante para asegurar que el medio químicamente definido está equilibrado y mantiene una producción de alto rendimiento de factores de virulencia.

Por tanto, en un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un medio químicamente definido para una especie de *Bordetella*, en el que el medio químicamente definido comprende al menos dos componentes y en el que los al menos dos componentes se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) carbono y fósforo a una relación de más de 100:1, más de 125:1, más de 150:1, más de 175:1 o más de 200:1 (carbono:fósforo) (mol/mol);
- b) glutamato y fósforo a una relación de más de 20:1, más de 22:1, más de 24:1 o más de 25:1 (glutamato:fósforo) (mol/mol);
- c) carbono y magnesio a una relación de menos de 600:1, menos de 500:1, menos de 400:1 o menos de 300:1 (carbono:magnesio) (mol/mol);
- d) glutamato y magnesio a una relación de menos de 115:1, menos de 110:1, menos de 105:1 o menos de 100:1 (glutamato:magnesio) (mol/mol);
- e) carbono y cobre a una relación de más de 3000:1, más de 3500:1, o más de 4000:1 (carbono:cobre) (mol/mol);
- f) glutamato y cobre a una relación de más de 170:1, más de 180:1, más de 200:1 o más de 250:1 (glutamato:cobre) (mol/mol);
- g) carbono y hierro a una relación de más de 9500:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (carbono:hierro) (mol/mol);
- h) glutamato y hierro a una relación de más de 1600:1, más de 1800:1, más de 2000:1 o más de 2500:1 (glutamato:hierro) (mol/mol);
- i) carbono y glicina a una relación de menos de 500:1, menos de 400:1, menos de 300:1 o menos de 250:1 (carbono:glicina) (mol/mol);
- j) glutamato y glicina a una relación de menos de 100:1, menos de 80:1, menos de 75:1 o menos de 60:1 (glutamato:glicina) (mol/mol);
- k) carbono y leucina a una relación de menos de 440:1, menos de 400:1, menos de 350:1 o menos de 300:1 (carbono:leucina) (mol/mol);
- l) glutamato y leucina a una relación de menos de 75:1, menos de 70:1, menos de 60:1 o menos de 50:1 (glutamato:leucina) (mol/mol);
- m) carbono y metionina a una relación de menos de 1200:1, menos de 1000:1, menos de 800:1 o menos de 750:1 (carbono:metionina) (mol/mol);
- n) glutamato y metionina a una relación de menos de 200:1, menos de 175:1, menos de 150:1 o menos de 120:1 (glutamato:metionina) (mol/mol);
- o) carbono y calcio a una relación de más de 3750:1, más de 4000:1, más de 4500:1 o más de 5000:1 (carbono:calcio) (mol/mol);
- p) glutamato y calcio a una relación de más de 620:1, más de 650:1, más de 675:1 o más de 750:1 (glutamato:calcio) (mol/mol);
- q) carbono y cobalto a una relación de más de 3000:1, más de 3500:1, más de 4750:1 o más de 5000:1 (carbono:cobalto) (mol/mol);
- r) glutamato y cobalto a una relación de más de 750:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (glutamato:cobalto) (mol/mol);
- s) carbono y zinc a una relación de más de 3000:1, más de 3500:1, más de 4000:1 o más de 5000:1 (carbono:zinc) (mol/mol);
- t) glutamato y zinc a una relación de más de 750:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (glutamato:zinc) (mol/mol);
- u) carbono y equivalentes de sulfato a una relación de más de 750:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (carbono:equivalentes de sulfato) (mol/mol); y
- v) glutamato y equivalentes de sulfato a una relación de más de 130:1, más de 150:1, más de 175:1 o más de 200:1 (glutamato: equivalentes de sulfato) (mol/mol).

La expresión "medio químicamente definido" se refiere a un medio que está sustancialmente desprovisto de material complejo tal como levaduras, casaminoácidos peptonas, triptonas, extracto de levadura. Véase, por ejemplo, Jayme y Smith, Cytotechnology 33(1-3):27-36 (2000). En particular, como se usa en el presente documento, un medio químicamente definido no incluye casaminoácidos (CAA) como fuente de aminoácidos en el medio. Como se usa en el presente documento, los casaminoácidos se refieren a una mezcla de aminoácidos obtenidos por la hidrólisis de caseína.

El CDM de la presente invención se describe tanto en términos positivos (ingrediente o ingredientes o componente o componentes que están incluidos en el medio), así como en términos negativos (ingrediente o ingredientes o

componente o componentes que se excluyen del medio).

Una "fuente" es un componente del medio que proporciona al menos un ingrediente específico al medio. Por ejemplo, la cistina es una fuente de cisteína ya que proporciona cisteína para su uso por los organismos cultivados en el medio. Como se usa en el presente documento, el propio ingrediente se considera una "fuente", por ejemplo, el sulfato es una fuente de sulfato, y la cisteína es una fuente de cisteína, etc. Una "fuente" puede proporcionar más de un ingrediente, por ejemplo, un aminoácido puede ser una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, así como una fuente de aminoácidos.

El término "medio" se refiere a una fuente de nutrientes suficiente para permitir que *Bordetella* crezca hasta densidades razonablemente elevadas (por ejemplo, hasta una biomasa de más de 1,0 g/l, más de 1,5 g/l, más de 2,0 g/l o más de 2,5 g/l de peso celular seco).

El medio químicamente definido de la invención es para cultivo a escala industrial de una especie de *Bordetella*, la expresión "cultivo a escala industrial" se refiere a cultivo en un fermentador, en una realización, el cultivo a escala industrial es cultivo en un fermentador con un volumen de trabajo entre 5 y 10 000 litros, entre 10 y 5000 litros, entre 20 y 2000 litros, entre 50 y 1000 litros, más de o igual a 5 litros, más de o igual a 10 litros, más de o igual a 15 litros, más de o igual a 20 litros, más de o igual a 25 litros, más de o igual a 50 litros, más de o igual a 100 litros, menos de o igual a 10 000 litros, menos de o igual a 5000 litros o menos de o igual a 2500 litros. En una realización adicional el "cultivo a escala industrial" es cultivo adecuado para la producción de más de 10 mg/l, más de 15 mg/l o más de 20 mg/l de toxina tosferínica.

Durante el procedimiento de fermentación, el medio químicamente definido de la invención se añade al fermentador al inicio del procedimiento, aunque opcionalmente pueden añadirse partes adicionales del medio durante el procedimiento de fermentación (por ejemplo, en fermentación semicontinua); como alternativa, puede añadirse un medio con una composición diferente posteriormente en la fermentación. Dicho medio también puede añadirse de forma continua al medio de cultivo para su uso en sistemas tales como quimiostatos o tanques de retención. Preferentemente, la fermentación es una fermentación semicontinua.

El medio químicamente definido de la invención mantiene un rendimiento de crecimiento de la especie de *Bordetella* mayor que la mantenida por el medio de Stainer Scholte (descrito en Journal of General Microbiology (1971), 63:211-220). Esto puede determinarse sembrando una cepa de *Bordetella*, inoculando un matraz o fermentador que contiene medio de Stainer Scholte con una primera muestra de la cepa de *Bordetella* e inoculando un matraz o fermentador que contiene el medio químicamente definido a ensayar con una segunda muestra de la cepa de *Bordetella* (usando el mismo volumen que el volumen seleccionado para el medio de Stainer Scholte). Debe tomarse la $DO_{650\text{ nm}}$ en múltiples puntos temporales dobles para ambas muestras, estos puntos temporales deben incluir un punto temporal que es justo después de la inoculación (mencionado como punto temporal A) y un punto temporal que es al final del cultivo (mencionado como punto temporal B). Obsérvese que se considera que ha cesado el crecimiento cuando la concentración celular entre dos puntos temporales consecutivos (separados por al menos 24 h) no ha aumentado en más de un 10 %. Si la diferencia en la $DO_{650\text{ nm}}$ entre el punto temporal B y el punto temporal A es mayor para la segunda muestra que para la primera muestra inoculada en el medio Stainer Scholte, el medio químicamente definido a ensayar mantiene un rendimiento de crecimiento de la especie de *Bordetella* mayor que el mantenido por el medio de Stainer Scholte.

El medio químicamente definido mantiene preferentemente un tiempo de generación promedio de la especie de *Bordetella* de menos de 15 h, menos de 12 h, menos de 10 h o menos de 9 h. Esto puede ensayarse usando un procedimiento similar al descrito en el párrafo [028], sin embargo, el tiempo de generación promedio se obtiene dividiendo el tiempo entre el punto temporal A y el punto temporal B, por la cantidad de generaciones entre estos dos puntos temporales. La cantidad de generaciones entre el punto temporal A y el punto temporal B se obtiene calculando la relación entre la $DO_{650\text{ nm}}$ en el segundo punto temporal a la $DO_{650\text{ nm}}$ en el primer punto temporal A convertido a Log_2 .

El medio químicamente definido mantiene preferentemente niveles mayores de producción de toxina tosferínica que los mantenidos por el medio de Stainer Scholte. Esto puede determinarse inoculando un matraz o fermentador que contiene medio de Stainer Scholte con una primera muestra de la cepa de *Bordetella pertussis* e inoculando un matraz o fermentador que contiene el medio químicamente definido a ensayar (el mismo volumen que el volumen seleccionado para el medio de Stainer Scholte) con una segunda muestra de la cepa de *Bordetella pertussis*, incubando más muestras hasta que haya cesado el crecimiento y calculando el nivel de producción de toxina tosferínica en cada muestra. Se describe un procedimiento para determinar el nivel de producción de toxina tosferínica en el ejemplo 1. Si el nivel de producción de toxina tosferínica para la segunda muestra es mayor que para la primera muestra, el medio químicamente definido mantiene niveles mayores de producción de toxina tosferínica que los mantenidos por el medio de Stainer Scholte.

En una realización preferida, el medio químicamente definido de la invención mantiene la especie de *Bordetella* para producir toxina tosferínica con un rendimiento de más de 10 mg/l o más de 15 mg/l, más preferentemente el rendimiento es de más de 20 mg/l. Que un medio químicamente definido mantenga o no la especie de *Bordetella* para producir toxina tosferínica con un cierto rendimiento puede determinarse inoculando el medio químicamente

definido con una muestra de la especie de *Bordetella* e incubando las células hasta que haya cesado el crecimiento. Al final del cultivo, puede calcularse el rendimiento de toxina tosferínica usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

5 En una realización, el medio químicamente definido es un medio sustancialmente equilibrado. Un medio sustancialmente equilibrado es un medio en que, al final de la fermentación, no hay exceso significativo de ningún nutriente particular. Que un medio químicamente definido sea un medio sustancialmente equilibrado puede ensayarse incubando la especie de *Bordetella* en el medio hasta que cese el crecimiento y examinando el sobrenadante del medio después de que haya cesado el crecimiento. Si las fuentes metabólicas (es decir, fuentes de nitrógeno, fósforo y azufre) se usan a una tasa sustancialmente similar (dentro del 10 % uno de otro) entonces el medio químicamente definido está equilibrado. En una realización preferida, las concentraciones finales de todas las fuentes metabólicas serán de aproximadamente 0 mM.

15 Generalmente, los medios químicamente definidos deben contener al menos una fuente de carbono, una fuente de fósforo, una fuente nitrógeno, una fuente azufre y un tampón. La fuente de nitrógeno puede ser orgánica o inorgánica. La fuente de nitrógeno puede ser un aminoácido o péptido, como alternativa, la fuente de nitrógeno puede ser una fuente de nitrógeno que no es un aminoácido o péptido, en dicho medio químicamente definido el medio químicamente definido no comprende un aminoácido. En una realización, la fuente de nitrógeno es inorgánica. En una realización, la fuente de nitrógeno comprende o consiste en un compuesto seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos, urea, poliaminas, amonio (tal como cloruro de amonio, sulfato de amonio o nitrato de amonio), nucleobases, nucleósidos y nucleótidos. En una realización adicional, la fuente de nitrógeno comprende o consiste en cloruro de amonio. La fuente de carbono puede comprender o consistir en un aminoácido o péptido, o puede comprender o consistir en una fuente de carbono que no es un aminoácido o péptido; en dicho medio químicamente definido el medio químicamente definido no comprende un aminoácido. Como se usa en el presente documento, la expresión "no comprende un aminoácido" significa que el medio "no comprende" péptidos o proteínas, ya que los péptidos o proteínas son fuentes de aminoácidos. En una realización, la fuente de carbono comprende o consiste en un compuesto seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, polioles (alcoholes de azúcar), ácidos orgánicos y aminoácidos. En una realización adicional, la fuente de carbono comprende o consiste en un compuesto seleccionado del grupo que consiste en glucosa, fructosa, sorbosa, galactosamina, manosa, sacarosa, ramnosa, sorbitol, manitol, citrato, lactato, acetato, piruvato, fumarato, succinato, prolina y glutamato. En una realización adicional, la fuente de carbono comprende glutamato o prolina. En una realización adicional, la fuente de carbono comprende o consiste en un ácido orgánico seleccionado del grupo que consiste en citrato, lactato, acetato, piruvato, fumarato y succinato.

El medio químicamente definido de la invención es para cultivo a escala industrial de una especie de *Bordetella*. En una realización, el medio comprende la especie de *Bordetella*. En una realización, la especie de *Bordetella* es una especie seleccionada del grupo que consiste en *Bordetella petrii*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella trematum*, *Bordetella holmesii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella pertussis* (conocida de otro modo como *Haemophilus pertussis*). Preferentemente, la especie de *Bordetella* se selecciona del grupo que consiste en *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella pertussis*. Más preferentemente, la especie de *Bordetella* es *Bordetella pertussis*.

FUENTES DE AZUFRE

40 En una primera realización, el medio químicamente definido comprende menos de 0,035 mM, menos de 0,030 mM, menos de 0,020 mM, menos de 0,010 mM de sulfato, menos de 0,005 mM, menos de 0,0001 mM, menos de 0,00005 mM, menos de 0,00001 mM, entre 0,035 mM y 0 mM, entre 0,005 mM y 0 mM o entre 0,00001 mM y 0 mM. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la eliminación de sulfato del medio químicamente definido aumenta el rendimiento de los factores de virulencia tales como PT significativamente cuando se usan en un medio químicamente definido para *Bordetella*. El documento WO 017846 y Lacey (1960; J. Hyg. 58:57-93) divulgan la idea de que el sulfato puede ser un inhibidor de la producción del factor de virulencia; sin embargo, los medios de bajo contenido de sulfato divulgados en el documento WO 017846 contenían 0,001 g/l de FeSO₄ añadido. Por tanto, está claro que los inventores del documento WO 017846 consideraron que la presencia de al menos una cierta cantidad de FeSO₄ era necesaria para producir un medio químicamente definido para permitir el crecimiento de *B. pertussis*. Es destacable que, para obtener altos niveles de factores de virulencia, el medio debe mantener tanto una producción de factores de virulencia como el crecimiento de *Bordetella* hasta una biomasa adecuada, de modo que, aunque se sabía que el sulfato inhibe la expresión del factor de virulencia, no se sabía que *Bordetella* podía crecer hasta una biomasa razonable en ausencia de sulfato. También debe apreciarse que Jebb y Tomlinson (J. Gen. Microbiol. 17, 59-68) divulgan que el sulfato no era suficiente para proporcionar una fuente de azufre, esto contradice otros documentos de la técnica y posteriores que citan Jebb y Tomlinson (tales como, Licary, Siber y Swartz Journal of Biotechnology 120 (1991) 117-130) que siguieron añadiendo sulfato a sus medios. Esta conclusión se mantiene por otras publicaciones sobre los medios para *Bordetella*, en general estas publicaciones parecen requerir todas que esté presente el sulfato (por ejemplo, el medio de Stainer Scholte como se describe anteriormente, contiene sulfato). Los presentes inventores, sin embargo, han descubierto sorprendentemente que el FeSO₄ puede reemplazarse con citrato de Fe(III) para eliminar el sulfato (reduciendo de este modo la inhibición de la expresión del factor de virulencia) y aún proporciona un medio eficaz que mantiene el crecimiento de *Bordetella* y que reducir la concentración de sulfato incluso por debajo de la divulgada en el documento WO 0178462 proporciona un aumento

significativo en el rendimiento de los factores de virulencia tales como PT. En una realización adicional, el medio químicamente definido no comprende sulfato.

La expresión "no comprende" un cierto sustrato tal como sulfato se refiere a un medio en que el creador del medio no ha añadido una cantidad significativa de esa sustancia. Por tanto, un medio puede considerarse que "no comprende" una cierta sustancia si el medio comprende una pequeña cantidad de esa sustancia que es, por ejemplo, un contaminante. Como alternativa, un medio puede considerarse que "no comprende" una cierta sustancia si el creador del medio ha añadido una cantidad muy pequeña de esa sustancia que no es suficiente para alterar el rendimiento de un factor de virulencia tal como toxina tosferínica. Esto puede determinarse cultivando la especie de *Bordetella* en presencia de la pequeña cantidad de esa sustancia y en ausencia de la pequeña cantidad de esa sustancia y midiendo el rendimiento de ese factor de virulencia en estos dos cultivos usando un ELISA. Se describe un ELISA adecuado en el párrafo [122].

En una realización, la invención proporciona un medio químicamente definido que comprende una fuente de cisteína seleccionada del grupo que consiste en cisteína y cistina, en el que la fuente de cisteína está a una concentración de menos de 0,50 mM, menos de 0,30 mM, menos de 0,25 mM, menos de 0,20 mM, menos de 0,15 mM, menos de 0,10 mM, menos de 0,05 mM, menos de 0,03 mM, menos de 0,01 mM, menos de 0,005 mM, menos de 0,001 mM, menos de 0,0005 mM, menos de 0,0001 mM, menos de 0,00005 mM o menos de 0,00001 mM.

La cisteína se usa generalmente para la síntesis de biomasa por *Bordetella*, sin embargo, cuando hay cistina presente en concentraciones mayores se catabolizará en sulfato (Bogdan y col. ((2001); Infect. Immun. 69:6823-6830)). Este sulfato no puede asimilarse ya que la ruta de asimilación de sulfato no es funcional (Parkhill y col. ((2003); Nat. Genet. 35:32-40)). Por tanto, el uso de altas concentraciones de cisteína en un medio, pueden proporcionar iones de sulfato que, como se describe anteriormente, inhiben la expresión del factor de virulencia. Sin embargo, Bogdan y col. reconocieron que se requería cisteína para el crecimiento, por tanto, el medio divulgado en Bogdan y col. (incluyendo aquellos que contienen cantidades supuestamente reducidas de cisteína) contienen concentraciones relativamente altas de cisteína. Asimismo, Jebb y Tomlinson (J. Gen. Microbiol. 17, 59-68) describen la presencia de cisteína como esencial para el crecimiento. Los presentes inventores, sin embargo, han demostrado por primera vez que *Bordetella* puede crecer en ausencia de cisteína y, por tanto, que pueden usarse concentraciones incluso inferiores de cisteína que las divulgadas en Bogdan y col.

La cistina es un dímero de cisteína que puede metabolizarse de una manera similar a la cisteína por *Bordetella*, pero proporciona dos veces más de cisteína a *Bordetella*.

En una realización adicional, el medio químicamente definido no comprende cisteína o cistina. En una realización preferida, el medio químicamente definido no comprende sulfato, cisteína o cistina.

En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende una fuente inorgánica de azufre seleccionada del grupo que consiste en tiosulfato, tritronato, tetratronato, peroxodisulfato, sulfuro y sulfito. En una realización adicional, el medio químicamente definido no comprende una fuente orgánica de azufre,

Los presentes inventores han demostrado, por primera vez, que puede usarse azufre inorgánico como fuente de azufre (en lugar de cisteína) para el crecimiento de *Bordetella*.

A partir de la técnica, por ejemplo, Jebb y Tomlinson (J. Gen. Microbiol. 17, 59-68), parece que se requiere una fuente orgánica de azufre para el crecimiento de *Bordetella*. Esto es porque se sabía que la ruta para la síntesis de cisteína a partir de sulfato y tiosulfato no funciona en miembros del género *Bordetella* (Parkhill y col. ((2003); Nat. Genet. 35:32-40)). Sin embargo, los inventores han demostrado por primera vez que *Bordetella* puede crecer en ausencia de una fuente orgánica de azufre (siempre que esté presente una fuente inorgánica de azufre, tal como tiosulfato).

En una realización, el medio químicamente definido comprende tiosulfato. En una realización adicional el medio químicamente definido comprende más de 0,005 mM, más de 0,006 mM, más de 0,007 mM, más de 0,008 mM, más de 0,010 mM, más de 0,050 mM, más de 0,100 mM, entre 0,005 mM y 0,100 mM, entre 0,005 mM y 0,050 mM, entre 0,005 mM y 0,025 mM, aproximadamente 0,120 mM o aproximadamente 0,011 mM de tiosulfato. En una realización adicional el medio químicamente definido comprende tritronato. En una realización adicional el medio químicamente definido comprende más de 0,003 mM, más de 0,004 mM, más de 0,005 mM, más de 0,008 mM, más de 0,010 mM, más de 0,020 mM, más de 0,050 mM, entre 0,003 mM y 0,500 mM, entre 0,003 mM y 0,100 mM, entre 0,005 mM y 0,010 mM, aproximadamente 0,007 mM o aproximadamente 0,080 mM de tritronato. En una realización, el medio químicamente definido comprende tetratronato. En una realización adicional el medio químicamente definido comprende más de 0,002 mM, más de 0,003 mM, más de 0,004 mM, más de 0,005 mM, más de 0,025 mM, más de 0,050 mM, entre 0,002 mM y 1000 mM, entre 0,010 mM y 0,100 mM, aproximadamente 0,060 mM o aproximadamente 0,0006 mM de tetratronato. En una realización, el medio químicamente definido comprende peroxodisulfato. En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende más de 0,005 mM, más de 0,006 mM, más de 0,007 mM, más de 0,008 mM, más de 0,010 mM, más de 0,050 mM, más de 0,100 mM, entre 0,005 mM y 1000 mM, entre 0,005 mM y 0,200 mM, entre 0,005 mM y 0,015 mM, aproximadamente 0,120 mM o aproximadamente 0,011 mM de peroxodisulfato. En una realización, el medio químicamente definido comprende

FUENTE DE AMINOÁCIDOS

Se conoce en líneas generales que los medios deben incluir una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono; en muchos casos se requieren ciertos aminoácidos para el crecimiento (aminoácidos esenciales). Stainer y Scholte (Stainer y Scholte Journal of General Microbiology (1971), 63:211-220) intentaron crear un medio químicamente definido simplificado, sin embargo, concluyeron que se requerían al menos dos aminoácidos, concretamente ácido glutámico prolina y cistina.

Sin embargo, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que *Bordetella* puede crecer en medios que comprenden solamente un único tipo de aminoácido. En particular, los inventores han demostrado que *Bordetella* puede crecer en medios que comprenden solamente un único aminoácido y no comprenden cisteína, esto es particularmente sorprendente ya que, como se describe anteriormente, previamente se creía que la cisteína era necesaria como fuente de azufre. Esto es ventajoso porque, como se describe anteriormente, los medios para uso comercial deben ser lo más simples posibles para reducir las dificultades en la fabricación del medio, el coste del medio y las fuentes potenciales de variabilidad de un lote a otro.

Por esta razón, en una realización, el medio químicamente definido comprende una única fuente de aminoácidos. La expresión "fuente única de aminoácidos" se refiere a un compuesto que proporciona al medio una fuente de un tipo de aminoácido (tal como una fuente de glutamina o asparagina u otro aminoácido), un compuesto tal como cistina puede considerarse una única fuente de aminoácidos ya que, aunque es un dipéptido, contiene solamente cisteína y, por tanto, se suministra solamente un único aminoácido. De forma destacable, un medio se considerará que comprende una única fuente de aminoácidos si hay tanto cisteína como cistina, presentes, ya que estos dos compuestos suministran solamente cisteína (el único aminoácido) al medio. Esta expresión incluye enantiómeros D y L de los aminoácidos. En una realización, la fuente de aminoácidos es un enantiómero D, en una realización adicional, la fuente de aminoácidos es un enantiómero L, en una realización adicional, la fuente de aminoácidos puede ser un enantiómero L o un enantiómero D. Un medio con una "única fuente de aminoácidos" no comprende otros aminoácidos, por ejemplo, un medio con cisteína como la única fuente de aminoácidos no comprende glutamato, alanina, aspartato, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, serina, valina, tirosina o cualquier otro aminoácido. Como se explica anteriormente, la expresión "no comprende" un cierto sustrato tal como ciertos aminoácidos se refiere a un medio en que el creador del medio no ha añadido una cantidad significativa de esa sustancia. Por tanto, un medio puede considerarse que "no comprende" una cierta sustancia si el medio comprende una pequeña cantidad de esa sustancia, que es, por ejemplo, un contaminante. Como alternativa, un medio puede considerarse que "no comprende" una cierta sustancia si el creador del medio ha añadido una cantidad muy pequeña de esa sustancia que no es suficiente para alterar el rendimiento de un factor de virulencia tal como toxina tosferínica. Esto puede determinarse cultivando la especie de *Bordetella* en presencia de la pequeña cantidad de esa sustancia y en ausencia de la pequeña cantidad de esa sustancia y midiendo el rendimiento de ese factor de virulencia en estos dos cultivos usando un ELISA (como se describe anteriormente). En una realización adicional, la fuente única de aminoácidos es una fuente única de nitrógeno.

En una realización, la fuente única de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en cisteína, cistina, alanina, glicina, glutamato, prolina, serina, glutamina, aspartato, leucina, isoleucina, valina, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, arginina ornitina, lisina, treonina, asparagina y metionina. En una realización, la fuente única de aminoácidos es cisteína a una concentración de más de 75 mM, más de 100 mM, más de 125 mM, entre 75 mM y 250 mM, entre 100 mM y 150 mM o aproximadamente 125 mM. En una realización, la fuente única de aminoácidos es prolina a una concentración de más de 75 mM, más de 100 mM, más de 125 mM, entre 75 mM y 250 mM, entre 100 mM y 150 mM o aproximadamente 125 mM. En una realización, la fuente única de aminoácidos es glutamato a una concentración de más de 75 mM, más de 100 mM, más de 125 mM, entre 75 mM y 250 mM, entre 100 mM y 150 mM o aproximadamente 125 mM. En una realización, la fuente única de aminoácidos es glutamina a una concentración de más de 75 mM, más de 100 mM, más de 125 mM, entre 75 mM y 250 mM, entre 100 mM y 150 mM o aproximadamente 125 mM. En una realización, la fuente única de aminoácidos es aspartato a una concentración de más de 10 mM, más de 20 mM, más de 30 mM, entre 10 mM y 100 mM, entre 20 mM y 50 mM o aproximadamente 30 mM. En una realización, la fuente única de aminoácidos es asparagina a una concentración de más de 75 mM, más de 100 mM, más de 125 mM, entre 75 mM y 250 mM, entre 100 mM y 150 mM o aproximadamente 125 mM. En una realización, la fuente única de aminoácidos es serina a una concentración de más de 75 mM, más de 100 mM, más de 125 mM, entre 75 mM y 250 mM, entre 100 mM y 150 mM o aproximadamente 125 mM. En una realización, la fuente única de aminoácidos es alanina a una concentración de más de 75 mM, más de 100 mM, más de 125 mM, entre 75 mM y 250 mM, entre 100 mM y 150 mM o aproximadamente 125 mM.

Los inventores han demostrado además que, aunque puede ser ventajoso usar una fuente única de aminoácidos en un medio químicamente definido para *Bordetella*, ya que esto puede mantener la alta producción de toxinas, también es posible desarrollar un medio que no comprende una fuente de aminoácidos en absoluto. Esto proporciona un medio en que se proporcionan fuentes de carbono y nitrógeno a través de componentes diferentes, esto permite manipular las fuentes de carbono y nitrógeno por separado. De hecho, Thalen y col. (Journal of Biotechnology (1999) 75: 147-159) informaron de que una relación de nitrógeno a carbono de 1:5 (que se encuentra en el medio de Stainer y Scholte (Journal of General Microbiology (1971), 63:211-220)) no es óptima para el crecimiento de

Bordetella y provoca la acumulación de amoníaco. Thalen y col. demostraron que la acumulación de amoníaco podría reducirse drásticamente usando una relación de nitrógeno a carbono de 1:10. Sin embargo, dicha relación no puede obtenerse con aminoácidos de origen natural, para los que esta relación se determina por la composición molecular, y varía de 1:1,5 (arginina) a 1:9 (tirosina y fenilalanina). Para evitar esta limitación, Thalen y col. manipularon la relación de carbono a nitrógeno añadiendo una segunda fuente de carbono que no contenía nitrógeno (lactato, un ácido orgánico). Sin embargo, esta solución es compleja en términos de flujos metabólicos, lo que, a su vez, complica el control y la comprensión del procedimiento, así como la realización de un medio equilibrado (Neeleman y col. (Applied Microbiology and Biotechnology (2001), 57:489-493)). Evitar completamente los aminoácidos ofrece una solución alternativa a manipular de forma precisa la relación de carbono a nitrógeno, ajustando cuidadosamente las concentraciones relativas de una fuente de carbono que no contiene nitrógeno, por un lado, y una fuente de nitrógeno que no contiene carbono, por otro lado. Por esta razón, en una realización adicional, el medio químicamente definido no comprende una fuente de aminoácidos.

El medio debe contener una fuente de carbono, si el medio no contiene una fuente de aminoácidos la fuente de carbono es preferentemente un ácido orgánico. En una realización, el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en citrato, lactato, acetato, piruvato, fumarato y succinato. Los presentes inventores han demostrado que los ácidos orgánicos son reemplazos adecuados para el glutamato como fuente de carbono para que *Bordetella* mantenga niveles razonables de crecimiento.

En una realización, si el medio químicamente definido comprende una única fuente de aminoácidos, o no comprende una fuente de aminoácidos, el medio químicamente definido comprende adicionalmente al menos uno de los componentes del medio químicamente definido que comprenden hidrogenofosfato de potasio, cloruro de potasio, magnesio, calcio, citrato de Fe(III), tampón MOPS, niacina, dimetil- β -ciclodextrina, cobre o cobalto, preferentemente el medio comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de estos componentes. En una realización preferida, el medio químicamente definido comprende todos estos componentes. En una realización adicional, el medio químicamente definido también puede comprender sodio, zinc, biotina, riboflavina, pantotenato de calcio. Preferentemente, el medio comprende sodio, zinc, biotina, riboflavina y pantotenato de calcio.

En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende una única fuente de aminoácidos o no comprende una fuente de aminoácidos, y el medio químicamente definido comprende entre 250 mg/l y 750 mg/l de KH_2PO_4 , entre 100 y 300 mg/l de KCl, entre 500 y 1500 mg/l de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, entre 50 mg/l y 150 mg/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, entre 10 mg/l y 30 mg/l de citrato de Fe(III) $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, entre 1000 mg/l y 5000 mg/l de MOPS, entre 4 mg/l y 8 mg/l de niacina, entre 500 mg/l y 2000 mg/l de dimetil- β -ciclodextrina, entre 0,5 mg/l y 2 mg/l de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y entre 0,1 mg/l y 1 mg/l de $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. En una realización adicional, el medio comprende adicionalmente entre 1 mg/l y 25 mg/l de ZnCl_2 , entre 0,01 y 1,00 mg/l de biotina, entre 0,01 y 1,00 mg/l de riboflavina, entre 1 mg/l y 10 mg/l de pantotenato de calcio y entre 5000 mg/l y 1500 mg/l de NaCl.

ADITIVOS BENEFICIOSOS ADICIONALES

Como se describe anteriormente, se considera que un medio químicamente definido debe contener al menos una fuente carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, una fuente de azufre y un tampón. En general, es ventajoso diseñar un medio químicamente definido para que sea simple (no contenga demasiados componentes) ya que esto reduce el coste y la complejidad de fabricación. Sin embargo, los presente inventores han demostrado que la adición de un aditivo seleccionado del grupo que consiste en zinc, cobalto, tiamina, riboflavina, pantotenato, más 0,4 μM de biotina, más de 50 μM de calcio, más de 15 μM de niacina y más de 25 μM de ácido ascórbico puede mejorar significativamente el rendimiento de la expresión de los factores de virulencia tal como toxina tosferínica.

Por esta razón, en una realización, el medio químicamente definido comprende un aditivo seleccionado del grupo que consiste en zinc, cobalto, tiamina, riboflavina y pantotenato. En una realización adicional el medio químicamente definido comprende un aditivo seleccionado del grupo que consiste en más de 0,4 μM de biotina, más de 50 μM de calcio, más de 15 μM de niacina y más de 25 μM de ácido ascórbico.

En una realización, el medio químicamente definido comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de estos aditivos. En una realización preferida, el medio químicamente definido comprende todo de zinc, cobalto, riboflavina, tiamina, pantotenato, más de 0,4 μM de biotina, más de 0,05 mM de calcio, más de 15 μM de niacina y más de 25 μM de ácido ascórbico. En una realización, la concentración del aditivo en el medio químicamente definido es suficiente para que el aditivo aumente el nivel de producción de factores de virulencia por *Bordetella* (esto puede examinarse usando el ensayo del párrafo [036] para medir si la adición de un aditivo altera el rendimiento de la toxina tosferínica).

En una realización, el medio químicamente definido comprende más de 0,1 μM , más de 1 μM , más de 5 μM , más de 10 μM , más de 20 μM , más de 30 μM , más de 40 μM , más de 50 μM , más de 60 μM , más de 70 μM , más de 100 μM , más de 200 μM , más de 400 μM , más de 400 μM , más de 600 μM , más de 700 μM , entre 10 μM y 2000 μM , entre 20 μM y 1000 μM , entre 30 μM y 100 μM o aproximadamente 75 μM de zinc. En una realización, el medio químicamente definido comprende más de 0,05 μM , más de 0,10 μM , más de 0,15 μM , entre 0,10 μM y 0,30 μM , entre 0,10 μM y 0,20 μM o aproximadamente 0,18 μM de cobalto. En una realización, el medio químicamente definido comprende más de 0,05 μM , más de 0,10 μM , más de 0,15 μM , entre 0,05 μM y 5,00 μM , entre 0,10 μM y

1,00 μM , o entre 0,15 μM y 0,50 μM de tiamina. En una realización, el medio químicamente definido comprende más de 0,1 μM , más de 0,2 μM , más de 0,3 μM , más de 0,4 μM más de 0,5 μM , más de 0,6 μM , más de 0,8 μM , entre 0,1 μM y 10 μM , entre 0,5 μM y 1,0 μM o aproximadamente 0,8 μM de riboflavina. En una realización, el medio químicamente definido comprende más de 0,10 μM , más de 0,5 μM , más de 1,0 μM , más de 1,5 μM , más de 2,0 μM , más de 5,0 μM , más de 8,0 μM , entre 0,5 μM y 100 μM , entre 0,5 μM y 25,0 μM , entre 5,0 μM y 10,0 μM , o aproximadamente 8,0 μM de pantotenato. En una realización, el medio químicamente definido comprende más de 0,4 μM , más de 0,5 μM , más de 0,6 μM , más de 0,8 μM , entre 0,5 μM y 100 μM , entre 0,5 μM y 25,0 μM , entre 5,0 μM y 10,0 μM , o aproximadamente 8,0 μM de biotina. En una realización, el medio químicamente definido comprende más de 100 μM , más de 120 μM , más de 140 μM , entre 50 μM y 1000 μM , entre 50 μM y 500 μM , entre 100 μM y 200 μM o aproximadamente 140 μM de calcio. En una realización, el medio químicamente definido comprende más de 20 μM , más de 30 μM , más de 35 μM , entre 15 μM y 500 μM , entre 15 μM y 100 μM , entre 25 μM y 75 μM o aproximadamente 50 μM de niacina. En una realización, el medio químicamente definido comprende más de 50 μM , más de 75 μM , más de 100 μM , más de 1000 μM , más de 2000 μM , más de 3000 μM , entre 25 μM y 10 000 μM , entre 10 000 μM y 5000 μM , o aproximadamente 3500 μM de ácido ascórbico.

En una realización preferida, el medio químicamente definido comprende más de 0,01 mM de zinc, más de 0,0005 mM de cobalto, más de 0,005 mM de tiamina, más de 0,0001 mM de riboflavina, más de 0,005 de pantotenato, más de 0,4 μM de biotina, más de 0,05 mM de calcio, más de 15 μM de niacina y más de 25 μM de ácido ascórbico.

En una realización preferida adicional, el medio químicamente definido comprende más de 700 μM de zinc, más de 0,15 μM de cobalto, más de 29 μM de tiamina, más de 0,8 μM de riboflavina, más de 8,0 μM de pantotenato, más de 0,8 μM de biotina, más de 140 μM de calcio, más de 35 μM de niacina y más de 3000 μM de ácido ascórbico.

En una realización preferida adicional, el medio químicamente definido comprende entre 10 μM y 150 μM de zinc, entre 0,10 μM y 0,30 μM de cobalto, entre 25 μM y 200 μM de tiamina, entre 0,1 μM y 10 μM de riboflavina, entre 0,5 μM y 100 μM de pantotenato, entre 0,5 μM y 100 μM de biotina, entre 50 μM y 1000 μM de calcio, entre 1 μM y 500 μM de niacina y entre 25 μM y 10 000 μM de ácido ascórbico.

En una realización preferida adicional, el medio químicamente definido comprende entre 30 μM y 80 μM de zinc, entre 0,10 μM y 0,20 μM de cobalto, entre 25 μM y 50 μM de tiamina, entre 0,5 μM y 1,0 μM de riboflavina, entre 5,0 μM y 10,0 μM de pantotenato, entre 5,0 μM y 10,0 μM de biotina, entre 100 μM y 200 μM de calcio, entre 25 μM y 75 μM de niacina y entre 10 000 μM y 5000 μM de ácido ascórbico.

30 CONCENTRACIONES DE AMINOÁCIDOS

Los presentes inventores han demostrado adicionalmente que los medios de la técnica anterior tal como el de Stainer Scholte pueden mejorarse por la adición de altos niveles de aspartato, glicina, metionina y leucina. Por tanto, en una realización adicional se proporciona un medio químicamente definido que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en aspartato a una concentración de más de 1000 μM , glicina a una concentración de más de 1000 μM , metionina a una concentración de más de 500 μM y leucina a una concentración de más de 1500 μM .

En una realización, el medio químicamente definido comprende aspartato a una concentración de más de 1000 μM , más de 2000 μM , más de 2450 μM , más de 3000 μM , más de 3500 μM , entre 1000 μM y 10 000 μM , entre 1000 μM y 5000 μM o aproximadamente 4000 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende glicina a una concentración de más de 500 μM , más de 1000 μM , más de 1500 μM , más de 1750 μM , entre 500 μM y 5000 μM , entre 500 μM y 2500 μM o aproximadamente 2000 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende metionina a una concentración de más de 100 μM , más de 300 μM , más de 500 μM , más de 600 μM , más de 700 μM , entre 100 μM y 2000 μM , entre 100 μM y 1000 μM o aproximadamente 775 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende leucina a una concentración de más de 500 μM , más de 1000 μM , más de 1500 μM , más de 2000 μM , más de 2500 μM , más de 3000 μM , entre 500 μM y 10 000 μM , entre 500 μM y 5000 μM , entre 3000 μM y 4000 μM o aproximadamente 3300 μM . En una realización, el medio químicamente definido comprende al menos 2, 3 o 4 de aspartato a una concentración de más de 100 μM , glicina a una concentración de más de 1000 μM , metionina a una concentración de más de 500 μM y leucina a una concentración de más de 1500 μM . En una realización preferida, el medio químicamente definido de la invención comprende aspartato a una concentración de más de 1000 μM , glicina a una concentración de más de 1000 μM , metionina a una concentración de más de 500 μM y leucina a una concentración de más de 1500 μM .

En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende glutamato a una concentración de más de 50 mM, más de 75 mM, más de 90 mM, más de 100 mM, más de 110 mM, entre 50 mM y 500 mM, entre 50 mM y 250 mM, entre 100 mM y 150 mM o aproximadamente 120 mM. En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende alanina a una concentración de más de 1000 μM , más de 1500 μM , más de 2000 μM , más de 2500 μM , más de 3000 μM , entre 1000 μM y 10 000 μM , entre 1000 μM y 5000 μM , entre 3000 μM y 4000 μM o aproximadamente 3400 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende fenilalanina a una concentración de más de 500 μM , más de 750 μM , más de 1000 μM , más de 1250 μM , más de 1400 μM , entre 500 μM y 10 000 μM , entre 500 μM y 5000 μM , entre 1000 μM y 2000 μM o aproximadamente 1400 μM . En una

realización adicional, el medio químicamente definido comprende histidina a una concentración de más de 50 μM , más de 100 μM , más de 150 μM , más de 200 μM , entre 50 μM y 1000 μM , entre 50 μM y 500 μM , entre 150 μM y 250 μM o aproximadamente 200 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende isoleucina a una concentración de más de 500 μM , más de 1000 μM , más de 1500 μM , más de 1750 μM , entre 500 μM y 5000 μM , entre 500 μM y 2500 μM , entre 1000 μM y 2000 μM o aproximadamente 1800 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende lisina a una concentración de más de 500 μM , más de 1000 μM , más de 1500 μM , más de 2000 μM , entre 500 μM y 10 000 μM , entre 500 μM y 5000 μM , entre 1500 μM y 2500 μM o aproximadamente 2100 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende prolina a una concentración de más de 1000 μM , más de 3000 μM , más de 4000 μM , más de 5000 μM , más de 6000 μM , más de 7000 μM , entre 1000 μM y 50 000 μM , entre 1000 μM y 10 000 μM , entre 7000 μM y 8000 μM o aproximadamente 7600 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende serina a una concentración de más de 500 μM , más de 1000 μM , más de 1500 μM , más de 1700 μM , entre 500 μM y 10 000 μM , entre 500 μM y 5000 μM , entre 1000 μM y 2000 μM o aproximadamente 1700 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende valina a una concentración de más de 1000 μM , más de 2000 μM , más de 2500 μM , más de 3000 μM , entre 1000 μM y 10 000 μM , entre 1000 μM y 5000 μM , entre 3000 μM y 4000 μM o aproximadamente 3400 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende tirosina a una concentración de más de 25 μM , más de 50 μM , más de 75 μM , más de 100 μM , más de 150 μM , más de 175 μM , entre 25 μM y 1000 μM , entre 25 μM y 500 μM , entre 100 μM y 200 μM o aproximadamente 180 μM . En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende glutatión a una concentración de más de 100 μM , más de 200 μM , más de 400 μM , más de 500 μM , más de 600 μM , más de 700 μM , entre 100 μM y 5000 μM , entre 100 μM y 2500 μM , entre 100 μM y 1000 μM o aproximadamente 750 μM . En una realización preferida, el medio químicamente definido comprende glutamato a una concentración de más de 50 μM , alanina a una concentración de más de 1000 μM , aspartato a una concentración de más de 1000 μM , fenilalanina a una concentración de más de 500 μM , glicina a una concentración de más de 500 μM , histidina a una concentración de más de 50 μM , isoleucina a una concentración de más de 500 μM , lisina a una concentración de más de 500 μM , leucina a una concentración de más de 500 μM , metionina a una concentración de más de 100 μM , prolina a una concentración de más de 1000 μM , serina a una concentración de más de 500 μM , valina a una concentración de más de 1000 μM , tirosina a una concentración de más de 25 μM y glutatión a una concentración de más de 700 μM . En una realización preferida adicional, el medio químicamente definido comprende glutamato a una concentración de más de 110 mM, alanina a una concentración de más de 3000 μM , aspartato a una concentración de más de 3500 μM , fenilalanina a una concentración de más de 1400 μM , glicina a una concentración de más de 1750 μM , histidina a una concentración de más de 200 μM , isoleucina a una concentración de más de 1750 μM , lisina a una concentración de más de 2000 μM , leucina a una concentración de más de 3000 μM , metionina a una concentración de más de 700 μM , prolina a una concentración de más de 7000 μM , serina a una concentración de más de 1700 μM , valina a una concentración de más de 3000 μM , tirosina a una concentración de más de 175 μM y glutatión a una concentración de más de 700 μM

En una realización preferida, el medio químicamente definido comprende aspartato a una concentración entre 1000 μM y 10 000 μM , glicina a una concentración entre 500 μM y 5000 μM , metionina a una concentración entre 100 μM y 2000 μM , leucina a una concentración entre 500 μM y 10 000 μM , glutamato a una concentración entre 50 mM y 500 mM, alanina a una concentración entre 1000 μM y 10 000 μM , fenilalanina a una concentración entre 500 μM y 10 000 μM , histidina a una concentración entre 50 μM y 1000 μM , isoleucina a una concentración entre 500 μM y 5000 μM , lisina a una concentración entre 500 μM y 10 000 μM , prolina a una concentración entre 1000 μM y 50 000 μM , serina a una concentración entre 500 μM y 10 000 μM , valina a una concentración entre 1000 μM y 10 000 μM , tirosina a una concentración entre 25 μM y 1000 μM y glutatión a una concentración entre 100 μM y 5000 μM

En una realización preferida, el medio químicamente definido comprende aspartato a una concentración entre 1000 μM y 5000 μM , glicina a una concentración entre 500 μM y 2500 μM , metionina a una concentración entre 100 μM y 1000 μM , leucina a una concentración entre 3000 μM y 4000 μM , glutamato a una concentración entre 100 mM y 150 mM, alanina a una concentración entre 3000 μM y 4000 μM , fenilalanina a una concentración entre 1000 μM y 2000 μM , histidina a una concentración entre 150 μM y 250 μM , isoleucina a una concentración entre 1000 μM y 2000 μM , lisina a una concentración entre 1500 μM y 2500 μM , prolina a una concentración entre 7000 μM y 8000 μM , serina a una concentración entre 1000 μM y 2000 μM , valina a una concentración entre 3000 μM y 4000 μM , tirosina a una concentración entre 100 μM y 200 μM y glutatión a una concentración entre 100 μM y 1000 μM .

55 RELACIONES DE COMPONENTES

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que si se usan ciertas relaciones de compuestos el medio químicamente definido proporcionará rendimientos mejorados de factores de virulencia tales como toxina tosferínica y FHA. Por esta razón, se proporciona un medio químicamente definido que comprende al menos dos componentes y en el que los al menos dos componentes se seleccionan del grupo que consiste en:

- 60 a) carbono y fósforo a una relación de más de 100:1, más de 125:1, más de 150:1, más de 175:1 o más de 200:1 (carbono:fósforo) (mol/mol);
 b) glutamato y fósforo a una relación de más de 20:1, más de 22:1, más de 24:1 o más de 25:1

- (glutamato:fósforo) (mol/mol);
 (c) carbono y magnesio a una relación de menos de 600:1, menos de 500:1, menos de 400:1 o menos de 300:1 (carbono:magnesio) (mol/mol);
 5 (d) glutamato y magnesio a una relación de menos de 115:1, menos de 110:1, menos de 105:1 o menos de 100:1 (glutamato:magnesio) (mol/mol);
 (e) carbono y cobre a una relación de más de 3000:1, más de 3500:1, o más de 4000:1 (carbono:cobre) (mol/mol);
 (f) glutamato y cobre a una relación de más de 170:1, más de 180:1, más de 200:1 o más de 250:1 (glutamato:cobre) (mol/mol);
 10 (g) carbono y hierro a una relación de más de 9500:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (carbono:hierro) (mol/mol);
 (h) glutamato y hierro a una relación de más de 1600:1, más de 1800:1, más de 2000:1 o más de 2500:1 (glutamato:hierro) (mol/mol);
 15 (i) carbono y glicina a una relación de menos de 500:1, menos de 400:1, menos de 300:1 o menos de 250:1 (carbono:glicina) (mol/mol);
 (j) glutamato y glicina a una relación de menos de 100:1, menos de 80:1, menos de 75:1 o menos de 60:1 (glutamato:glicina) (mol/mol);
 (k) carbono y leucina a una relación de menos de 440:1, menos de 400:1, menos de 350:1 o menos de 300:1 (carbono:leucina) (mol/mol);
 20 (l) glutamato y leucina a una relación de menos de 75:1, menos de 70:1, menos de 60:1 o menos de 50:1 (glutamato:leucina) (mol/mol);
 (m) carbono y metionina a una relación de menos de 1200:1, menos de 1000:1, menos de 800:1 o menos de 750:1 (carbono:metionina) (mol/mol);
 25 (n) glutamato y metionina a una relación de menos 200:1, menos de 175:1, menos de 150:1 o menos de 120:1 (glutamato:metionina) (mol/mol);
 (o) carbono y calcio a una relación de más de 3750:1, más de 4000:1, más de 4500:1 o más de 5000:1 (carbono:calcio) (mol/mol);
 (p) glutamato y calcio a una relación de más de 620:1, más de 650:1, más de 675:1 o más de 750:1 (glutamato:calcio) (mol/mol);
 30 (q) carbono y cobalto a una relación de más de 3000:1, más de 3500:1, más de 4750:1 o más de 5000:1 (carbono:cobalto) (mol/mol);
 (r) glutamato y cobalto a una relación de más de 750:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (glutamato:cobalto) (mol/mol);
 35 (s) carbono y zinc a una relación de más de 3000:1, más de 3500:1, más de 4000:1 o más de 5000:1 (carbono:zinc) (mol/mol);
 (t) glutamato y zinc a una relación de más de 750:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (glutamato:zinc) (mol/mol);
 (u) carbono y equivalentes de sulfato a una relación de más de 750:1, más de 1000:1, más de 1250:1 o más de 1500:1 (carbono:equivalentes de sulfato) (mol/mol); y
 40 (v) glutamato y equivalentes de sulfato a una relación de más de 130:1, más de 150:1, más de 175:1 o más de 200:1 (glutamato: equivalentes de sulfato) (mol/mol).

En una realización, el medio químicamente definido comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o los 22 de (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l), (m), (n), (o), (p), (q), (r), (s), (t), (u) y (v). En una realización, el medio químicamente definido comprende carbono y fósforo a una relación de más de 200:1 (carbono:fósforo) (mol/mol), glutamato y fósforo a una relación de más de 25:1 (glutamato:fósforo) (mol/mol),
 45 carbono y magnesio a una relación de menos de 300:1 (carbono:magnesio) (mol/mol), glutamato y magnesio a una relación de menos de 100:1 (glutamato:magnesio) (mol/mol), carbono y cobre a una relación de más de 4000:1 (carbono:cobre) (mol/mol), glutamato y cobre a una relación de más de 250:1 (glutamato:cobre) (mol/mol), carbono y hierro a una relación de más de 1500:1 (carbono:hierro) (mol/mol), glutamato y hierro a una relación de más de 2500:1 (glutamato:hierro) (mol/mol), carbono y glicina a una relación de menos de 250:1 (carbono:glicina) (mol/mol),
 50 glutamato y glicina a una relación de menos de 250:1 (carbono:glicina) (mol/mol), carbono y leucina a una relación de menos de 300:1 (carbono:leucina) (mol/mol), glutamato y leucina a una relación de menos de 50:1 (glutamato:leucina) (mol/mol), carbono y metionina a una relación de menos de 750:1 (carbono:metionina) (mol/mol), glutamato y metionina a una relación de menos de 120:1 (glutamato:metionina) (mol/mol), carbono y calcio a una relación de más de 5000:1 (carbono:calcio) (mol/mol), glutamato y calcio a una relación de más de 750:1 (glutamato:calcio) (mol/mol),
 55 carbono y cobalto a una relación de más de 5000:1 (carbono:cobalto) (mol/mol), glutamato y cobalto a una relación de más de 1500:1 (glutamato:cobalto) (mol/mol), carbono y zinc a una relación de más de 5000:1 (carbono:zinc) (mol/mol), glutamato y zinc a una relación de más de 1500:1 (glutamato:zinc) (mol/mol), carbono y equivalentes de sulfato a una relación de más de 1500:1 (carbono:equivalentes de sulfato) y glutamato y equivalentes de sulfato a una relación de más de 200:1 (glutamato: equivalentes de sulfato).

La expresión "equivalentes de sulfato" se refiere a sulfato inorgánico o compuestos orgánicos cuyo catabolismo provoca la producción de sulfato (incluyendo, aunque sin imitación cisteína, cistina y glutatión).

MEDIO QUE COMPRENDE FE(III)

Los medios de *Bordetella* tienden a incluir hierro en forma de iones de Fe(II) tal como el medio de Stainer Scholte que comprende FeSO₄ (Stainer and Scholte Journal of General Microbiology (1971), 63:211-220), sin embargo, los presentes inventores han demostrado que los iones de Fe(III) también pueden usarse en un medio para *Bordetella* y, además, que un medio que comprende iones de Fe(III) (tal como citrato de Fe(III)) proporciona niveles mayores de producción de factores de virulencia tales como toxina tosferínica que un medio que comprende iones de Fe(II) (tal como FeSO₄).

Por tanto, en una realización, el medio químicamente definido comprende iones de Fe(III). Asimismo, en una realización, el medio químicamente definido comprende Fe(II) o Fe(III) en complejo con un compuesto orgánico, preferentemente el medio químicamente definido comprende Fe(III) en complejo con un compuesto orgánico. En una realización, el compuesto orgánico es un compuesto orgánico seleccionado del grupo que consiste en hemo, hemoglobina, mioglobina, transferrina, ferritina, lactoferrina, enterobactina, aerobactina, alcaligina, coprógeno, ferricromo, desferrioxamina, ferroxamina, hidroxamato, citrato y dihidroxibenzoilserina. En una realización, el medio químicamente definido comprende Fe(III) en complejo con citrato. En una realización adicional, el medio químicamente definido comprende más de 10 µM, más de 20 µM, más de 30 µM, más de 40 µM, más de 50 µM, entre 10 µM y 500 µM, entre 10 µM y 100 µM, entre 25 µM y 75 µM o aproximadamente 60 µM de citrato de Fe(III).

COMPONENTES ADICIONALES DEL MEDIO

El medio de la invención puede comprender componentes adicionales a los descritos anteriormente. Por ejemplo, el medio químicamente definido puede comprender cloruro. En una realización, el medio químicamente definido comprende cloruro a una concentración de menos de 45 mM, menos de 40 mM, menos de 35 mM, menos de 30 mM, menos de 25 mM, menos de 20 mM o menos de 15 mM, entre 0,1 mM y 500 mM, entre 10 mM y 20 mM o aproximadamente 16 mM de cloruro. El medio químicamente definido puede comprender acetato, en una realización, el medio químicamente definido comprende acetato a una concentración de más de 1 mM, más de 2 mM, más de 3 mM, más de 4 mM, entre 1 mM y 100 mM, entre 4 mM y 6 mM o aproximadamente 5 mM de acetato. El medio químicamente definido puede comprender potasio. En una realización, el medio químicamente definido comprende potasio a una concentración de más de 1 mM, más de 2 mM, más de 3 mM, más de 4 mM, más de 5 mM, más de 6 mM, entre 1 mM y 100 mM, entre 5,5 mM y 7 mM o aproximadamente 6,5 mM. El medio químicamente definido puede comprender una fuente de fósforo, en una realización la fuente de fósforo comprende fosfato a una concentración de más de 0,5 mM, más de 1 mM, más de 1,5 mM, más de 2 mM, más de 2,5 mM, entre 0,5 mM y 100 mM, entre 3 mM y 4 mM o aproximadamente 3,6 mM. El medio químicamente definido puede comprender dimetil-β-ciclodextrina. En una realización, el medio químicamente definido comprende dimetil-β-ciclodextrina a una concentración de más de 0,1 mM, más de 0,2 mM, más de 0,3 mM, más de 0,4 mM, más de 0,5 mM, más de 0,6 mM, entre 0,01 mM y 10 mM, entre 0,7 mM y 0,8 mM o aproximadamente 0,75 mM.

En una realización, el medio químicamente definido no comprende sulfato, cisteína o cistina y comprende más de 0,008 mM de tiosulfato, más de 11 mM de MOPS, más de 6 µM de cobre, más de 400 µM de magnesio, más de 700 µM de zinc, más de 0,15 µM de cobalto, más de 29 µM de tiamina, más de 0,8 µM de riboflavina, más de 8,0 µM de pantotenato, más de 0,8 µM de biotina, más de 140 µM de calcio, más de 35 µM de niacina, más de 3000 µM de ácido ascórbico, glutamato a una concentración de más de 110 mM, alanina a una concentración de más de 3000 µM, aspartato a una concentración de más de 3500 µM, fenilalanina a una concentración de más de 1400 µM, glicina a una concentración de más de 1750 µM, histidina a una concentración de más de 200 µM, isoleucina a una concentración de más de 1750 µM, lisina a una concentración de más de 2000 µM, leucina a una concentración de más de 3000 µM, metionina a una concentración de más de 700 µM, prolina a una concentración de más de 7000 µM, serina a una concentración de más de 1700 µM, valina a una concentración de más de 3000 µM, tirosina a una concentración de más de 175 µM, glutatión a una concentración de más de 700 µM, menos de 15 mM de cloruro, más de 4 mM de acetato, más de 6 mM de potasio, más de 0,6 mM dimetil-β-ciclodextrina y más de 2,5 mM de fosfato; opcionalmente el medio químicamente definido comprende además sodio y más de 50 µM de citrato de Fe(III).

En una realización, el medio químicamente definido no comprende sulfato, cisteína o cistina y comprende entre 0,005 mM y 0,100 mM de tiosulfato, entre 2 mM y 100 mM de MOPS, entre 2 µM y 200 µM de cobre, entre 2 µM y 6000 µM de magnesio, entre 10 µM y 150 µM de zinc, entre 0,10 µM y 0,30 µM de cobalto, entre 25 µM y 200 µM de tiamina, entre 0,1 µM y 10 µM de riboflavina, entre 0,5 µM y 100 µM de pantotenato, entre 0,5 µM y 100 µM de biotina, entre 50 µM y 1000 µM de calcio, entre 1 µM y 500 µM de niacina, entre 25 µM y 10 000 µM de ácido ascórbico, aspartato a una concentración entre 1000 µM y 10 000 µM, glicina a una concentración entre 500 µM y 5000 µM, metionina a una concentración entre 100 µM y 2000 µM, leucina a una concentración entre 500 µM y 10 000 µM, glutamato a una concentración entre 50 mM y 500 mM, alanina a una concentración entre 1000 µM y 10 000 µM, fenilalanina a una concentración entre 500 µM y 10 000 µM, histidina a una concentración entre 50 µM y 1000 µM, isoleucina a una concentración entre 500 µM y 5000 µM, lisina a una concentración entre 500 µM y 10 000 µM, prolina a una concentración entre 1000 µM y 50 000 µM, serina a una concentración entre 500 µM y 10 000 µM, valina a una concentración entre 1000 µM y 10 000 µM, tirosina a una concentración entre 25 µM y 1000 µM, glutatión a una concentración entre 100 µM y 5000 µM, entre 0,1 mM y 500 mM de cloruro, entre 1 mM y 100 mM de acetato, entre 1 mM y 100 mM de potasio, entre 0,01 mM y 10 mM de dimetil-β-ciclodextrina y entre

0,5 mM y 100 mM de fosfato; opcionalmente el medio químicamente definido comprende además sodio y entre 10 μ M y 500 μ M de citrato de Fe(III).

5 En una realización, el medio químicamente definido no comprende sulfato, cisteína o cistina y comprende entre 0,005 mM y 0,025 mM de tiosulfato, entre 5 mM y 20 mM de MOPS, entre 4 μ M y 10 μ M de cobre, entre 1000 μ M y 6000 μ M, entre 30 μ M y 80 μ M de zinc, entre 0,10 μ M y 0,20 μ M de cobalto, entre 25 μ M y 50 μ M de tiamina, entre 0,5 μ M y 1,0 μ M de riboflavina, entre 5,0 μ M y 10,0 μ M de pantotenato, entre 5,0 μ M y 10,0 μ M de biotina, entre 100 μ M y 200 μ M de calcio, entre 25 μ M y 75 μ M de niacina, entre 10 000 μ M y 5000 μ M de ácido ascórbico, aspartato a una concentración entre 1000 μ M y 5000 μ M, glicina a una concentración entre 500 μ M y 2500 μ M, metionina a una concentración entre 100 μ M y 1000 μ M, leucina a una concentración entre 3000 μ M y 4000 μ M, glutamato a una concentración entre 100 mM y 150 mM, alanina a una concentración entre 3000 μ M y 4000 μ M, fenilalanina a una concentración entre 1000 μ M y 2000 μ M, histidina a una concentración entre 150 μ M y 250 μ M, isoleucina a una concentración entre 1000 μ M y 2000 μ M, lisina a una concentración entre 1500 μ M y 2500 μ M, prolina a una concentración entre 7000 μ M y 8000 μ M, serina a una concentración entre 1000 μ M y 2000 μ M, valina a una concentración entre 3000 μ M y 4000 μ M, tirosina a una concentración entre 100 μ M y 200 μ M y glutatión a una concentración entre 100 μ M y 1000 μ M, entre 10 mM y 20 mM de cloruro, entre 4 mM y 6 mM de acetato, entre 5,5 mM y 7 mM de potasio, entre 0,7 mM y 0,8 mM de dimetil- β -ciclodextrina y entre 3 mM y 4 mM de fosfato; el medio químicamente definido comprende además opcionalmente sodio y entre 25 μ M y 75 μ M de citrato de Fe(III).

PROCEDIMIENTO DE FERMENTACIÓN

20 La invención proporciona adicionalmente un procedimiento de fermentación para cultivar una especie de *Bordetella* en un medio químicamente definido (CDM) que comprende

- (a) inocular el medio químicamente definido de la invención con la especie de *Bordetella*;
- (b) mantener la especie de *Bordetella* en el medio químicamente definido durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la acumulación de biomasa.

25 La expresión "procedimiento de fermentación" se refiere a un procedimiento a escala industrial para cultivar células y/o expresar un factor de virulencia a partir de esas células. La expresión "escala industrial" se refiere a un procedimiento en un fermentador, en una realización, el procedimiento a escala industrial es un procedimiento en un fermentador con un volumen de trabajo entre 5 y 10 000 litros, entre 10 y 5000 litros, entre 20 y 2000 litros, entre 50 litros y 1000 litros, más de o igual a 5 litros, más de o igual a 10 litros, más de o igual a 15 litros, más de o igual a 20 litros, más de o igual a 25 litros, más de o igual a 50 litros, más de o igual a 100 litros, menos de o igual a 10 000 litros, menos de o igual a 5000 litros o menos de o igual a 2500 litros. En una realización, el "procedimiento a escala industrial" es un procedimiento adecuado para la producción de más de 10 mg/l, más de 15 mg/l o más de 20 mg/l toxina tosferínica.

35 En una realización, el procedimiento de fermentación tiene un tiempo de generación promedio de menos de 15 h, menos de 12 h, menos de 10 h o menos de 9 h. El párrafo [029] describe un procedimiento para determinar el tiempo de generación promedio.

En una realización adicional, el procedimiento de fermentación produce más de 10 mg/l, más de 15 mg/l o más de 20 mg/l toxina tosferínica. El párrafo [031] describe un procedimiento para determinar los rendimientos de toxina tosferínica.

40 En una realización, el procedimiento de fermentación se realiza a una temperatura de más de o igual a 32 °C, más de o igual a 33 °C, más de o igual a 34 °C, menos de o igual a 45 °C, menos de o igual a 42 °C, menos de o igual a 40 °C menos de o igual a 38 °C, entre 32 °C y 45 °C, entre 33 °C y 42 °C, entre 33 °C y 40 °C o entre 33 °C y 38 °C.

En una realización, se usa antiespumante durante el procedimiento de fermentación. En una realización adicional, el antiespumante es polidimetil siloxano.

45 En una realización, el nivel de oxígeno disuelto es entre 1 μ M y 160 μ M, entre 15 μ M y 140 μ M, entre 30 μ M y 120 μ M, entre 45 μ M y 110 μ M, entre 60 μ M y 100 μ M o aproximadamente 80 μ M.

En una realización, el pH del procedimiento de fermentación es entre pH 6,0 y pH 7,5, entre pH 6,5 y pH 7,0 o aproximadamente pH 7,2.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL FACTOR DE VIRULENCIA

50 En una realización, la especie de *Bordetella* expresa al menos un factor de virulencia que comprende toxina tosferínica (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) pertactina (PRN) aglutinógeno 2 o aglutinógeno 3. En una realización, la especie de *Bordetella* expresa PT, en una realización la especie de *Bordetella* expresa FHA, en una realización la especie de *Bordetella* expresa PRN, en una realización la especie de *Bordetella* expresa PT y FHA, en una realización la especie de *Bordetella* expresa PT y PRN, en una realización la especie de *Bordetella* expresa PRN y FHA, en una realización la especie de *Bordetella* expresa PT, PRN y FHA. PT, FHA y PRN son bien conocidos en la técnica.

55

En una realización, el procedimiento comprende además una etapa c) de purificación del factor de virulencia para producir un factor de virulencia purificado. El factor de virulencia purificado puede ser una toxina tosferínica (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN), aglutinógeno 2 o aglutinógeno 3 purificado. El factor de virulencia purificado puede alterarse después de la purificación, por ejemplo, la toxina tosferínica puede
 5 destoxificarse químicamente después de la purificación. Véanse también, los documentos EP 427462 y WO 91/12020 para la preparación de antígenos tosferínicos. En una realización, la etapa c) implica la purificación celular usando cromatografía. En una realización, la técnica de cromatografía es cromatografía de afinidad, filtración en gel, cromatografía líquida a alta presión (HPLC) o cromatografía de intercambio iónico. Opcionalmente, la cromatografía de afinidad usa una columna de purificación con marca de afinidad, una columna de purificación con anticuerpo, una columna de afinidad con lectina, una columna de purificación con prostaglandina o una columna de
 10 estreptavidina. Opcionalmente, la HPLC usa una columna de intercambio iónico, una columna en fase inversa o una columna por exclusión de tamaño. Opcionalmente, la columna de intercambio iónico es una columna de intercambio aniónico o una columna de intercambio catiónico.

El procedimiento puede comprender además una etapa d) de formulación de una composición inmunogénica que comprende el factor de virulencia purificado.
 15

El procedimiento puede comprender además una etapa e) de adición de al menos un antígeno adicional a la composición inmunogénica. En una realización, el al menos un antígeno adicional se selecciona del grupo que consiste en toxina tosferínica, hemaglutinina filamentosa, pertactina, un aglutinógeno fimbrial, toxoide diftérico, toxoide tetánico, al menos un antígeno sacárido conjugado de *N. meningitidis*, antígeno superficial de hepatitis B, polio virus inactivado (IPV) y un antígeno sacárido conjugado de *Haemophilus influenzae* b. El al menos un antígeno sacárido conjugado de *N. Meningitidis* puede ser MenC, MenY, MenA y MenW (por ejemplo, A+C, A+Y, A+W, C+Y, C+W, Y+W, A+C+Y, A+C+W, A+Y+W, C+Y+W, A+C+Y+W); opcionalmente se incluye MenC y/o MenY, opcionalmente se incluyen los cuatro.
 20

Como alternativa o además de los antígenos meningocócicos anteriores, la composición inmunogénica puede comprender uno o más conjugados de oligosacárido capsular o polisacárido de neumococos-proteína de vehículo.
 25

Típicamente, los oligosacáridos capsulares o polisacáridos de neumococos (preferentemente los últimos) representados en las composiciones de la invención comprenden antígenos derivados de al menos cuatro serotipos de neumococos. Preferentemente, los cuatro serotipos comprenden 6B, 14, 19F y 23F. Más preferentemente, al menos 7 serotipos están comprendidos en la composición, por ejemplo, los derivados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F. Más preferentemente aún, al menos 11 serotipos están comprendidos en la composición (11 valente), por ejemplo, los derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización preferida de la invención, al menos 13 de dichos antígenos neumocócicos conjugados están comprendidos, aunque también se contemplan antígenos adicionales, por ejemplo, 23 valente (tal como los 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), por la invención.
 30

En una realización, la composición inmunogénica comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, el procedimiento de fermentación comprende una etapa f) de adición de un excipiente farmacéuticamente aceptable a la composición inmunogénica.
 35

En una realización, la composición inmunogénica comprende un adyuvante tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. En una realización, el procedimiento de fermentación comprende una etapa g) de adición de un adyuvante a la composición inmunogénica. Los procedimientos de adsorción de DTPa y DTPw en adyuvantes de aluminio son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/24148 y WO 97/00697. Habitualmente, los componentes adsorbidos en adyuvante se dejan durante un periodo de al menos 10 minutos a temperatura ambiente a un pH apropiado para adsorber la mayoría y preferentemente todo el antígeno antes de mezclar los antígenos juntos en las composiciones inmunogénicas de combinación de la presente invención.
 40

Otros componentes se dejan preferentemente sin adsorber (tales como (IPV) o se adsorben específicamente en otros adyuvantes-el antígeno superficial de hepatitis B (HBsAg) se adsorbe preferentemente en fosfato de aluminio (como se describe en el documento WO 93/24148) antes de mezclarlo con otros componentes.
 45

En una realización adicional, se proporciona un factor de virulencia que se puede obtener por el procedimiento. En una realización adicional, se proporciona un factor de virulencia obtenido por el procedimiento.

En una realización adicional, se proporciona una composición inmunogénica que comprende el factor de virulencia y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición inmunogénica comprende al menos un antígeno adicional. En una realización, el al menos un antígeno adicional se selecciona del grupo que consiste en toxina tosferínica, hemaglutinina filamentosa, pertactina, un aglutinógeno fimbrial, toxoide diftérico, toxoide tetánico, al menos un antígeno sacárido conjugado de *N. Meningitidis*, antígeno superficial de hepatitis B, polio virus inactivado (IPV) y un antígeno sacárido conjugado de *Haemophilus influenzae* b (opcionalmente conjugado con toxoide tetánico). El al menos un antígeno sacárido conjugado de *N. Meningitidis* puede ser MenC, MenY, MenA y MenW (por ejemplo, A+C, A+Y, A+W, C+Y, C+W, Y+W, A+C+Y, A+C+W, A+Y+W, C+Y+W, A+C+Y+W); opcionalmente MenC y/o MenY, opcionalmente se incluyen los cuatro. En una realización, la vacuna comprende
 50
 55

toxoides diftérico, toxoides tetánico y al menos uno de PT, FHA y PRN (una vacuna DTPa).

En una realización, se proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica.

5 La preparación de la vacuna se describe en líneas generales en Vaccine Design - The Subunit and adjuvant approach Ed Powell and Newman; Penum Press. De forma ventajosa, la vacuna de combinación de acuerdo con la invención es una vacuna pediátrica.

10 La cantidad de antígeno conjugado de polisacárido u oligosacárido en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunados típicos. Dicha cantidad variará dependiendo de los inmunógenos específicos que se empleen. En general, se espera que cada dosis comprenda 1-1000 µg de polisacárido u oligosacárido conjugado (expresada en cantidad de sacárido), preferentemente 2-100 µg, más preferentemente 4-40, 2-15, o 3-10 µg, mucho más preferentemente o exactamente 5 µg.

El contenido de antígenos proteínicos en la vacuna típicamente estará en el intervalo de 1-100 µg, preferentemente 5-50 µg, muy típicamente en el intervalo de 5-25 µg.

15 Una cantidad adecuada de antígeno para una vacuna particular puede averiguarse por estudios convencionales que implica la observación de los títulos de anticuerpo y otras respuestas en los sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o más inyecciones de refuerzo a intervalos de aproximadamente 4 semanas o más largos.

20 Las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un mamífero (preferentemente un ser humano) susceptible a infección, mediante la administración de dicha vacuna a través de vía sistémica o a la mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de la vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea.

En un aspecto adicional, se proporciona la composición inmunogénica o la vacuna como se describe previamente para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades.

25 En un aspecto adicional, se proporciona la composición inmunogénica o la vacuna como se describe previamente para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedad por *Bordetella pertussis*.

En un aspecto adicional, se proporciona un uso de la composición inmunogénica o la vacuna como se describe previamente en la prevención o tratamiento de enfermedades.

En un aspecto adicional, se proporciona un uso de la composición inmunogénica o la vacuna como se describe previamente en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades bacterianas.

30 En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de prevención o tratamiento de enfermedades, que comprende administrar la composición inmunogénica o la vacuna como se describe previamente a un paciente.

En una realización, la enfermedad es enfermedad por *Bordetella pertussis*.

35 La expresión "toxina tosferínica" se refiere a la toxina tosferínica o, como alternativa, a una forma genéticamente toxoide de toxina tosferínica. En una realización, la toxina tosferínica no es un toxoide genético de la toxina tosferínica.

40 Las expresiones "que comprende", "comprenden" y "comprende" pueden reemplazarse en todos los casos por las expresiones "que consiste en", "consisten" y "consiste". El término "comprende" significa "incluye". Por tanto, salvo que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende" se entenderán implicando la inclusión de un compuesto o composición indicado (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o etapa, o grupo de compuestos o etapas, pero no la exclusión de ningún otro compuesto, composición, etapa o grupos de los mismos. El término "consiste" significa contiene, hasta la exclusión de otros compuestos, composiciones, etapas o grupos, etc.

45 Los términos singulares "uno", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Asimismo, la palabra "o" pretende incluir "y" salvo que el contexto indique claramente lo contrario. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Debe entenderse adicionalmente que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan por motivos de descripción. Adicionalmente, las limitaciones numéricas dadas con respecto a concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno, pretenden ser aproximadas. Por tanto, cuando se indica que una concentración es al menos (por ejemplo) 200 pg, se pretende que se entienda que la concentración es de al menos aproximadamente (o "alrededor de" o "~") 200 pg.

Ejemplo 1 - Fermentación a escala de 20 l de *Bordetella pertussis* en medio químicamente definido básico

Se diseñó un medio químicamente definido (B-CDM) que estaba basado en la composición del medio de Stainer y

Scholte (SS; Stainer y Scholte, J. Gen. Microbiol. 63:211-220 (1971)), y contenía suplementos de aminoácidos, así como dimetil-β-ciclodextrina. La tabla 1 compara la composición del medio original de Stainer y Scholte (SS), una versión modificada del medio SS que contiene dimetil-β-ciclodextrina - un estimulante documentado del crecimiento de *B. pertussis* (Imazumi y col., J. Clin. Microbiol. 17:781-786 (1983)) - y otros cambios menores (SS-ciclo) y el medio químicamente definido básico (B-CDM).

Los medios SS-ciclo y B-CDM se evaluaron en las fermentaciones COQ467 y COQ365, respectivamente. Para ambas fermentaciones, se inoculó un primer precultivo en matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio fresco (B-CDM) con 10⁹ UFC de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h). El primer precultivo se usó para inocular un segundo precultivo en matraz de agitación que contenía 100 ml de medio fresco (B-CDM). El segundo precultivo se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h) y se usó para inocular dos matraces de agitación que contienen cada uno 1 l de medio fresco (SS-ciclo para COQ467 y B-CDM para COQ365; véase la composición en la tabla 1). Después del crecimiento a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 40 h (+/- 4 h), los dos matraces de agitación del tercer precultivo se combinaron. El precultivo combinado se usó para inocular un fermentador tan pronto como se detuvo el tercer precultivo.

Se usó un fermentador de 20 l (Biolafitte). Se transfirieron de forma aséptica 10 l del medio ("SS-ciclo" para COQ467 y "B-CDM" para COQ365) al fermentador. Se usaron las siguientes condiciones para establecer el nivel de oxígeno disuelto (OD) al 100 %: temperatura (35 °C) y presión superior (40 kPa ((0,4 bar)). La inoculación se consiguió por la adición de 1,5 l del precultivo combinado.

Durante la fermentación, la temperatura (35 °C), la presión superior (40 kPa ((0,4 bar)) y el caudal de aire (20 l min⁻¹) se mantuvieron constantes. Se controló la formación de espuma añadiendo automáticamente una emulsión de polidimetilsiloxano a través de un controlador de espuma. El nivel de oxígeno disuelto se estableció a un 25 % y se reguló aumentando la agitación cuando el OD caía por debajo de un 25 %. La velocidad mínima de agitación se estableció a 50 r.p.m.; la velocidad máxima de agitación se estableció a 1000 r.p.m. El pH se reguló a 7,2 por la adición de ácido fosfórico al 50 % (p/v) en COQ467 (SS-ciclo) y por la adición de ácido acético al 50 % (p/v) en COQ365 (B-CDM).

Durante la fermentación, se controló el crecimiento como la densidad óptica a 650 nm (DO_{650 nm}). Al final de la fermentación (definida como el tiempo en que disminuye el consumo de oxígeno - como consecuencia del agotamiento de glutamato - provocando una disminución en la velocidad de agitación), se determinó la producción de toxina tosferínica (PT) en el sobrenadante de cultivo por ELISA. La tabla 2 compara la producción de biomasa, el rendimiento de PT y el tiempo de generación promedio de la fermentación COQ365 (B-CDM) y la fermentación COQ467 (SS-ciclo).

Determinación de la concentración de PT. La concentración de PT en los sobrenadantes de cultivo se determinó por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los pocillos de placas de microdilución de poliestireno (4-39454; Nunc) se recubrieron durante una noche a 4 °C con 100 µl de antisuero anti-PT de cobaya policlonal purificado (dilución 1:16 000 en tampón carbonato 50 mM pH 9,6). La placa se lavó tres veces con DPBST (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca y Mg, que contiene Tween 20 al 0,1 % (v/v)). Entonces se añadieron las diluciones en serie de patrones de PT purificados y sobrenadantes de cultivo (en DPBST) a cada pocillo (100 µl por pocillo). Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente la placa se lavó tres veces con DPBST. Entonces se añadió antisuero de cabra anti-PT (dilución 1:500 en DPBST) y suero de cobaya sin anti-PT (dilución 1:1000 en DPBST) a cada pocillo (100 µl por pocillo). Después de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, la placa se lavó tres veces con DPBST. Después se añadió anticuerpo de conejo antiinmunoglobulina G de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed; dilución 1:1000 en DPBST) a cada pocillo (100 µl por pocillo). Después de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, la placa se lavó tres veces con DPBST. La placa se reveló añadiendo una solución de 10 g/l de *p*-nitrofenil-fosfato (Calbiochem) en tampón dietanolamina (dietanolamina al 9,7 % (v/v), 0,2 g/l de azida de sodio, 0,214 g/l de MgCl₂.6H₂O, pH 9,8) a cada pocillo (100 µl por pocillo). El desarrollo de color se realizó a temperatura ambiente, y se detuvo añadiendo 50 µl de NaOH 3 M a cada pocillo. Se leyó la absorbancia de los pocillos a 405 nm en una hora después de la adición de NaOH, usando un lector de microplaca Versamax (Molecular Devices).

Las condiciones de B-CDM produjeron mayores rendimientos y tasas de crecimiento que SS-ciclo. La producción de PT también aumentó significativamente. (Véase la tabla 2)

Tabla 1. Composición de medios SS y B-CDM. Todos los valores en mg/l.			
Compuesto	SS original	SS-ciclo	B-CDM
L-prolina	240	240	1040
Na-L-glutamato	10 720	10 700	20 000
L-cistina	40	0	0
L-cisteína HCl	0	40	40
NaCl	2500	2500	0
KH ₂ PO ₄	500	500	500
KCl	200	200	200
MgCl ₂ .6H ₂ O	100	100	100

(continuación)

Compuesto	SS original	SS-ciclo	B-CDM
CaCl ₂ .2H ₂ O	20	20	20
FeSO ₄ .7H ₂ O	10	10	10
Tris	6075	1820	6100
Ácido ascórbico	20	20	400
Glutatión reducido (GSH)	100	100	150
Niacina (ácido nicotínico)	4	4	4
Dimetil-β-ciclodextrina	0	1000	1000
L-alanina	0	0	312
L-ácido aspártico	0	0	436
L-ácido glutámico	0	0	1600
L-histidina	0	0	188
L-glicina	0	0	163
L-iso-leucina	0	0	288
L-leucina	0	0	484
L-lisina HCl	0	0	600
L-metionina	0	0	156
L-fenilalanina	0	0	250
L-serina	0	0	230
L-tirosina	0	0	67
L-valina	0	0	456

SS = Medio de Stainer y Scholte
 B-CDM = Medio químicamente definido básico
 Tris = Tris(hidroximetil)aminometano

Tabla 2. Parámetros principales de fermentación para *B. pertussis* cultivada en SS-ciclo o en B-CDM

	COQ365	COQ467
Medio	B-CDM	SS-ciclo
Regulación del pH	Ácido acético al 50 % (p/v)	Ácido fosfórico al 50 % (p/v)
Biomasa inicial (DO _{650 nm})*	0,149	0,138
Biomasa final (DO _{650 nm})	9,20	1,75
Producción de biomasa (DO _{650 nm})**	9,05	1,61
Tiempo de fermentación total***	41:14 h	63:00 h
Tiempo de generación promedio****	6,9 h	17,2 h
Concentración final de PT	10 mg/l	1 mg/l

*La concentración de biomasa inicial se calculó basándose en la DO_{650 nm} medida del precultivo, es decir, 1,5*DO_{precultivo}/11,5.

**La producción se calculó como la diferencia entre la DO_{650 nm} al final de la fermentación y la DO_{650 nm} al inicio de la fermentación.

***El tiempo de fermentación total se define como el tiempo en el que disminuye el consumo de oxígeno (como una consecuencia del agotamiento de glutamato), provocando una disminución en la velocidad de agitación.

****El tiempo de generación promedio se calculó del siguiente modo. En primer lugar, se calcula el número de generaciones como la relación entre la DO_{650 nm} al final de la fermentación y la DO_{650 nm} al inicio de la fermentación, convertida a log₂. El tiempo de generación promedio entonces se calcula dividiendo el tiempo de fermentación total por el número de generaciones.

5 **Ejemplo 2 - Efecto de la fuente de hierro sobre fermentación a escala de 20 l de *Bordetella pertussis* en medio químicamente definido**

Se evaluó el citrato férrico como una alternativa al sulfato ferroso en la fermentación COQ365.

Se inoculó un primer precultivo en matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio fresco (B-CDM; véase la composición en la tabla 1) con 10⁹ UFC de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h). El primer precultivo se usó para inocular un segundo precultivo en matraz de agitación que contenía 100 ml de medio fresco (B-CDM). El segundo precultivo se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h) y se usó para inocular dos matraces de agitación que contenían cada uno 1 l de medio fresco (B-CDM modificado para que contenga 10 mg/l de citrato de Fe(III) trihidrato y sin FeSO₄). Después del cultivo a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 40 h (+/- 4 h), los dos matraces de agitación del tercer precultivo se combinaron. El precultivo combinado se usó para inocular un fermentador tan pronto como se detuvo el tercer precultivo.

15 Se usó un fermentador de 20 l (Biodalitte). Se transfirieron de forma aséptica 10 l del medio (B-CDM) modificado para que contenga 10 mg/l de citrato de Fe(III) trihidrato y sin FeSO₄) al fermentador. Se usaron las siguientes

condiciones para establecer el nivel de oxígeno disuelto (OD) de un 100 %: temperatura (35 °C) y presión superior (40 kPa ((0,4 bar)). La inoculación se consiguió por la adición de 1,5 l del precultivo combinado.

5 Durante la fermentación, la temperatura (35 °C), la presión superior (40 kPa ((0,4 bar)) y el caudal de aire (20 l min⁻¹) se mantuvieron constantes. Se controló la formación de espuma añadiendo automáticamente una emulsión de polidimetilsiloxano a través de un controlador de espuma. El nivel de oxígeno disuelto se estableció a un 25 % y se reguló aumentando la agitación cuando el OD caía por debajo de un 25 %. La velocidad mínima de agitación se estableció a 50 r.p.m.; la velocidad máxima de agitación se estableció a 1000 r.p.m. El pH se reguló a 7,2 por la adición de ácido acético al 50 % (p/v).

10 Durante la fermentación, se controló el crecimiento como la densidad óptica a 650 nm (DO_{650 nm}). Al final de la fermentación (definida como el tiempo en que disminuye el consumo de oxígeno - como consecuencia del agotamiento de glutamato - provocando una disminución en la velocidad de agitación), se determinó la producción de toxina tosferínica (PT) en el sobrenadante de cultivo por ELISA. La tabla 3 compara la producción de biomasa, el rendimiento de PT y el tiempo de generación promedio de la fermentación COQ352 (B-CDM modificado para que contenga 10 mg/l de citrato de Fe(III) trihidrato y sin FeSO₄) y la fermentación COQ365 (B-CDM con FeSO₄), véase el ejemplo 1).

15 El rendimiento y la tasa de crecimiento fueron similares entre las dos condiciones, en términos de concentración máxima de biomasa, lo que indica que puede omitirse el sulfato inorgánico de la composición del medio, y que puede suministrarse hierro como Fe(III) o Fe(II) sin afectar al crecimiento de *B. pertussis*. La producción de PT también aumentó significativamente cuando se usaba citrato férrico en lugar de sulfato ferroso como fuente de hierro.

Tabla 3. Parámetros principales de fermentación para *B. pertussis* cultivada en B-CDM que contiene 10 mg/l de FeSO₄·7H₂O (COQ365) o citrato de Fe(III)·3H₂O (COQ352) como única fuente de hierro

	COQ365	COQ352
Fuente de hierro	10 mg/l de FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/l de citrato de Fe(III)·3H ₂ O
Biomasa inicial (DO_{650 nm})*	0,149	0,163
Biomasa final (DO_{650 nm})	9,20	9,75
Producción de masa (DO_{650 nm})**	9,05	9,59
Tiempo de fermentación total***	41:14 h	42:45 h
Tiempo de generación promedio****	6,9 h	7,2 h
Concentración final de PT	10 mg/l	16 mg/l

*La concentración inicial de biomasa se calculó basándose en la DO_{650 nm} medida del precultivo, es decir 1,5*DO_{precultivo}/11,5.

**La producción se calculó como la diferencia entre la DO_{650 nm} al final de la fermentación y la DO_{650 nm} al inicio de la fermentación

***El tiempo de fermentación total se define como el tiempo en el que disminuye el consumo de oxígeno (como una consecuencia del agotamiento de glutamato), provocando una disminución en la velocidad de agitación.

****El tiempo de generación promedio se calculó del siguiente modo. En primer lugar, se calcula el número de generaciones como la relación entre la DO_{650 nm} al final de la fermentación y la DO_{650 nm} al inicio de la fermentación, convertida a log₂. El tiempo de generación promedio entonces se calcula dividiendo el tiempo de fermentación total por el número de generaciones

Ejemplo 3 - Tiosulfato como fuente de azufre para el cultivo de *Bordetella pertussis*

25 Basándose en la bibliografía, el crecimiento de *B. pertussis* es posible únicamente en presencia de una fuente orgánica de azufre, que puede proporcionarse como cistina, cisteína y/o glutatión (Jebb y Tomlinson (1957) J. Gen. Microbiol. 17:59).

30 Se realizaron ensayos para determinar si las fuentes inorgánicas de azufre eran capaces de mantener el crecimiento de *B. pertussis*. Se inoculó un matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio fresco (B-CDM modificado para que contenga 0,604 g/l de niacina) con 10⁹ UFC de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 5 h). Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con NaCl al 0,9 % (p/v) y se resuspendieron en medio fresco que no contenía fuente de S (véase la composición en la tabla 4) a una DO_{650 nm} teórica de 0,5, calculada a partir de la DO_{650 nm} del cultivo antes de la recolección. Se usaron 20 µl de esta suspensión celular para inocular cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos llenado con 180 µl de medio fresco que no contenía fuente de S (véase la composición en la tabla 4). A cada uno de los pocillos, se le añadió 20 µl de una solución complementaria, que contenía uno de los compuestos enumerados en la tabla 5.

35 Solamente los pocillos interiores de la placa se usaron para los cultivos, para minimizar la evaporación y se incluyó un control, en que la solución complementaria se reemplazó con agua. La placa entonces se incubó durante 53 h a 35 °C en un lector Biotek Synergy H1 con agitación constante, y el crecimiento se controló automáticamente cada 10 minutos como la DO_{650 nm}. Los resultados del ensayo de cultivo se muestran en la tabla 5.

40 El sulfato y el sulfito inorgánico no eran capaces de mantener el crecimiento de *B. pertussis*. Sin embargo, se observó crecimiento en presencia de tiosulfato como única fuente de azufre en el medio. Estos resultados

demuestran i) que el sulfato puede omitirse del medio y ii) que no tiene que estar presente una fuente orgánica de azufre tal como cistina, cisteína o glutatión, con la condición de que haya compuestos presentes que mantengan el crecimiento, tal como tiosulfato.

Tabla 4. Composición del medio químicamente definido usado para explorar fuentes inorgánicas potenciales de azufre.

Compuesto	Concentración (mg/l)
Na-L-glutamato	5000
NaCl	4650
KH ₂ PO ₄	500
KCl	200
MgCl ₂ .6H ₂ O	100
CaCl ₂ .2H ₂ O	20
Citrato de Fe(III).3H ₂ O	10
Tris	6100
Niacina (ácido nicotínico)	4
Dimetil-β-ciclodextrina	1000

5

Tabla 5. Crecimiento de *B. pertussis* en presencia de diferentes fuentes de azufre.

Fuente de azufre	Concentración en el medio	Producción de biomasa después de 53 h*	Crecimiento **
ninguna (control negativo)	N/A	0,017	-
L-cisteína	27 mM	0,512	+
sulfato disódico	12 mM	0,015	-
sulfito disódico	12 mM	0,007	-
sulfito disódico	1 mM	0,011	-
tiosulfato disódico	12 mM	0,472	+
tiosulfato disódico	1 mM	0,227	+

*calculado como la diferencia entre la DO_{650 nm} después de 53 h y la DO_{650 nm} inicial

**+, producción de biomasa, mayor que el control negativo; -, producción de biomasa, inferior de o igual al control negativo

Ejemplo 4 - Exploración de tampones alternativos en el medio químicamente definido

Se realizó una exploración para alternativas al tampón Tris en el medio B-CDM. Se inoculó un primer precultivo en matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio fresco (B-CDM) con 10⁹ UFC de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h). El primer precultivo se usó para inocular un segundo precultivo en matraz de agitación que contenía 100 ml de medio fresco (B-CDM). El segundo precultivo se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h). Las células después se recogieron por centrifugación se lavaron en NaCl al 0,9 % y se resuspendieron en NaCl al 0,9 %. Esta suspensión celular se usó para inocular un conjunto de 9 matraces de agitación, que contenían cada uno 50 ml de medio fresco (B-CDM) o con un medio en que el tampón Tris en CDM se reemplazó con otro tampón enumerado en la tabla 6. Los matraces se incubaron a 35 °C y 150 r.p.m. durante 48 h. Se controló el crecimiento como la DO_{650 nm} después de 24 h y 48 h. Los resultados se presentan en la tabla 6.

Tanto el β-glicerofosfato como MOPS fueron capaces de mantener el crecimiento de *B. pertussis* en B-CDM. Globalmente, MOPS fue superior al β-glicerofosfato en términos de tasa de crecimiento (producción de biomasa después de 24 h) y rendimiento (producción de biomasa después de 48 h). Con ambos tampones, concentraciones inferiores produjeron un crecimiento más rápido y mayor producción final de biomasa. A la concentración más baja ensayada (2,5 g/l), MOPS mostró un efecto beneficioso sobre la tasa de crecimiento (producción de biomasa después de 24 h), en comparación con las condiciones de control usando Tris como tampón.

Tabla 6. Crecimiento de *B. pertussis* en B-CDM en presencia de diferentes tampones

Tampón	Concentración del tampón	Producción relativa de biomasa después de 24 h*	Producción relativa de biomasa después de 48 h*
Tris	6,1 g/l	100 %	100 %
B-glicerofosfato	2,5 g/l	88 %	79 %
B-glicerofosfato	5,0 g/l	89 %	67 %
B-glicerofosfato	10,0 g/l	68 %	59 %
B-glicerofosfato	20,0 g/l	46 %	45 %
MOPS	2,5 g/l	114 %	91 %
MOPS	5,0 g/l	85 %	88 %
MOPS	10,0 g/l	111 %	84 %

(continuación)

Tabla 6. Crecimiento de *B. pertussis* en B-CDM en presencia de diferentes tampones

Tampón	Concentración del tampón	Producción relativa de biomasa después de 24 h*	Producción relativa de biomasa después de 48 h*
MOPS	20,0 g/l	81 %	76 %

*La producción de biomasa se expresa respecto a las condiciones de control (tampón Tris) al mismo tiempo de incubación

Ejemplo 5 - Impacto de la adición de Cu^{2+} sobre fermentación a escala de 20 l de *Bordetella pertussis* en medio químicamente definido

5 Se evaluó el efecto de la suplementación con Cu^{2+} en la fermentación COQ348.

Se inoculó un primer precultivo en matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio fresco (B-CDM; véase la composición en la tabla 1) con 10^9 UFC de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h). El primer precultivo se usó para inocular un segundo precultivo en matraz de agitación que contenía 100 ml de medio fresco (B-CDM). El segundo precultivo se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h) y se usó para inocular dos matraces de agitación que contenían cada uno 1 l de medio fresco (B-CDM suplementado con 1,28 mg/l (7,5 μM) de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Después del cultivo a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 40 h (+/- 4 h), los dos matraces de agitación del tercer precultivo se combinaron. El precultivo combinado se usó para inocular un fermentador tan pronto como se detuvo el tercer precultivo. Se usó un fermentador de 20 l (Biolafitte). Se transfirieron de forma aséptica 10 l de medio (B-CDM suplementado con 1,28 mg/l (7,5 μM) de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al fermentador. Se usaron las siguientes condiciones para establecer el nivel de oxígeno disuelto (OD) al 100 %: temperatura (35 °C) y presión superior (40 kPa ((0,4 bar)). La inoculación se consiguió por la adición de 1,5 l del precultivo combinado. Durante la fermentación, la temperatura (35 °C), la presión superior (40 kPa ((0,4 bar)) y el caudal de aire (20 l min^{-1}) se mantuvieron constantes. Se controló la formación de espuma añadiendo automáticamente una emulsión de polidimetilsiloxano a través de un controlador de espuma. El nivel de oxígeno disuelto se estableció a un 25 % y se reguló aumentando la agitación cuando el OD caía por debajo de un 25 %. La velocidad mínima de agitación se estableció a 50 r.p.m.; la velocidad máxima de agitación se estableció a 1000 r.p.m. El pH se reguló a 7,2 por la adición de ácido acético al 50 % (p/v).

25 Durante la fermentación, se controló el crecimiento como la densidad óptica a 650 nm ($\text{DO}_{650 \text{ nm}}$). Al final de la fermentación (definida como el tiempo en que disminuye el consumo de oxígeno - como consecuencia del agotamiento de glutamato - provocando una disminución en la velocidad de agitación), se determinó la producción de toxina tosferínica (PT) en el sobrenadante de cultivo por ELISA. La tabla 7 compara la producción de biomasa, el rendimiento de PT y el tiempo de generación promedio de la fermentación COQ348 (B-CDM con Cu complementario) y la fermentación COQ365 (B-CDM sin Cu complementario; véase el ejemplo 1).

30 La adición de CuCl_2 al medio químicamente definido produjo un aumento significativo en la producción de biomasa. La tasa de crecimiento y el rendimiento de PT también se vieron afectados positivamente.

Tabla 7. Parámetros principales de fermentación para *B. pertussis* cultivada en B-CDM con o sin Cu^{2+} complementario

	COQ365	COQ348
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ añadido	0 mg/l	1,28 mg/l
Biomasa inicial ($\text{DO}_{650 \text{ nm}}$)*	0,149	0,183
Biomasa final ($\text{DO}_{650 \text{ nm}}$)	9,20	10,90
Producción de biomasa ($\text{DO}_{650 \text{ nm}}$**	9,05	10,72
Tiempo de fermentación total***	41:14 h	37:00 h
Tiempo de generación promedio****	6,9 h	6,3 h
Concentración final de PT	10 mg/l	11 mg/l

*La concentración inicial de biomasa se calculó basándose en la $\text{DO}_{650 \text{ nm}}$ medida del precultivo, es decir $1,5 \cdot \text{DO}_{\text{precultivo}} / 11,5$.

**La producción se calculó como la diferencia entre la $\text{DO}_{650 \text{ nm}}$ al final de la fermentación y la $\text{DO}_{650 \text{ nm}}$ al inicio de la fermentación

***El tiempo de fermentación total se define como el tiempo en el que disminuye el consumo de oxígeno (como una consecuencia del agotamiento de glutamato), provocando una disminución en la velocidad de agitación.

****El tiempo de generación promedio se calculó del siguiente modo. En primer lugar, se calcula el número de generaciones como la relación entre la $\text{DO}_{650 \text{ nm}}$ al final de la fermentación y la $\text{DO}_{650 \text{ nm}}$ al inicio de la fermentación, convertida a \log_2 . El tiempo de generación promedio entonces se calcula dividiendo el tiempo de fermentación total por el número de generaciones

Ejemplo 6 - Fermentación a escala de 20 l de *Bordetella pertussis* en medio químicamente definido mejorado

Se evaluó una formulación mejorada del CDM básico (B-CDM) en la fermentación COQ426.

Se inoculó un primer precultivo en matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio fresco (B-CDM; véase la composición en la tabla 1) con 10^9 UFC de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h). El primer precultivo se usó para inocular un segundo precultivo en matraz de agitación que contenía 100 ml de medio fresco (B-CDM). El segundo precultivo se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h) y se usó para inocular dos matraces de agitación que contenían cada uno 1 l de medio fresco (CDM mejorado; véase la composición en la tabla 8). Después del cultivo a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 40 h (+/- 4 h), los dos matraces de agitación del tercer precultivo se combinaron. El precultivo combinado se usó para inocular un fermentador tan pronto como se detuvo el tercer precultivo. Se usó un fermentador de 20 l (BiolaFitte). Se transfirieron de forma aséptica 10 l de medio al fermentador. Se usaron las siguientes condiciones para establecer el nivel de oxígeno disuelto (OD) al 100 %: temperatura (35 °C) y presión superior (40 kPa ((0,4 bar)). La inoculación se consiguió por la adición de 1,5 l del precultivo combinado. Durante la fermentación, la temperatura (35 °C), la presión superior (40 kPa ((0,4 bar)) y el caudal de aire (20 l min⁻¹) se mantuvieron constantes. Se controló la formación de espuma añadiendo automáticamente una emulsión de polidimetilsiloxano a través de un controlador de espuma. El nivel de oxígeno disuelto se estableció a un 25 % y se reguló aumentando la agitación cuando el OD caía por debajo de un 25 %. La velocidad mínima de agitación se estableció a 50 r.p.m.; la velocidad máxima de agitación se estableció a 1000 r.p.m. El pH se reguló a 7,2 por la adición de ácido fosfórico al 50 % (p/v).

Durante la fermentación, se controló el crecimiento como la densidad óptica a 650 nm (DO_{650 nm}). Al final de la fermentación (definida como el tiempo en que disminuye el consumo de oxígeno - como consecuencia del agotamiento de glutamato - provocando una disminución en la velocidad de agitación), se determinó la producción de toxina tosferínica (PT) en el sobrenadante de cultivo por ELISA.

La tabla 9 compara la producción de biomasa, el rendimiento de PT y el tiempo de generación promedio de la fermentación COQ426 (CDM mejorado) y la fermentación COQ365 (B-CDM; véase el ejemplo 1).

Las condiciones de CDM mejorado produjeron un rendimiento de cultivo ligeramente inferior en comparación con el CDM básico. La tasa de crecimiento también disminuyó ligeramente. Sin embargo, la producción de PT se aumentó drásticamente (+170 %).

Tabla 8. Composición de B-CDM y CDM mejorado. Todos los valores en mg/l.

Compuesto	B-CDM	CDM mejorado
L-prolina	1040	882
Na-L-glutamato	20 000	18 677
L-cisteína HCl	40	4
NaCl	2500	73
KH ₂ PO ₄	500	500
KCl	200	200
MgCl ₂ .6H ₂ O	100	1000
CaCl ₂ .2H ₂ O	20	20
FeSO ₄ .7H ₂ O	10	0
Citrato de Fe(III).3H ₂ O	0	20
Tris	6100	0
CuCl ₂ .2H ₂ O	0	1,28
CoCl ₂ .6H ₂ O	0	0,42
ZnCl ₂	0	10
MOPS	0	2500
Ácido ascórbico	400	623
Glutación reducido (GSH)	150	233
Niacina (ácido nicotínico)	4	6
Dimetil-β-ciclodextrina	1000	1000
Acetato de Na	0	409
L-alanina	312	304
L-ácido aspártico	436	524
L-ácido glutámico	1600	3475
L-histidina	188	32
L-glicina	163	149
L-isoleucina	288	244
L-leucina	484	438
L-lisina HCl	600	393
L-metionina	156	116
L-fenilalanina	250	234
L-serina	230	187
L-tirosina	67	34
L-valina	456	399
Tiamina HCl	0	10
Biotina	0	0,2

(continuación)

Compuesto	B-CDM	CDM mejorado
Riboflavina	0	0,3
Pantotenato de calcio	0	4

Tabla 9. Parámetros principales de fermentación para *B. pertussis* cultivada en B-CDM o en CDM mejorado

	COQ365	COQ426
Medio	B-CDM	CDM mejorado
Biomasa inicial (DO_{650 nm})*	0,149	0,143
Biomasa final (DO_{650 nm})	9,20	8,30
Medio	B-CDM	CDM mejorado
Producción de biomasa (DO_{650 nm})**	9,05	8,15
Tiempo de fermentación total***	41:14 h	46:30 h
Tiempo de generación promedio****	6,9 h	7,9 h
Concentración final de PT	10 mg/l	27 mg/l

*La concentración inicial de biomasa se calculó basándose en la DO_{650 nm} medida del precultivo, es decir 1,5*DO_{precultivo}/11,5.

**La producción se calculó como la diferencia entre la DO_{650 nm} al final de la fermentación y la DO_{650 nm} al inicio de la fermentación

***El tiempo de fermentación total se define como el tiempo en el que disminuye el consumo de oxígeno (como una consecuencia del agotamiento de glutamato), provocando una disminución en la velocidad de agitación.

****El tiempo de generación promedio se calculó del siguiente modo. En primer lugar, se calcula el número de generaciones como la relación entre la DO_{650 nm} al final de la fermentación y la DO_{650 nm} al inicio de la fermentación, convertida a log₂. El tiempo de generación promedio entonces se calcula dividiendo el tiempo de fermentación total por el número de generaciones

5 **Ejemplo 7 - Fermentación a escala de 20 l de *Bordetella pertussis* en medio químicamente definido mejorado que contiene tiosulfato como fuente de azufre**

Se evaluó una formulación modificada del CDM mejorado (ejemplo 6) en la fermentación COQ454. En este medio, se reemplazó la cisteína por tiosulfato como fuente de azufre.

Se inoculó un primer precultivo en matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio fresco (B-CDM; véase la composición en la tabla 1) con 10⁹ UFC de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h). El primer precultivo se usó para inocular un segundo precultivo en matraz de agitación que contenía 100 ml de medio fresco (B-CDM). El segundo precultivo se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 1 h) y se usó para inocular dos matraces de agitación que contenían cada uno 1 l de medio fresco (CDM mejorado con tiosulfato; véase la composición en la tabla 10). Después del cultivo a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 40 h (+/- 4 h), los dos matraces de agitación del tercer precultivo se combinaron. El precultivo combinado se usó para inocular un fermentador tan pronto como se detuvo el tercer precultivo. Se usó un fermentador de 20 l (Biolafitte). Se transfirieron de forma aséptica 10 l de medio al fermentador. Se usaron las siguientes condiciones para establecer el nivel de oxígeno disuelto (OD) al 100 %: temperatura (35 °C) y presión superior (40 kPa ((0,4 bar)). La inoculación se consiguió por la adición de 1,5 l del precultivo combinado.

20 Durante la fermentación, la temperatura (35 °C), la presión superior (40 kPa ((0,4 bar)) y el caudal de aire (20 l min⁻¹) se mantuvieron constantes. Se controló la formación de espuma añadiendo automáticamente una emulsión de polidimetilsiloxano a través de un controlador de espuma. El nivel de oxígeno disuelto se estableció a un 25 % y se reguló aumentando la agitación cuando el OD caía por debajo de un 25 %. La velocidad mínima de agitación se estableció a 50 r.p.m.; la velocidad máxima de agitación se estableció a 1000 r.p.m. El pH se reguló a 7,2 por la adición de ácido fosfórico al 50 % (p/v).

25 Durante la fermentación, se controló el crecimiento como la densidad óptica a 650 nm (DO_{650 nm}). Al final de la fermentación (definida como el tiempo en que disminuye el consumo de oxígeno - como consecuencia del agotamiento de glutamato - provocando una disminución en la velocidad de agitación), se determinó la producción de toxina tosferínica (PT) en el sobrenadante de cultivo por ELISA. La tabla 11 compara la producción de biomasa, el rendimiento de PT y el tiempo de generación promedio de la fermentación COQ454 (CDM mejorado con tiosulfato), la fermentación COQ426 (CDM mejorado; véase el ejemplo 6) y la fermentación COQ365 (B-CDM; véase el ejemplo 1).

35 La producción de biomasa en "CDM mejorado con tiosulfato" fue ligeramente inferior en comparación con el CDM básico, pero produjo una mayor tasa de crecimiento y una mayor producción de PT (+310 %). En comparación con el "CDM mejorado", el medio "CDM mejorado con tiosulfato" produjo una producción de biomasa similar, mayor tasa de crecimiento y mayor producción de PT (+52 %).

Tabla 10. Composición de B-CDM, CDM mejorado y CDM mejorado con tiosulfato. Todos los valores en mg/l.

Compuesto	B-CDM	CDM mejorado	CDM mejorado con tiosulfato
L-prolina	1040	882	882
Na-L-glutamato	20 000	18 677	18 677
L-cisteína HCl	40	4	0
Tiosulfato sódico	0	0	2,83
NaCl	2500	73	73
KH ₂ P0 ₄	500	500	500
KCl	200	200	200
MgCl ₂ .6H ₂ O	100	1000	1000
CaCl ₂ .2H ₂ O	20	20	20
FeSO ₄ .7H ₂ O	10	0	0
Citrato de Fe(III).3H ₂ O	0	20	20
Tris	6100	0	0
CuCl ₂ .2H ₂ O	0	1,28	1,28
CoCl ₂ .6H ₂ O	0	0,42	0,42
ZnCl ₂	0	10	10
MOPS	0	2500	2500
Ácido ascórbico	400	623	623
Glutación reducido (GSH)	150	233	233
Niacina (ácido nicotínico)	4	6	6
Dimetil-β-ciclodextrina	1000	1000	1000
Acetato de Na	0	409	409
L-alanina	312	304	304
L-ácido aspártico	436	524	524
L-ácido glutámico	1600	3475	3475
L-histidina	188	32	32
L-glicina	163	149	149
L-isoleucina	288	244	244
L-leucina	484	438	438
L-lisina HCl	600	393	393
L-metionina	156	116	116
L-fenilalanina	250	234	234
L-serina	230	187	187
L-tirosina	67	34	34
L-valina	456	399	399
Tiamina HCl	0	10	10
Biotina	0	0,2	0,2
Riboflavina	0	0,3	0,3
Pantotenato de calcio	0	4	4

Tabla 11. Parámetros principales de fermentación para *B. pertussis* cultivada en B-CDM, en CDM mejorado o en CDM mejorado con tiosulfato

Medio	COQ365	COQ426	COQ454
	B-CDM	CDM mejorado	CDM mejorado con tiosulfato
Biomasa inicial (DO_{650 nm})*	0,149	0,143	0,157
Biomasa final (DO_{650 nm})	9,20	8,30	8,30
Producción de biomasa (DO_{650 nm})**	9,05	8,15	8,14
Tiempo de fermentación total***	41:14 h	46:30 h	41:15 h
Tiempo de generación promedio****	6,9 h	7,9 h	7,2 h
Concentración final de PT	10 mg/l	27 mg/l	41 mg/l

*La concentración de biomasa inicial se calculó basándose en la DO_{650 nm} medida del precultivo, es decir, $1,5 \cdot DO_{\text{precultivo}} / 11,5$.

**La producción se calculó como la diferencia entre la DO_{650 nm} al final de la fermentación y la DO_{650 nm} al inicio de la fermentación.

***El tiempo de fermentación total se define como el tiempo en el que disminuye el consumo de oxígeno (como una consecuencia del agotamiento de glutamato), provocando una disminución en la velocidad de agitación.

****El tiempo de generación promedio se calculó del siguiente modo. En primer lugar, se calcula el número de generaciones como la relación entre la DO_{650 nm} al final de la fermentación y la DO_{650 nm} al inicio de la fermentación, convertida a log₂. El tiempo de generación promedio entonces se calcula dividiendo el tiempo de fermentación total por el número de generaciones.

Ejemplo 8 - Crecimiento de *B. pertussis* en medio mínimo que contiene solamente un aminoácido

- Se realizaron ensayos para determinar si el crecimiento de *B. pertussis* es posible en medios mínimos que contienen un único aminoácido como única fuente de carbono y nitrógeno. Se inoculó un matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio fresco (B-CDM que contiene 0,604 g/l de niacina) con 10^9 UFC de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 5 h). Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con NaCl al 0,9 % (p/v) y se resuspendieron en medio fresco (véase la composición de la tabla 12) a una $DO_{650\text{ nm}}$ teórica de 0,5, calculada a partir de $DO_{650\text{ nm}}$ del cultivo antes de la recogida. Se usó 1 ml de esta suspensión celular para inocular matraces de agitación que contenían 30 ml del medio de la tabla 12, suplementado con un único aminoácido (L-cisteína 125 mM, L-prolina 125 mM, L-glutamato 125 mM, L-glutamina 125 mM, L-aspartato 30 mM, L-asparagina 125 mM, L-serina 125 mM o L-alanina 125 mM) como una fuente de C y N y tiosulfato 0,25 mM como fuente de S (excepto para la suplementación con L-Cys, donde no se añadió tiosulfato). Se usó el mismo medio con cloruro de amonio (0,25 mM) y tiosulfato (0,25 mM), pero sin aminoácidos, como control negativo. Los matraces de agitación entonces se incubaron durante aproximadamente 10 días a 35 °C en agitación constante (150 r.p.m.). El crecimiento se controló como la $DO_{650\text{ nm}}$. Los resultados del ensayo de crecimiento se muestran en la figura 1.
- Todos los aminoácidos ensayados fueron capaces de mantener el crecimiento de *B. pertussis* como única fuente de C y N, siempre que hubiera una fuente de S presente (tiosulfato). Cuando se usó L-Cys como aminoácido, no se requirió fuente adicional de azufre.

Tabla 12. Composición del medio químicamente definido usado para ensayar el crecimiento en aminoácidos individuales.

Compuesto	Concentración (mg/l)
NaCl	7148
KH ₂ PO ₄	500
KCl	200
MgCl ₂ .6H ₂ O	1000
CaCl ₂ .2H ₂ O	100
Citrato de Fe(III).3H ₂ O	20
MOPS	2500
Niacina (ácido nicotínico)	6
Dimetil-β-ciclodextrina	1000
CuCl ₂ .2H ₂ O	1,28
CoCl ₂ .gH ₂ O	0,42
ZnCl ₂	10
Biotina	0,2
Riboflavina	0,3
Pantotenato de calcio	4

Ejemplo 9 - Crecimiento de *B. pertussis* en medio mínimo que no contiene aminoácidos

- Se realizaron ensayos para determinar si el crecimiento de *B. pertussis* es posible en medio mínimo en que se proporciona nitrógeno únicamente como amoníaco inorgánico, azufre como tiosulfato y carbono como un ácido orgánico. Se inoculó un matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio fresco (B-CDM que contiene 0,604 g/l de niacina) con 10^9 UFC de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (+/- 1 °C) y 150 r.p.m. durante 24 h (+/- 5 h). Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con NaCl al 0,9 % (p/v) y se resuspendieron en medio fresco (véase la composición de la tabla 13) a una $DO_{650\text{ nm}}$ teórica de 0,5, calculada a partir de $DO_{650\text{ nm}}$ del cultivo antes de la recogida. Se usó 1 ml de esta suspensión celular para inocular matraces de agitación que contenían 30 ml del medio de la tabla 13, suplementado con un único ácido orgánico (citrato 100 mM, L-lactato 100 mM, acetato 100 mM, piruvato 100 mM, fumarato 100 mM o succinato 100 mM). Se usó el mismo medio sin suplemento de ácido orgánico como control negativo. Los matraces de agitación entonces se incubaron durante aproximadamente 10 días a 35 °C en agitación constante (150 r.p.m.). El crecimiento se controló como la $DO_{650\text{ nm}}$. Los resultados del ensayo de crecimiento se muestran en la figura 2.

Todos los ácidos orgánicos ensayados fueron capaces de mantener el crecimiento de *B. pertussis* como única fuente de C.

Tabla 13. Composición del medio químicamente definido usado para ensayar el crecimiento en ausencia de aminoácidos.

Compuesto	Concentración (mg/l)
KH ₂ PO ₄	500
KCl	200
MgCl ₂ .6H ₂ O	1000
CaCl ₂ .2H ₂ O	100
Citrato de Fe(III).3H ₂ O	20
MOPS	2500
Niacina (ácido nicotínico)	6

(continuación)

Tabla 13. Composición del medio químicamente definido usado para ensayar el crecimiento en ausencia de aminoácidos.	
Compuesto	Concentración (mg/l)
Dimetil- β -ciclodextrina	1000
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,28
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{gH}_2\text{O}$	0,42
ZnCl_2	10
Biotina	0,2
Riboflavina	0,3
Pantotenato de calcio	4
Cloruro de amonio	1337
Tiosulfato de sodio	62

REIVINDICACIONES

1. Un medio químicamente definido para el cultivo a escala industrial de una especie de *Bordetella*, que comprende:
- (i) un componente de hierro seleccionado del grupo que consiste en Fe(II) en complejo con un compuesto orgánico y Fe(III) en complejo con un compuesto orgánico, en el que el compuesto orgánico se selecciona de hemo, hemoglobina, mioglobina, transferrina, ferritina, lactoferrina, enterobactina, aerobactina, alcaligina, coprógeno, ferricromo, desferrioxamina, ferroxamina, hidroxamato, citrato y dihidroxibenzoilserina;
- (ii) ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS);
- (iii) dimetil-β-ciclodextrina; y
- (iv) un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en aspartato a una concentración 1000 μM o mayor, glicina a una concentración 1000 μM o mayor, metionina a una concentración 500 μM o mayor y leucina a una concentración 1500 μM o mayor,
- en el que dicho medio químicamente definido no comprende FeSO₄ o tris(hidroximetil)aminometano.
2. El medio químicamente definido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente
- (vi) 2 μM o más, 3 μM o más, 4 μM o más, 5 μM o más o 6 μM o más de cobre;
- (vii) 2 μM o más, 5 μM o más, 10 μM o más, 50 μM o más, 100 μM o más o 400 μM o más de magnesio;
- (x) un aditivo seleccionado del grupo que consiste en zinc, cobalto, tiamina, riboflavina y pantotenato;
- (xi) un aditivo seleccionado del grupo que consiste en 0,4 μM o más de biotina, 50 μM o más de calcio, 15 μM o más de niacina y 25 μM o más de ácido ascórbico.
3. El medio químicamente definido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una fuente inorgánica de azufre seleccionada del grupo que consiste en tiosulfato, tritronato, tetratronato, peroxodisulfato, sulfuro y sulfito, y en el que dicho medio no comprende una fuente orgánica de azufre.
4. El medio químicamente definido de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente un componente seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) más de 0,005 mM, más de 0,006 mM, más de 0,007 mM, más de 0,008 mM, más de 0,010 mM, más de 0,050 mM, más de 0,100 mM, aproximadamente 0,120 mM o aproximadamente 0,011 mM de tiosulfato;
- (ii) más de 0,003 mM, más de 0,004 mM, más de 0,005 mM, más de 0,008 mM, más de 0,010 mM, más de 0,020 mM, más de 0,050 mM, aproximadamente 0,007 mM o aproximadamente 0,080 mM de tritronato;
- (iii) más de 0,002 mM, más de 0,003 mM, más de 0,004 mM, más de 0,005 mM, más de 0,025 mM, más de 0,050 mM, aproximadamente 0,060 mM o aproximadamente 0,0006 mM de tetratronato;
- (iv) más de 0,005 mM, más de 0,006 mM, más de 0,007 mM, más de 0,008 mM, más de 0,010 mM, más de 0,050 mM, más de 0,100 mM, aproximadamente 0,120 mM o aproximadamente 0,011 mM de peroxodisulfato;
- (v) más de 0,010 mM, más de 0,012 mM, más de 0,014 mM, más de 0,016 mM, más de 0,020 mM, más de 0,100 mM, más de 0,200 mM, aproximadamente 0,240 mM o aproximadamente 0,022 mM de sulfuro; y
- (vi) más de 0,010 mM, más de 0,012 mM, más de 0,014 mM, más de 0,016 mM, más de 0,020 mM, más de 0,100 mM, más de 0,200 mM, aproximadamente 0,240 mM o aproximadamente 0,022 mM de sulfito.
5. El medio químicamente definido de la reivindicación 1, que comprende MOPS a una concentración de más de 2 mM, más de 5 mM, más de 7 mM, más de 9 mM, más de 10 mM o más de 11 mM.
6. El medio químicamente definido de la reivindicación 2, que comprende cobre en forma de cloruro de cobre.
7. El medio químicamente definido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una fuente inorgánica de nitrógeno seleccionada de una sal de amonio y cloruro de amonio.
8. El medio químicamente definido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glutamato, prolina, citrato, lactato, acetato, piruvato, fumarato y succinato.
9. El medio químicamente definido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende adicionalmente un componente seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) más de 0,1 μM, más de 1 μM, más de 50 μM, más de 100 μM, más de 200 μM, más de 300 μM, más de 400 μM, más de 500 μM, más de 600 μM o más de 700 μM de zinc;
- (ii) más de 0,05 μM, más de 0,10 μM, o más de 0,15 μM de cobalto;
- (iii) más de 100 μM, más de 120 μM o más de 140 μM de calcio;
- (iv) más de 20 μM, más de 30 μM o más de 35 μM de niacina;
- (v) más de 50 μM, más de 75 μM, más de 100 μM, más de 1000 μM, más de 2000 μM o más de 3000 μM de ácido ascórbico;
- (vi) más de 0,1 μM, más de 1 μM, más de 5 μM, más de 10 μM o más de 25 μM de tiamina;
- (vii) más de 0,4 μM, más de 0,5 μM, más de 0,6 μM o más de 0,8 μM de biotina;

- (viii) más de 0,1 μM , más de 0,2 μM , más de 0,3 μM , más de 0,4 μM , más de 0,5 μM , más de 0,6 μM o más de 0,8 μM de riboflavina; y
 (ix) más de 0,1 μM , más de 0,5 μM , más de 1,0 μM , más de 2,0 μM , más de 5,0 μM , o más de 7,0 μM de pantotenato.
- 5 10. El medio químicamente definido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) glutamato a una concentración de más de 50 mM, más de 75 mM, más de 90 mM, más de 100 mM o más de 110 mM;
 10 (ii) alanina a una concentración de más de 1000 μM , más de 1500 μM , más de 2000 μM , más de 2500 μM o más de 3000 μM ;
 (iii) fenilalanina a una concentración de más de 500 μM , más de 750 μM , más de 1000 μM , más de 1250 μM o más de 1400 μM ;
 (iv) histidina a una concentración de más de 50 μM , más de 100 μM , más de 150 μM o más de 200 μM ;
 15 (v) isoleucina a una concentración de más de 500 μM , más de 1000 μM , más de 1500 μM o más de 1750 μM ;
 (vi) lisina a una concentración de más de 500 μM , más de 1000 μM , más de 1500 μM o más de 2000 μM ;
 (vii) prolina a una concentración de más de 1000 μM , más de 3000 μM , más de 4000 μM , más de 5000 μM , más de 6000 μM o más de 7000 μM ;
 (viii) serina a una concentración de más de 500 μM , más de 1000 μM , más de 1500 μM o más de 1700 μM ;
 20 (ix) valina a una concentración de más de 1000 μM , más de 2000 μM , más de 2500 μM o más de 3000 μM ; y
 (x) tirosina a una concentración de más de 25 μM , más de 50 μM , más de 75 μM , más de 100 μM , más de 150 μM o más de 175 μM .
11. El medio químicamente definido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente glutatión a una concentración de más de 100 μM , más de 200 μM , más de 400 μM , más de 500 μM , más de 600 μM o más de 700 μM .
- 25 12. El medio químicamente definido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un componente seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) cloruro a una concentración de menos de 45 mM, menos de 40 mM, menos de 35 mM, menos de 30 mM, menos de 25 mM, menos de 20 mM, entre 10 mM y 20 mM o aproximadamente 16 mM;
 30 (ii) acetato a una concentración de más de 1 mM, más de 2 mM, más de 3 mM, más de 4 mM, entre 4 mM y 6 mM o aproximadamente 5 mM; y
 (iii) potasio a una concentración de más de 1 mM, más de 2 mM, más de 3 mM, más de 4 mM, más de 5 mM, más de 6 mM, entre 5,5 mM y 7 mM o aproximadamente 6,5 mM.
13. Un procedimiento de fermentación para cultivar una especie de *Bordetella* en un medio químicamente definido (CDM), que comprende
- 35 (a) inocular un medio químicamente definido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes con una especie de *Bordetella*; y
 (b) mantener la especie de *Bordetella* en el medio químicamente definido durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la acumulación de biomasa.

FIGURA 1

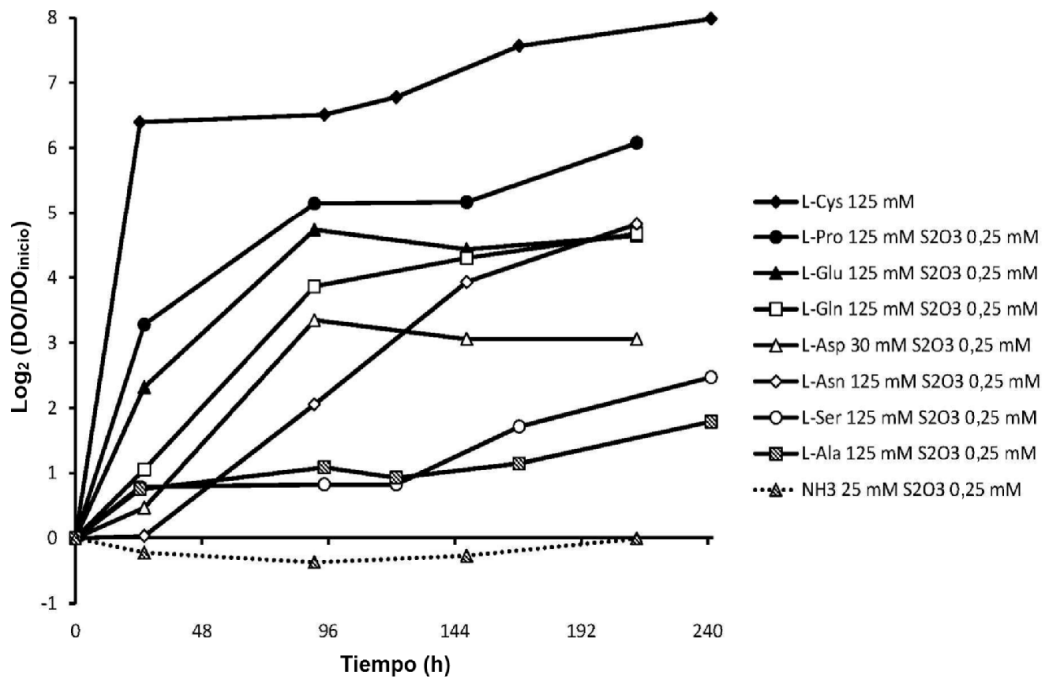


FIGURA 2

