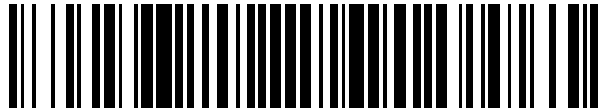


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 261**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2013 PCT/EP2013/051743**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113729**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2013 E 13701484 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2809343**

54 Título: **Procedimiento de fermentación**

30 Prioridad:

**01.02.2012 US 201261593541 P**

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

**06.02.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DEHOTTAY, PHILIPPE MARC HELENE y  
GOFFIN, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 653 261 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fermentación

**Antecedentes**

- 5 La bacteria *Bordetella pertussis* es el agente causante de la tos ferina, una enfermedad respiratoria que puede ser grave en bebés y niños pequeños. El curso clínico de la enfermedad se caracteriza por paroxismos de tos rápida seguidos de esfuerzo inspiratorio, a menudo asociado con un sonido característico de "silbido". En los casos graves, la privación de oxígeno puede causar daño cerebral; sin embargo, la complicación más común es la neumonía secundaria.
- 10 Normalmente, se considera que la tos ferina es causada por *B. pertussis*, pero, en ocasiones, se ha aislado *B. parapertussis* de pacientes con los signos y síntomas típicos de tos ferina. La infección por *B. parapertussis* es de menor frecuencia que por *B. Pertussis*, estando del 5 al 10 % de la tos ferina asociada con *B. parapertussis* (Mertsola (1985) *Eur J Clin Microbiol* 4; 123; Lautrop (1971) *Lancet* 1(7711) 1195-1198). *B. parapertussis* se asocia con síntomas clínicos leves que, combinados con su reactividad serológica cruzada con *B. pertussis*, hacen que *B. parapertussis* sea difícil de diagnosticar.
- 15 La primera generación de vacunas contra *B. pertussis* eran vacunas de células enteras, compuestas de bacterias muertas enteras. Estas se introdujeron en muchos países en los años 50 y 60 del siglo pasado, y tuvieron éxito en la reducción de la incidencia de la tos ferina. Un problema con las vacunas de *B. pertussis* de células enteras es el alto nivel de reatogenicidad asociado con las mismas. Las vacunas acelulares que contienen proteínas purificadas de *B. pertussis* son menos reactogénicas y se han adoptado para los programas de vacunación en muchos países. Las vacunas acelulares que normalmente contienen toxina *pertussis* (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y, con bastante frecuencia, pertactina (PRN), son ampliamente usadas y brindan protección eficaz contra la gravedad de la tos ferina.
- 20

**Breve resumen****Introducción**

- 25 En un primer aspecto, se proporciona un procedimiento de fermentación que comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar una muestra de bacterias de una especie de *Bordetella*;
  - b) incubar la muestra de bacterias de una especie de *Bordetella* en un primer medio de cultivo en al menos una condición de modulación de bvg (genes de virulencia de *Bordetella*) durante al menos 5 generaciones, produciendo de ese modo un cultivo maduro;
  - 30 c) incubar el cultivo maduro en un segundo medio de cultivo en ausencia de al menos una condición de modulación de bvg;
- en el que la etapa c) tiene lugar tras la etapa b).
- En un segundo aspecto, se proporciona un procedimiento de fermentación que comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar una muestra de bacterias de una especie de *Bordetella* en un primer medio de cultivo que comprende al menos un modulador de bvg;
  - 35 b) incubar la muestra en el primer medio de cultivo que comprende el al menos un modulador de bvg durante al menos 5 generaciones, produciendo de ese modo un cultivo maduro;
  - c) incubar el cultivo maduro en un segundo medio de cultivo en ausencia de al menos un modulador de bvg; en el que la etapa c) tiene lugar después de la etapa b).
- 40 En un tercer aspecto, se proporciona un procedimiento de fermentación que comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar una muestra de bacterias de una especie de *Bordetella* en un primer medio de cultivo;
  - b) incubar la muestra en el primer medio de cultivo que comprende el al menos un modulador de bvg durante al menos 5 generaciones, produciendo de ese modo un cultivo maduro;
  - 45 c) incubar el cultivo maduro en un segundo medio de cultivo en ausencia de al menos un modulador de bvg;
- en el que la etapa c) tiene lugar después de la etapa b).
- En un cuarto aspecto, se proporciona un factor de virulencia que puede obtenerse mediante el procedimiento.
- En un quinto aspecto, se proporciona un factor de virulencia obtenido mediante el procedimiento.
- En un sexto aspecto, se proporciona una composición inmunogénica que comprende el factor de virulencia y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 En un séptimo aspecto, se proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica.

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

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

- 5 En un décimo aspecto, se proporciona un procedimiento de prevención o tratamiento de una enfermedad que comprende administrar la composición inmunogénica o la vacuna a un paciente.

### **Breve descripción de las figuras**

10 La FIG. 1. Gráfico que representa el crecimiento del genotipo  $bvg^-$  y el genotipo  $bvg^+$  de las células de *Bordetella pertussis* frente al tiempo de fermentación. El crecimiento de las células  $bvg^-$  se representa mediante la línea que conecta los puntos en forma de diamante; el crecimiento de las células  $bvg^+$  se representa mediante la línea que conecta los puntos en forma de cuadrado.

15 FIG. 2. Gráfico que representa la proporción de células de *Bordetella pertussis* que son de genotipo  $bvg^-$  frente al número de generaciones con niveles variables del modulador de  $bvg$  niacina. La línea que conecta los puntos en forma de cuadrado representa la proporción de las células que son  $bvg^-$  cuando se usan 0,004 g/l de niacina; la línea que conecta los puntos en forma de círculo representa la proporción de células que son de genotipo  $bvg^-$  cuando se usan 0,021 g/l de niacina; la línea que conecta los puntos en forma de diamante representa la proporción de células que son  $bvg^-$  cuando se usan 0,113 g/l de niacina; y la línea que conecta los puntos en forma de triángulo muestra la proporción de células que son  $bvg^-$  cuando se usan 0,604 g/l de niacina.

20 FIG.3 Gráfico que representa el perfil de oxígeno disuelto para las dos fermentaciones descritas en el Ejemplo 6. La línea superior describe el perfil de oxígeno disuelto cuando la fermentación fue con suficiente oxígeno y la línea inferior describe el perfil de oxígeno disuelto cuando la fermentación fue con oxígeno limitado.

25 FIG.4. Gráfico que representa la proporción de células de genotipo  $bvg^-$  en 4 cultivos fermentados en presencia de 0,004 g/l de niacina frente al número de generaciones. Los puntos de forma de cuadrado representan un cultivo con una proporción inicial del 95 % de células de genotipo  $bvg^-$  al comienzo de la fermentación. Los puntos en forma de círculo representan un cultivo con una proporción inicial de 75 % de células de genotipo  $bvg^-$  al comienzo de la fermentación. Los puntos en fórmula de triángulo representan un cultivo con una proporción inicial del 25 % de células de genotipo  $bvg^-$  al comienzo de la fermentación. Los puntos en forma de diamante representan un cultivo con una proporción inicial del 5 % de células de genotipo  $bvg^-$  al comienzo de la fermentación.

30 FIG.5. Gráfico que representa la proporción de células de genotipo  $bvg^-$  en 4 cultivos fermentados en presencia de 0,6 g/l de niacina frente al número de generaciones. Los puntos de forma de cuadrado representan un cultivo con una proporción inicial del 95 % de células de genotipo  $bvg^-$  al comienzo de la fermentación. Los puntos en forma de círculo representan un cultivo con una proporción inicial de 75 % de células de genotipo  $bvg^-$  al comienzo de la fermentación. Los puntos en fórmula de triángulo representan un cultivo con una proporción inicial del 25 % de células de genotipo  $bvg^-$  al comienzo de la fermentación. Los puntos en forma de diamante representan un cultivo con una proporción inicial del 5 % de células de genotipo  $bvg^-$  al comienzo de la fermentación.

### **Descripción detallada**

#### **INFORMACIÓN GENERAL**

40 Los inventores han encontrado sorprendentemente que se pueden obtener mayores rendimientos de factores de virulencia de *Pertussis* cultivando las especies de *Pertussis* como se describe en el presente documento en presencia de al menos una condición de modulación de  $bvg$ , aunque, en general, se considera que las condiciones de modulación de  $bvg$  inhiben la expresión de factores de virulencia de las especies de *Pertussis*.

45 *B. pertussis* puede mostrar diferentes fenotipos en términos de virulencia. Estos fenotipos se denominan Bvg<sup>+</sup> y Bvg<sup>-</sup> (Bvg indica la expresión o ausencia de la misma de los genes de virulencia de *Bordetella*). El fenotipo Bvg<sup>+</sup> es un fenotipo virulento caracterizado por una alta expresión de factores de virulencia tales como la toxina *pertussis* (PT), hemaglutinina filamentososa (FHA) y pertactina (PRN), pero también otras toxinas y adhesinas. El fenotipo Bvg<sup>-</sup> es un fenotipo avirulento, que no expresa factores de virulencia tales como PT u otras toxinas/adhesinas.

50 La transición entre estados fenotípicos está bajo el control del sistema regulador de dos componentes BvgAS, que detecta directa o indirectamente condiciones ambientales tales como temperatura, sulfato, ácido nicotínico, y regula la expresión de genes bajo su control. En ciertas condiciones, el sensor proteico BvgS se autofosforila, y a través de una cascada de fosforilación, se transfiere el grupo fosforilo finalmente al regulador de respuesta BvgA. BvgA~P activo (fosforilado) se une a la región promotora de los genes del factor de virulencia y modula su nivel de transcripción. Dicho sistema de regulación produce la integración de señales ambientales a nivel de un solo regulador de la transcripción central, BvgAS. Como resultado de ello, *B. pertussis* regula la expresión de factores de virulencia a nivel de la transcripción en respuesta a las condiciones ambientales.

Los genes bajo el control de la transcripción del sistema BvgAS forman el regulón Bvg.

Los compuestos que inhiben la producción de factores de virulencia de *Pertussis* suelen actuar modulando el locus genético de bvg y, por lo tanto, pueden denominarse moduladores de bvg. De forma similar, las condiciones que favorecen el fenotipo Bvg<sup>+</sup> pueden denominarse condiciones de modulación de bvg.

5 En general, las células de *Bordetella* pueden mutar entre los genotipos Bvg<sup>+</sup> y Bvg<sup>-</sup>. En particular, durante el cultivo, las células de *Bordetella* pueden mutar al genotipo Bvg<sup>-</sup> a través de mutaciones espontáneas. Las células de genotipo Bvg<sup>-</sup> tienen el fenotipo Bvg<sup>-</sup>, esto significa que producen menores cantidades de factores de virulencia (y, por lo tanto, no son deseables en un procedimiento de fermentación destinado a producir altos niveles de factores de virulencia). El hecho de que las células de genotipo Bvg<sup>-</sup> produzcan niveles más bajos de factores de virulencia  
10 proporciona a las células de genotipo Bvg<sup>-</sup> una ventaja frente a las de genotipo Bvg<sup>+</sup>, es decir, se gasta una menor cantidad de energía en la producción de factores de virulencia, lo que les permite crecer más rápido. Por esta razón, cuando se cultivan células de *Bordetella*, la proporción de células que tienen el genotipo Bvg<sup>-</sup> tiende a aumentar con el tiempo (lo que se conoce como absorción de Bvg<sup>-</sup>). Los presentes inventores han demostrado que se puede mantener una mayor proporción de células en el genotipo Bvg<sup>+</sup> mediante la adición de una condición de modulación de Bvg. Estas condiciones, como se ha explicado anteriormente, favorecen el estado fenotípico de Bvg<sup>-</sup> y la presencia de dicha condición permite que *Bordetella* exprese el fenotipo Bvg<sup>-</sup> (mientras que mantiene su genotipo Bvg<sup>+</sup>). Esto elimina la ventaja competitiva de las células de genotipo Bvg<sup>-</sup>; lo que significa que la proporción de células de genotipo Bvg<sup>-</sup> en el cultivo final es menor. Durante la fase de crecimiento de la fermentación, *Bordetella* puede cultivarse en estas condiciones de modulación de bvg hasta que se alcanza una masa deseada de células de genotipo Bvg<sup>+</sup>. Una vez que la masa de células de *Bordetella* es suficientemente alta, se puede eliminar la condición de modulación de bvg permitiendo que las células de genotipo Bvg<sup>+</sup> vuelvan al fenotipo Bvg<sup>+</sup> y expresen niveles elevados de los factores de virulencia.

Para evitar dudas, cualquier referencia a "células Bvg<sup>+</sup>" o "células bvg<sup>+</sup>" se refiere a células que tienen el genotipo Bvg<sup>+</sup>, de manera similar, cualquier referencia a "células Bvg<sup>-</sup>" o "células bvg<sup>-</sup>" se refiere a células que tienen el genotipo Bvg<sup>-</sup>.  
25

Por lo tanto, los presentes inventores han encontrado que se puede mejorar un procedimiento de fermentación de una especie de *Bordetella* añadiendo una etapa de cultivo de una especie de *Bordetella* en al menos una condición de modulación de bvg. Esto garantiza que *Bordetella* pueda crecer hasta una gran masa mientras mantiene una alta proporción de células de *Bordetella* en el genotipo Bvg<sup>+</sup>, y cuando se alcanza suficiente masa celular, la condición de modulación de bvg puede eliminarse, dejando un cultivo que contenga una alta proporción de células de genotipo Bvg<sup>+</sup> que expresen factores de virulencia a un alto nivel. Esto conduce a un aumento del rendimiento de los factores de virulencia producidos a partir de las especies de *Bordetella*. Esto se produce a pesar del hecho de que, en general, las condiciones de modulación de bvg como se definen en el presente documento conducen a la reducción de la expresión de los factores de virulencia.  
30

Por consiguiente, en una primera realización, se proporciona un procedimiento de fermentación que comprende las siguientes etapas:  
35

- a) proporcionar una muestra de bacterias de una especie de *Bordetella*;
- b) incubar la muestra de bacterias de una especie de *Bordetella* en un primer medio de cultivo en al menos una condición de modulación de bvg (genes de virulencia de *Bordetella*) durante al menos 5 generaciones, produciendo de ese modo un cultivo maduro;
- 40 c) incubar el cultivo maduro en un segundo medio de cultivo en ausencia de al menos una condición de modulación de bvg;

en el que la etapa c) tiene lugar tras la etapa b).

La etapa b) describe una etapa en la que está presente una condición de modulación de bvg y el cultivo de *Bordetella* está creciendo para proporcionar suficiente masa celular para una alta expresión mientras se conserva el genotipo Bvg<sup>+</sup> (reduciendo la absorción de células Bvg<sup>-</sup>). La especie *Bordetella* se debe transferir en condiciones en ausencia de la condición moduladora de bvg para permitir la expresión de factores de virulencia (etapa c). La especie *Bordetella* puede exponerse a la condición de modulación de bvg al principio del procedimiento de fermentación, por ejemplo, la condición moduladora de bvg puede usarse durante una etapa de creación de un banco de células. Como alternativa, la condición de modulación de bvg se puede añadir en una etapa posterior, tal como durante el cultivo previo.  
45  
50

La expresión "procedimiento de fermentación" se refiere a un procedimiento a escala industrial (por ejemplo, 20 litros o más) para cultivar células y/o expresar una proteína a partir de esas células. En este caso, el procedimiento de la divulgación se puede usar para expresar altas concentraciones de factores de virulencia de la especie de *Bordetella*. Como alternativa, se prevén otras aplicaciones, por ejemplo, el procedimiento puede usarse para cultivar las especies de *Bordetella* para su uso en la fabricación de vacunas de *Bordetella* de células enteras. Opcionalmente, el procedimiento de fermentación es un procedimiento de producción de una o más toxinas de las especies de *Bordetella*. En una realización, el procedimiento es un procedimiento de conservación de la especie de *Bordetella* en  
55

un genotipo bvg<sup>+</sup> en cultivo industrial. En una realización, el procedimiento es un procedimiento de prevención de la pérdida de expresión de factores de virulencia en el crecimiento en el cultivo industrial. En una realización, el procedimiento es un procedimiento de potenciación de la producción de factores de virulencia de la especie de *Bordetella*.

- 5 La expresión "especie de *Bordetella*" se refiere a una especie del género *Bordetella* que incluye, pero sin limitación, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*, preferentemente *Bordetella pertussis*.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Las definiciones de términos comunes en Biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, "Genes V", publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y col. (eds.), "The Encyclopedia of Molecular Biology", publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), "Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference", publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

10 Los términos "un", "una", "el" y "ella" en singular incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, el término "o" tiene la intención de incluir a "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Además, debe entenderse 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 para la descripción. Además, las limitaciones numéricas dadas con respecto a las concentraciones o los niveles de una sustancia, tal como un antígeno, pretenden ser aproximadas. Por lo tanto, cuando se indica que una concentración es de al menos (por ejemplo) 200 pg, se pretende que se entienda que la concentración es de al menos aproximadamente (o "~") 200 pg.

15 Aunque, en la práctica o el ensayo de la presente divulgación, se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen, los procedimientos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". Por lo tanto, a menos que el contexto requiera lo contrario, el término "comprende" y las variaciones tales como "comprenden" y "que comprende" implican la inclusión de un compuesto o de una composición indicados (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o una etapa, o grupo de compuestos o de etapas, pero no la exclusión de ningún otro compuesto, composición, etapa o grupo de los mismos. Los inventores pretenden que la expresión "que comprende", y los términos "comprenden" y "comprende", en el presente documento, sean opcionalmente sustituibles con las expresiones "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

20 La abreviatura, "e.g." deriva del Latín *exempli gratia*, y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por lo tanto, la abreviatura "e.g." es sinónimo de la expresión "por ejemplo".

#### ETAPA a)

25 La etapa a) describe la fase del procedimiento de fermentación antes de exponer la especie de *Bordetella* a la condición de modulación de bvg; esto se refiere, en general, a una etapa de proporcionar una muestra de una cantidad de bacteria de *Bordetella* viva. El medio que se inocula puede ser un medio sólido o líquido. En una realización, el procedimiento comprende además una etapa i) de seleccionar una muestra de la bacteria de una especie de *Bordetella*, en la que la muestra de la bacteria es predominantemente de genotipo Bvg<sup>+</sup> y en la que la etapa i) tiene lugar antes de la etapa a). Opcionalmente, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 98 %, entre el 85 % y el 100 %, entre el 90 % y el 100 %, entre el 95 % y el 100 % o entre el 98 % y el 100 % de la muestra de la bacteria es de genotipo Bvg<sup>+</sup> en la etapa a).

30 El procedimiento de la divulgación reduce la absorción de células de genotipo Bvg<sup>-</sup> y, por lo tanto, es ventajoso comenzar el procedimiento usando una muestra de la especie de *Bordetella* que sea predominantemente de genotipo Bvg<sup>+</sup>.

La muestra usada en la etapa a) se puede obtener de cualquier fuente, por ejemplo, la muestra puede seleccionarse de una estirpe celular almacenada en un laboratorio o puede obtenerse de una institución tal como la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo).

#### ETAPA b)

35 La etapa b) describe la exposición de la muestra de la etapa a) a al menos una condición de modulación de bvg, y dicha condición puede ser cualquier condición que reduzca la absorción de células de genotipo Bvg<sup>-</sup> o preserve el genotipo Bvg<sup>+</sup>. Sin quedar vinculados por teoría alguna, cuando se incuba *Bordetella* en cultivo (por ejemplo, en un laboratorio o en una instalación de fabricación), la proporción de células que son de genotipo Bvg<sup>-</sup> tiende a aumentar con el tiempo (varias generaciones). Esto se puede deber a una ventaja selectiva como resultado de la no expresión de factores de virulencia que no tienen ningún beneficio para *Bordetella* en cultivo. Por esta razón, la incubación de *Bordetella* en presencia de una condición que reduzca la expresión de factores de virulencia reduce la ventaja selectiva de la conversión al genotipo Bvg<sup>-</sup>, reduciendo así la absorción de células de genotipo Bvg<sup>-</sup> en cultivo. De

este modo, se mantiene la población de genotipo Bvg<sup>+</sup> en la muestra.

Por esta razón, las condiciones de modulación de bvg incluyen condiciones que reducen la expresión de factores de virulencia. Una "condición de modulación de bvg" es, opcionalmente, una condición que previene un aumento en la proporción de células de genotipo Bvg<sup>-</sup> en más de 25 veces, 15 veces, 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4, 3 veces, 2 veces, 1,5 veces, después del crecimiento en cultivo durante 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más generaciones. Una generación se refiere al tiempo que tarda en duplicarse el número de bacterias en un cultivo, que es de aproximadamente 4 horas para *Bordetella Pertussis*; sin embargo, esto varía dependiendo de las condiciones en las cuales se cultiva *Bordetella pertussis*. Es posible determinar si una posible condición de modulación de bvg es, de hecho, una condición de modulación de bvg cultivando células bajo la posible condición de modulación de bvg durante al menos 8 generaciones, y sembrando las células en medio de Bordet-Gengou (que contiene sangre al 5 %) (Bordet J. y Gengou O., "Le Microbe de la coqueluche", Annales de l'Institut Pasteur 1906; 20:731-41)), para obtener colonias individuales. En el medio BG, las células del genotipo Bvg<sup>+</sup> aparecen como colonias hemolíticas, compactas, en forma de cúpula, mientras que las células del genotipo Bvg<sup>-</sup> aparecen como colonias planas, no hemolíticas. Los resultados del presente ensayo se deben comparar con las células que se cultivaron en las mismas condiciones, pero sin el uso de la posible condición de modulación de bvg. Si la proporción de células de genotipo Bvg<sup>-</sup> es significativamente menor que la proporción de células de genotipo Bvg<sup>-</sup> en la muestra de referencia, la condición es una condición de modulación de bvg.

Se puede usar cualquier condición de modulación de bvg en el contexto de la presente divulgación; los ejemplos particulares incluyen condiciones de pH alto o bajo, condiciones de bajo nivel de oxígeno, condiciones de baja temperatura o la presencia de un modulador de bvg.

La expresión "modulador de bvg" se refiere a un compuesto a una concentración adecuada (una concentración moduladora) que reduce la absorción de células de genotipo Bvg<sup>-</sup>. La concentración del modulador de bvg no es necesariamente constante a lo largo de la etapa b), sino que permanece en una concentración de modulación a lo largo de la etapa b). Por ejemplo, la niacina a diversas concentraciones que incluyen 0,604 g/l es un modulador de bvg. En general, los compuestos que inhiben la expresión de toxinas, tales como la toxina *Pertussis*, de *Bordetella pertussis* son moduladores de bvg.

La etapa b) se refiere a cualquier fase de un procedimiento de fermentación en el que está presente al menos una condición de modulación de bvg, por ejemplo, esta etapa puede incluir la creación de un banco de células y/o precultivo y/o fermentación a gran escala. La expresión "creación de un banco de células" es evidente para el experto en la materia. En general, la creación de un banco de células implica preparar una cepa de bacterias para el almacenamiento y puede implicar tomar un clon de bacterias (que puede ser el inóculo al que se ha hecho referencia anteriormente) e incubar el clon de bacterias hasta que se obtenga un pequeño volumen de bacterias. Las muestras de este volumen de bacterias se pueden preparar, congelar de forma ultrarrápida y conservar en un congelador. En general, el precultivo implica tomar un cultivo inicial y permitir que las células se reproduzcan para alcanzar una concentración suficiente de células para la siguiente etapa en el procedimiento, por ejemplo, la expresión de factores de virulencia. Esto puede implicar varias incubaciones pequeñas, por ejemplo, se puede cultivar una pequeña muestra de *Bordetella* en un matraz de agitación pequeño, y los contenidos de este matraz de agitación pequeño se pueden transferir a un matraz de agitación mayor. Esto puede incluso implicar una etapa en el que las células crezcan en un pequeño fermentador.

Opcionalmente, una fase de precultivo puede comprender la producción de aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 generaciones de *Pertussis*. Opcionalmente, la fase de precultivo es de entre 1 hora y 200 horas, entre 2 horas y 150 horas, entre 5 horas y 125 horas, entre 10 horas y 100 horas, entre 20 horas y 50, mayor o igual a 1 hora, mayor o igual a 2 horas, mayor o igual a 5 horas, mayor o igual a 10 horas, mayor o igual a 20 horas, mayor o igual a 50 horas, menor o igual a 200 horas, menor o igual a 150 horas, menor o igual a 125 horas, menor o igual a 100 horas, o menor o igual a 50 horas. Opcionalmente, la fase de precultivo se lleva a cabo en un recipiente de menos de 10 litros, menos de 8 litros, menos de 5 litros, entre 1 y 10 litros, entre 1 y 8 litros, entre 1 y 5 litros, entre 1 y 3 litros, entre 2 y 8 litros, entre 2 y 5 litros o entre 2 y 3 litros.

Durante la etapa b), la *Bordetella* se cultiva en un "primer medio de cultivo", que se refiere a un entorno que comprende la condición de modulación de bvg. Por ejemplo, este medio de cultivo puede referirse a un entorno privado de oxígeno o a un entorno de pH alto. La expresión "medio de cultivo" también puede referirse a un medio que comprende al menos un modulador de bvg. El primer medio de cultivo puede, por lo tanto, referirse a un primer medio de cultivo que comprende al menos un modulador de bvg y el segundo medio de cultivo puede referirse a un segundo medio de cultivo que no comprende al menos un modulador de bvg. Opcionalmente, la al menos una condición de modulación de bvg comprende la presencia de al menos un modulador de bvg en el primer medio de cultivo. Opcionalmente, el primer y el segundo medio de cultivo son iguales. Opcionalmente, el primer y el segundo medio de cultivo son diferentes. Opcionalmente, el segundo medio de cultivo comprende medio de Stainer Scholte. Como alternativa, el segundo medio de cultivo comprende medio de Stainer Scholte modificado. La composición del medio de Stainer Scholte se describe en Cohen and Wheeler, American Journal of Public Health (1946) 36: 371-376. Un medio es un medio de Stainer Scholte modificado si contiene esencialmente los mismos componentes del medio a esencialmente las mismas concentraciones; sin embargo, que contiene la modificación de la concentración de entre 1 y 5 de los componentes del medio, que carece entre 1 y 3 de los componentes del medio o que contiene

entre 1 y 20 componentes medios adicionales.

La etapa b) da lugar a la producción de un cultivo maduro que se puede usar para la etapa c). La expresión "cultivo maduro" se refiere a un inóculo que se ha cultivado en presencia de al menos una condición de modulación de bvg durante al menos 5 generaciones.

- 5 Opcionalmente, al menos parte de la etapa b) se lleva a cabo en un recipiente de entre 50 ml y 25 litros, entre 50 ml y 20 litros, entre 50 ml y 15 litros, entre 50 ml y 10 litros, entre 50 ml y 5 litros, inferior o igual a 25 litros, inferior o igual a 20 litros, inferior o igual a 15 litros, inferior o igual a 10 litros, inferior o igual a 5 litros, superior o igual a 25 ml, superior o igual a 50 ml, superior o igual a 100 ml, superior o igual a 250 ml, superior o igual a 500 ml, superior o igual a 1 litro, o superior o igual a 2 litros en volumen.
- 10 Opcionalmente, la etapa c) se lleva a cabo en un fermentador. El volumen de trabajo del fermentador puede ser de entre 5 y 10.000 litros, entre 10 y 5000 litros, entre 20 y 2000 litros, 50 litros y 1.000 litros, superior o igual a 5 litros, superior o igual a 10 litros, superior o igual que 15 litros, superior o igual que 20 litros, superior o igual a 25 litros, superior o igual a 50 litros, superior o igual a 100 litros, inferior o igual a 10.000 litros, inferior o igual a 5.000 litros o inferior o igual a 2.500 litros.
- 15 Opcionalmente, la etapa b) comprende una fase de creación de un banco de células. Como alternativa, la creación de un banco de células se produce entre la etapa a) y la etapa b).
- En una realización, la etapa b) comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 o 17 generaciones. Opcionalmente, la etapa b) comprende menos de 40, menos de 35, menos de 30, menos de 25, menos de 20 o menos de 18 generaciones. Opcionalmente, la etapa b) es inferior o igual a 200 horas, inferior o igual a 150 horas, inferior o igual a 100 horas, inferior o igual a 80 horas, inferior o igual a 70 horas, inferior o igual a 60 horas, inferior o igual a 55 horas, superior o igual a 10 horas, superior o igual a 15 horas, superior o igual a 20 horas, superior o igual a 25 horas, superior o igual a 30 horas, superior o igual a 35 horas, superior o igual a 40 horas, entre 10 horas y 200 horas, entre 15 horas y 150 horas, entre 20 horas y 100 horas, entre 25 horas y 80 horas o entre 30 horas y 70 horas.
- 20
- 25 En una realización, la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de entre 20 °C y 45 °C, entre 22 °C y 43 °C, entre 24 °C y 42 °C, entre 28 °C y 42 °C, entre 30 °C y 42 °C, o entre 32 °C y 40 °C.
- En una realización, la etapa b) se lleva a cabo a un pH de entre 6,5 y 7,8, entre 6,7 y 7,5, entre 6,9 y 7,3 o entre 7,0 y 7,2.
- 30 En una realización, la etapa b) se lleva a cabo en presencia de entre el 10 % y el 50 %, entre el 15 % y el 45 %, entre el 20 % y el 35 % de oxígeno disuelto.

#### ETAPA c)

- La etapa c) se refiere a una etapa en la que se cultiva *Bordetella* en ausencia de al menos una condición de modulación de bvg de la etapa b). En general, se elimina la presencia de la condición de modulación de bvg de la etapa b), por ejemplo, si la condición de modulación de bvg es una temperatura inferior a 28 °C, la incubación del cultivo maduro en ausencia de al menos una condición de modulación de bvg implica incubar el cultivo maduro a una temperatura superior a 28 °C. De manera similar, si la al menos una condición de modulación de bvg es la presencia de un modulador de bvg, la incubación del cultivo maduro en ausencia de al menos una condición de modulación de bvg implica incubar el cultivo maduro en ausencia del modulador de bvg. Por ejemplo, si la niacina es el modulador de bvg, esta se puede añadir al primer medio de cultivo para la etapa b) y reducirse la concentración (de modo que sea inferior a la concentración de modulación) en el segundo medio de cultivo para la etapa c).
- 35
- 40 En general, la etapa c) no necesita producirse directamente después de la etapa b), puede haber un espacio de varios días o semanas, por ejemplo, en la situación en la que la creación de un banco de células se lleva a cabo semanas o meses antes de que las células se usen realmente en una fermentación. Opcionalmente, la etapa c) se produce directamente después de la etapa b).
- 45 La etapa b) puede producirse en presencia de más de una condición de modulación de bvg. En este caso, al menos una, preferentemente la totalidad, de estas condiciones de modulación de bvg deberían eliminarse durante la etapa c).
- La especie de *Bordetella*, en general, expresa un nivel más alto de factores de virulencia en la etapa c) que se pueden purificar para su uso en una composición inmunogénica o vacuna. Al menos parte de la etapa c) se lleva a cabo, en general, en un fermentador, aunque la etapa c) se puede llevar a cabo en cualquier recipiente apropiado. En una realización, el volumen de trabajo del fermentador es de entre 5 y 10.000 litros, entre 10 y 5000 litros, entre 20 y 2.000 litros, entre 50 litros y 1.000 litros, superior o igual a 5 litros, superior o igual a 10 litros, superior o igual a 15 litros, superior o igual a 20 litros, superior o igual a 25 litros, superior o igual a 50 litros, superior o igual a 100 litros, inferior o igual a 10.000 litros, inferior o igual a 5.000 litros, o inferior o igual a 2.500 litros.
- 50

- La etapa c) puede ser un procedimiento alimentado por lotes. En un procedimiento alimentado por lotes, se añade de manera continua nuevo medio al fermentador. En una realización, la etapa c) es inferior o igual a 100 horas, inferior o igual a 80 horas, inferior o igual a 60 horas, inferior o igual a 40 horas, superior o igual a 5 horas, superior o igual a 10 horas, superior o igual a 15 horas, superior o igual a 25 horas, de entre 5 horas y 100 horas, entre 10 horas y 80 horas, entre 15 horas y 60 horas, entre 25 horas y 40 horas.
- Opcionalmente inferior o igual al 20 %, inferior o igual al 18 %, inferior o igual al 15 %, inferior o igual al 12 %, inferior o igual al 10 %, inferior o igual al 8 %, inferior a o igual a 6 %, inferior o igual a 5 %, inferior o igual a 4 %, inferior o igual al 3 %, inferior o igual al 1 %, superior o igual al 2 %, superior o igual al 3 %, entre el 2 % y el 10 %, entre el 2 % y el 8 %, entre el 2 % y el 12 %, entre el 2 % y el 10 %, entre el 2 % y el 6 % o entre el 2 % y el 5 % del cultivo maduro es bvg al comienzo de la etapa c) o al final de la etapa b).
- La etapa c) se puede llevar a cabo a una temperatura superior o igual a 32 °C, superior o igual a 33 °C, superior o igual a 34 °C, superior o igual a 35 °C, inferior o igual a 45 °C, inferior o igual a 42 °C, inferior o igual a 40 °C, inferior o igual a 38 °C, entre 32 °C y 45 °C, entre 33 °C y 42 °C, entre 34 °C y 40 °C o entre 35 °C y 38 °C.
- Opcionalmente, en la etapa c), se usa un rompedor mecánico de espuma.
- En una realización, la etapa c) es inferior o igual a 200 horas, inferior o igual a 150 horas, 100 horas, inferior o igual a 80 horas, inferior o igual a 60 horas, inferior o igual a 40 horas, superior o igual a 5 horas, superior o igual a 10 horas, superior o igual a 15 horas, superior o igual a 25 horas, entre 5 horas y 200 horas, entre 10 horas y 150 horas, entre 15 horas y 100 horas o entre 25 horas y 80 horas. En una realización, la etapa c) comprende incubar el cultivo maduro en un segundo medio de cultivo durante al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20 generaciones o menos de 200, 175, 150 o 125 generaciones.
- En una realización, la etapa c) se lleva a cabo a un pH de entre 6,5 y 7,8, entre 6,8 y 7,5, entre 6,9 y 7,3 o entre 7,0 y 7,2.
- En una realización, la etapa c) se lleva a cabo en presencia de entre el 10 % y el 50 %, entre el 15 % y el 45 %, entre el 20 % y el 35 % de oxígeno disuelto.
- 25 CONDICIONES DE MODULACIÓN DE BVG**
- En el contexto de la presente invención, se puede usar cualquier condición de modulación de bvg. A continuación, se proporcionan algunos ejemplos.
- En una realización, la al menos una condición de modulación de bvg comprende la incubación de la muestra a una temperatura inferior o igual a 28 °C, inferior o igual a 27 °C, inferior o igual a 26 °C, inferior o igual a 25 °C, superior o igual a 18 °C, superior o igual a 20 °C, superior o igual a 22 °C, superior o igual a 24 °C, entre 0 °C y 28 °C, entre 0 °C y 27 °C, entre 0 °C y 26 °C o entre 0 °C y 25 °C.
- En una realización, la al menos una condición de modulación de bvg comprende incubar la muestra a una concentración de oxígeno inferior o igual a 0,100, inferior o igual a 0,090, inferior o igual a 0,080, inferior o igual a 0,070, superior o igual a 0,001, superior o igual a 0,050, superior o igual a 0,010, superior o igual a 0,015, superior o igual a 0,020, superior o igual a 0,025, entre 0,010 y 0,100, entre 0,010 y 0,090, entre 0,010 y 0,080 o entre 0,010 y 0,070 mmol de O<sub>2</sub> disuelto por litro.
- En una realización, la al menos una condición de modulación de bvg comprende incubar la muestra a un pH básico. Opcionalmente, el pH es un pH superior o igual a 7,2, superior o igual a 7,3, superior o igual a 7,4, inferior o igual a 9,5, inferior o igual a 9,0, inferior o igual a 8,5, inferior o igual a 8,0, entre 7,2 y 8,0, entre 7,3 y 8,0 o entre 7,4 y 8,0.
- En una realización, la al menos una condición de modulación de bvg comprende incubar la muestra a un pH ácido. Opcionalmente, el pH ácido es un pH inferior o igual a 7,0, inferior o igual a 6,8, inferior o igual a 6,6, inferior o igual a 6,4, inferior o igual a 6,2, superior o igual a 4,5, superior o igual a 5,0, superior o igual a 5,5, superior o igual a 6,0, superior o igual a 6,5, entre 5,0 y 7,0, entre 5,0 y 6,9 o entre 5,0 y 6,8.
- En una realización, el al menos un modulador de bvg comprende niacina. Opcionalmente, el modulador de bvg comprende niacina a una concentración superior o igual a 0,004 g/l, superior o igual a 0,01 g/l, superior o igual a 0,1 g/l, superior o igual a 0,2 g/l, superior igual o inferior a 0,3 g/l, superior o igual a 0,004 g/l, inferior o igual a 400 g/l, inferior o igual a 300 g/l, inferior o igual a 200 g/l, inferior o igual a 100 g/l, inferior o igual a 50 g/l, inferior o igual a 5 g/l, entre 0,004 g/l y 500 g/l, entre 0,01 g/l y 400g/l, entre 0,1g/l y 300 g/l, entre 0,4 g/l y 200 g/l o entre 0,2 g/l y 100 g/l.
- En una realización, el al menos un modulador de bvg comprende una sal inorgánica seleccionada del grupo que consiste en una sal de magnesio, una sal de sulfato, una sal de fosfato y una sal de carbonato. Opcionalmente, la sal inorgánica es una sal de sulfato. La sal de sulfato puede estar a una concentración superior o igual a 0,04 mM, superior o igual a 0,08 mM, superior o igual a 1 mM, superior o igual a 4 mM, superior o igual a 8 mM, superior o igual a 10 mM, inferior o igual a 50 mM, inferior o igual a 40 mM, inferior o igual a 35 mM, inferior o igual a 30 mM,



## ES 2 653 261 T3

inferior o igual a 25 mM, inferior o igual a 20 mM, inferior a 15 mM, entre 0,04 mM y 40 mM, entre 0,08 mM y 1 mM, entre 4 mM y 40 mM, entre 8 mM y 10 mM, entre 15 mM y 40 mM, o entre 17 mM y 40 mM.

5 Opcionalmente, la sal inorgánica es una sal de fosfato. La sal de fosfato puede estar a una concentración superior o igual a 0,4 g/l, superior o igual a 0,5 g/l, superior o igual a 0,6 g/l, superior o igual a 0,7 g/l, inferior o igual a 20 g/l, inferior o igual a 18 g/l, inferior o igual a 16 g/l, inferior o igual a 10 g/l, inferior o igual a 5 g/l, inferior o igual a 2 g/l, entre 0,4 g/l y 20 g/l, entre 0,5 g/l y 20 g/l, entre 0,6 g/l y 20 g/l o entre 0,7 g/l y 20 g/l.

10 En una realización, el al menos un modulador de bvg comprende sacarosa. La sacarosa puede estar a una concentración superior o igual a 10 mM, superior o igual a 15 mM, superior o igual a 20 mM, superior o igual a 25 mM, superior o igual a 30 mM, superior o igual a 35 mM, superior o igual a 40 mM, inferior o igual a 100 mM, inferior o igual a 90 mM, inferior o igual a 85 mM, inferior o igual a 80 mM, inferior o igual a 75 mM, inferior o igual a 70 mM, inferior o igual a 50 mM, entre 10 mM y 100 mM, entre 15 mM y 95 mM, entre 20 mM y 90 mM, entre 25 mM y 85 mM o entre 30 mM y 80 mM.

15 Opcionalmente, el al menos un modulador de bvg comprende un componente de medio complejo seleccionado del grupo que consiste en extracto de levadura, agar de soja triptico, fosfato de triptosa, peptonas e infusiones de tejido de cerebro y corazón, y peptonas. El componente de medio complejo puede estar a una concentración superior o igual a 1 g/l, superior o igual a 3 g/l, superior o igual a 5 g/l, superior o igual a 10 g/l, inferior o igual que a 40 g/l, inferior o igual a 35 g/l, inferior o igual a 30 g/l, inferior o igual a 25 g/l, inferior o igual a 20 g/l, entre 1 g/l y 40 g/l, entre 3 g/l y 40 g/l, entre 5 g/l y 40 g/l, o entre 10 g/l y 40 g/l.

20 Opcionalmente, el al menos un modulador de bvg comprende prolina. La prolina puede estar a una concentración superior o igual a 0,25 g/l, superior o igual a 0,4 g/l, superior o igual a 0,5 g/l, superior o igual a 0,6 g/l, superior o igual a 1 g/l, superior o igual a 2 g/l, superior o igual a 3 g/l, superior o igual a 4 g/l, inferior o igual a 50 g/l, inferior o igual a 30 g/l, inferior o igual a 25 g/l, inferior o igual a 20 g/l, inferior o igual a 15 g/l, entre 0,25 g/l y 50 g/l, entre 0,4 g/l y 50 g/l, entre 0,5 g/l y 50 g/l, entre 0,6 g/l y 50 g/l, entre 1 g/l y 50 g/l, entre 2 g/l y 50 g/l, entre 3 g/l y 50 g/l, o entre 4 g/l y 50 g/l.

25 En una realización, el al menos un modulador de bvg comprende iones de sodio a una concentración superior a 100 mM, superior a 120 mM, superior a 150 mM, superior a 175 mM, superior a 200 mM, superior a 250 mM, inferior a 2.000 mM, inferior a 1.000 mM, inferior a 800 mM, entre 100 mM y 2.000 mM, entre 120 mM y 2.000 mM, entre 150 mM y 2000 mM, entre 175 mM y 2.000 mM, o entre 200 mM y 2.000 mM.

30 En una realización, el modulador de bvg comprende un agente antiespumante. Opcionalmente, el agente antiespumante es polidimetilsiloxano. El polidimetilsiloxano puede estar a una concentración superior o igual a 5 g/l, superior o igual a 10 g/l, superior o igual a 15 g/l, superior o igual a 20 g/l, superior o igual a 25 g/l, superior o igual a 30 g/l, superior o igual a 40 g/l, inferior o igual a 250 g/l, inferior o igual a 230 g/l, inferior o igual a 200 g/l, inferior o igual a 180 g/l, inferior o igual a 150 g/l, entre 5 g/l y 250 g/l, entre 10 g/l y 230 g/l, entre 15 g/l y 200 g/l, entre 20 g/l y 180 g/l, entre 25 g/l y 150 g/l o entre 25 g/l y 150 g/l.

35 En una realización, el al menos un modulador de bvg comprende glutatona. La glutatona puede estar a una concentración superior o igual a 0,15 g/l, superior o igual a 0,20 g/l, superior o igual a 0,25 g/l, superior o igual a 0,30 g/l, superior o igual a 0,35 g/l, superior o igual a 0,40 g/l, inferior o igual a 20 g/l, inferior o igual a 15 g/l, inferior o igual a 12 g/l, inferior o igual a 10 g/l, entre 0,15 g/l y 20 g/l, entre 0,20 g/l y 20 g/l, entre 0,25 g/l y 20 g/l, entre 0,30 g/l y 20 g/l, entre 0,35 g/l y 20 g/l, entre 0,35 g/l y 20 g/l o entre 0,40 g/l y 20 g/l.

40 En una realización, el al menos un modulador de bvg comprende un aminoácido que contiene azufre, estos aminoácidos incluyen, Cisteína, Cistina, Metionina, pero también incluye cualquier aminoácido adicional que contenga un átomo de azufre (aminoácidos tanto naturales como no naturales). Estos aminoácidos pueden derivarse de una fuente de proteína o péptido, o pueden obtenerse como aminoácidos individuales. En una realización adicional, el al menos un modulador de bvg comprende un aminoácido que contiene azufre a una concentración superior o igual a 0,25 mM, superior o igual a 0,5 mM, superior o igual a 0,8 mM, inferior o igual a 1.000 mM, inferior o igual a 500 mM, inferior o igual a 250 mM, inferior o igual a 100 mM, inferior o igual a 50 mM, inferior o igual a 25 mM, inferior o igual a 10 mM, entre 0,25 mM y 1.000 mM, entre 0,5 mM y 500 mM, entre 0,8 mM y 250 mM, o entre 0,5 mM y 100 mM.

### ETAPAS ADICIONALES

50 En una realización, la especie de *Bordetella* expresa al menos un factor de virulencia seleccionado del grupo que consiste en la toxina *Pertussis*, hemaglutinina filamentososa, aglutinógeno fimbrial y pertactina. Opcionalmente, la toxina *Pertussis* se produce a una tasa de producción específica de Toxina *Pertussis* inferior a 2,8 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 2,7 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 2,6 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 2,5 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 2,4 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 2,3 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 2,2 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 2,1 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 2,0 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 1,9 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 1,8 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 1,7 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup> o 1,6 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup> en la etapa b). Opcionalmente, la toxina *Pertussis* se produce a una tasa de producción específica de Toxina *Pertussis* superior a 8 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 2,9 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 3,0 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup>, 3,1 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup> o 3,2 mg/l DO<sub>650nm</sub><sup>-1</sup> durante la etapa c).

El procedimiento de la divulgación puede incluir una etapa adicional d) de purificación del factor de virulencia para producir un factor de virulencia purificado. El factor de virulencia purificado puede ser una toxina *Pertussis* purificada (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN), aglutinógeno 2 o aglutinógeno 3. El factor de virulencia purificado puede alterarse después de la purificación, por ejemplo, la Toxina *Pertussis* puede desintoxicarse químicamente después de la purificación. Véanse también los documentos EP 427462 y WO 91/12020 para la preparación de antígenos de *Pertussis*. En una realización, la etapa d) implica la purificación celular usando cromatografía. En una realización, la técnica de cromatografía es cromatografía de afinidad, filtración en gel, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía de intercambio iónico. Opcionalmente, la cromatografía de afinidad usa una columna de purificación con marcador de afinidad, una columna de purificación de anticuerpo, una columna de afinidad de lectina, una columna de purificación de prostaglandina o una columna de estreptavidina. Opcionalmente, la HPLC usa una columna de intercambio iónico, una columna de fase inversa o una columna de 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 e) de formulación de una composición inmunogénica que comprende el factor de virulencia purificado.

El procedimiento puede comprender además una etapa f) 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 la toxina *Pertussis*, hemaglutinina filamentosa, pertactina, un aglutinógeno fimbrial, toxoide diftérico, toxoide tetánico, al menos un antígeno sacárido conjugado de *N. meningitidis*, antígeno de superficie de la hepatitis B, virus de la polio inactivado (IPV) y un antígeno sacárido conjugado de *Haemophilus influenzae* b. El al menos un antígeno de 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.

Como alternativa o además de los antígenos meningocócicos anteriores, la composición inmunogénica puede comprender uno o más conjugados de oligosacáridos o polisacáridos capsulares neumocócicos-vehículo proteico.

Por lo general, los oligosacáridos o polisacáridos capsulares neumocócicos (preferentemente los últimos) representados en las composiciones de la invención comprenden antígenos derivados de al menos cuatro serotipos de neumococo. 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. Todavía más preferentemente, 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. Incluso más preferentemente, al menos 10 serotipos están comprendidos en la composición (10 valente), por ejemplo, los derivados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización preferida de la invención, están comprendidos al menos 13 de dichos antígenos neumocócicos conjugados, aunque otros antígenos, por ejemplo, 23 valentes (tales 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), también son contemplados por la invención.

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

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 f) de adición de un adyuvante a la composición inmunogénica. Los procedimientos de adsorción de antígenos DTPa y DTPw en adyuvantes de aluminio son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/24148 y WO 97/00697. Normalmente, los componentes adsorbidos sobre el adyuvante se dejan durante un período 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 en la combinación de composiciones inmunogénicas de la presente invención.

Preferentemente, otros componentes no se adsorben (tales como IPV) o se adsorben específicamente sobre otros adyuvantes. El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) se adsorbe preferentemente sobre fosfato de aluminio (como se describe en el documento WO 93/24148) antes de mezclarlo con otros componentes.

En una realización adicional, se proporciona un factor de virulencia que se puede obtener mediante el procedimiento. En una realización adicional, se proporciona un factor de virulencia obtenido mediante 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 la toxina *Pertussis*, hemaglutinina filamentosa, pertactina, un aglutinógeno fimbrial, toxoide diftérico, toxoide tetánico, al menos un antígeno sacárido conjugado de *N. meningitidis*, antígeno de superficie de la hepatitis B, virus de la polio inactivado (IPV) y un antígeno sacárido conjugado de *Haemophilus influenzae* b (opcionalmente conjugado con

toxoides tetánicos). El al menos un antígeno de 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. En una realización, la vacuna comprende toxoide diftérico, toxoide tetánico y al menos uno de PT, FHA y PRN (una vacuna DTPa).

- 5 En una realización, la composición inmunogénica comprende además un adyuvante. En una realización, la composición inmunogénica comprende fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. Los procedimientos de adsorción de antígenos DTPa en adyuvantes de aluminio son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/24148 y WO 97/00697. Normalmente, los componentes adsorbidos sobre el adyuvante se dejan durante un período 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 en la combinación de composiciones inmunogénicas de la presente invención.

Preferentemente, otros componentes no se adsorben (tales como IPV) o se adsorben específicamente sobre otros adyuvantes. El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) se adsorbe preferentemente sobre fosfato de aluminio (como se describe en el documento WO 93/24148) antes de mezclarlo con otros componentes.

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

La preparación de la vacuna se describe en general en "Vaccine Design - The Subunit and adjuvant approach", Ed Powell and Newman; Pellum Press. Ventajosamente, la vacuna de combinación de acuerdo con la invención es una vacuna pediátrica.

- 20 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 las vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo de qué inmunógenos específicos se empleen. En general, se espera que cada dosis comprenda de 1 a 1.000 µg de polisacárido u oligosacárido conjugado (expresado en cantidad de sacárido), preferentemente de 2 a 100 µg, más preferentemente de 4 a 40, de 2 a 15 o de 3 a 10 µg, lo más preferentemente aproximada o exactamente 5 µg.

- 25 El contenido de antígenos proteicos en la vacuna estará normalmente en el intervalo de 1 a 100 µg, preferentemente de 5 a 50 µg, lo más normalmente en el intervalo de 5 a 25 µg.

- 30 Se puede determinar una cantidad óptima de antígeno para una vacuna en particular mediante estudios convencionales que implican la observación de títulos de anticuerpos y otras respuestas en sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o dos inyecciones de refuerzo en intervalos de aproximadamente 4 semanas o más.

Los preparados vacunales de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un mamífero (preferentemente un ser humano) susceptible a la infección, por medio de la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir la inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea.

- 35 En un aspecto adicional, se proporciona la composición inmunogénica o la vacuna como se ha descrito previamente para su uso en la prevención o en el tratamiento de enfermedades.

En un aspecto adicional, se proporciona la composición inmunogénica o la vacuna como se ha descrito previamente para su uso en la prevención o en el tratamiento de enfermedades producidas por *Bordetella pertussis*.

- 40 En un aspecto adicional, se proporciona un uso de la composición inmunogénica o la vacuna como se ha descrito previamente en la prevención o en el tratamiento de enfermedades.

En un aspecto adicional, se proporciona un uso de la composición inmunogénica o la vacuna según lo descrito anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades bacterianas.

- 45 En un décimo aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de prevención o tratamiento de una enfermedad que comprende administrar la composición inmunogénica o la vacuna según lo descrito previamente a un paciente.

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

## Ejemplos

### Ejemplo 1 – Crecimiento y producción de factores de virulencia por mutantes de *Bordetella pertussis* *bvg*<sup>+</sup> y *bvg*<sup>-</sup> en fermentación a escala de 20 l

- 50 Se sembró en una placa un cultivo en matraz de agitación de *B. pertussis* en medio Bordet-Gengou (que contenía sangre de oveja al 5 %), para poder detectar las colonias hemolíticas (*bvg*<sup>+</sup>) y no hemolíticas (*bvg*<sup>-</sup>). Se aislaron una sola colonia *bvg*<sup>+</sup> y una sola colonia *bvg*<sup>-</sup> de estas placas, y se usaron para realizar fermentaciones a escala de 20 l.

Se inoculó un primer precultivo en matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio recién preparado (adaptado de Stainer y Scholte (*J. Gen. Microbiol.* 63:211-220 (1971)) mediante la adición de dimetil-D-ciclodextrina a 1 g/l e hidrolizado de caseína ácida a 10 g/l, la sustitución de L-cisteína a 40 mg/l con L-cisteína a 40 mg/l, y el uso de concentraciones superiores de Na-L-glutamato (11,84 g/l), glutatona reducido (150 mg/l) y ácido ascórbico (400 mg/l) con 10<sup>9</sup> ufc de *B. pertussis* y se incubó a 35 °C (± 1 °C) y 150 rpm durante 24 h (± 1 h) para producir un primer precultivo. Se usó el primer precultivo para inocular un segundo precultivo en matraz de agitación que contenía 100 ml de medio recién preparado. Se incubó el segundo precultivo a 35 °C (± 1 °C) y 150 rpm durante 24 h (± 1 h), y se usó para inocular dos matraces agitados que contenían cada uno 1 litro de medio recién preparado. Tras el crecimiento a 35 °C (± 1 °C) y 150 rpm durante 24 h (± 4 h), se agruparon los dos matraces agitados del tercer precultivo. Se usó el precultivo agrupado para inocular un fermentador tan pronto como se detuvo el tercer precultivo. En paralelo, se midió la proporción de células *bvg*<sup>+</sup> y *bvg*<sup>-</sup> al final del tercer precultivo mediante la siembra en placas a diluciones apropiadas en medio BG (Bordet Gengou) (que contiene sangre al 5 %). Esta proporción representaba la proporción inicial de células *bvg*<sup>-</sup> en la fermentación de 20 l (Tabla 1).

Se usó un fermentador de 20 l (Biolafitte™). Se transfirieron 10 l del medio en condiciones asépticas al fermentador. Se usaron las siguientes condiciones para calibrar el nivel de oxígeno disuelto al 100 % (OD): temperatura (35 °C), presión de la cabeza (40 kPa), caudal de aire (4,6 l de aire filtrado por minuto) y velocidad de agitación (50 rpm o rotaciones por minuto).

La inoculación se realizó mediante la adición de 1,5 l del precultivo agrupado.

Durante la fermentación, se mantuvieron la temperatura (35 °C) y la presión de cabeza (40 kPa) a un nivel constante. Se usó un rompedor mecánico de espuma para controlar la formación de espuma durante la fermentación. El caudal de aire se fue aumentando progresivamente durante la fermentación, de acuerdo con una curva predefinida. El nivel de oxígeno disuelto se fijó en el 25 % y se reguló aumentando la agitación cuando el OD cayó por debajo del 25 %. Se ajustó la velocidad de agitación mínima a 50 rpm; la velocidad máxima de agitación se fijó en 550 rpm. El pH se reguló a 7,2 mediante la adición de ácido acético al 50 % (p/v o peso/volumen).

Durante la fermentación, se controló el crecimiento de los cultivos *bvg*<sup>-</sup> y *bvg*<sup>+</sup> en función de la densidad óptica a 650 nm (DO<sub>650nm</sub>, Figura 1). Al final de la fermentación (definida como el tiempo en que el consumo de oxígeno disminuye como consecuencia del agotamiento del glutamato, produciendo la reducción de la velocidad de agitación), se determinó la producción de toxina *pertussis* (PT) en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA convencional, y se midió la proporción de células *bvg*<sup>+</sup> y *bvg*<sup>-</sup> mediante la siembra en placa de diluciones apropiadas de caldo de fermentación en medio BG que contenía sangre al 5 % (Tabla 1). Esta proporción representaba la proporción final de células *bvg*<sup>-</sup> en la fermentación de 20 l (Tabla 1).

La fermentación con el aislado de *bvg*<sup>-</sup> produjo un crecimiento más rápido, pero una producción de PT muy baja, en comparación con la fermentación con el aislado *bvg*<sup>+</sup>. Sin embargo, la concentración máxima de biomasa no fue diferente entre los dos aislados.

**Tabla 1. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de aislados de *B. Pertussis bvg*<sup>+</sup> y *bvg*<sup>-</sup>**

	COQ261 <i>bvg</i> <sup>-</sup>	COQ262 <i>bvg</i> <sup>+</sup>
<b>Aislado de una sola colonia</b>	<i>bvg</i> <sup>-</sup>	<i>bvg</i> <sup>+</sup>
<b>Proporción inicial de <i>bvg</i><sup>-</sup> en el fermentador de 20 l</b>	100 %	1 %
<b>Tiempo de fermentación total*</b>	31 h	39 h
<b>Biomasa máxima (DO<sub>650nm</sub>)</b>	7,5	7,3
<b>Proporción final de <i>bvg</i><sup>-</sup> en fermentador de 20 l</b>	100 %	0 %
<b>Concentración de PT al final de la fermentación</b>	5,5 mg/l	22,3 mg/l

\*El tiempo de fermentación total se define como el punto de tiempo en el que disminuye el consumo de oxígeno (como consecuencia del agotamiento de glutamato), que da lugar a una reducción de la velocidad de agitación.

**35 Ejemplo 2 – Acumulación de *bvg*<sup>-</sup> en una fermentación a escala de 20 l de *Bordetella pertussis***

Se realizó una fermentación de 20 l de *Bordetella pertussis* como se ha descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que el primer precultivo se inoculó con 10<sup>9</sup> ufc de *B. pertussis* que representan una proporción de 99:1 de células *bvg*<sup>+</sup> con respecto a células *bvg*<sup>-</sup>.

40 La proporción de células *bvg*<sup>+</sup> con respecto a células *bvg*<sup>-</sup> se midió al inicio y al final de la fermentación de 20 l, mediante la siembra en placas de diluciones apropiadas del caldo de fermentación en medio BG que contenía sangre al 5 % (Tabla 2). La proporción de células *bvg*<sup>-</sup> aumentó a medida que aumentaba el número de generaciones.

**Tabla 2. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de aislados de *B. Pertussis bvg*<sup>+</sup> y *bvg*<sup>-</sup>**

	COQ238
<b>Proporción inicial de <i>bvg</i><sup>-</sup> en el primer cultivo previo</b>	1 %

(Continuación)

**Tabla 2. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de aislados de *B. Pertussis* *bvg*<sup>+</sup> y *bvg*<sup>-</sup>**

	COQ238
Proporción inicial de <i>bvg</i> <sup>-</sup> en el primer cultivo previo	1 %
Proporción inicial de <i>bvg</i> <sup>-</sup> en el fermentador de 20 l	5 %
Tiempo de fermentación total*	35 h
Biomasa máxima (DO <sub>650nm</sub> )	6,9
Proporción final de <i>bvg</i> <sup>-</sup> en fermentador de 20 l	20 %

\*El tiempo de fermentación total se define como el punto de tiempo al que disminuye el consumo de oxígeno (como consecuencia del agotamiento de glutamato), que da lugar a una reducción de la velocidad de agitación.

**Ejemplo 3 - Efecto de compuestos de modulación sobre la absorción de células *bvg*<sup>-</sup> durante cultivos en matraces de agitación en serie**

Se realizaron cuatro series de cultivos en paralelo en un medio adaptado de Stainer y Scholte (*J. Gen. Microbiol.* 63:211-220 (1971)) con las modificaciones descritas en el Ejemplo 1, conteniendo cada serie MgSO<sub>4</sub> (10 mM) y/o niacina (0 g/l o 0,604 g/l), como se describe en la Tabla 3. Para cada serie, se inoculó el primer matraz de agitación que contenía 7,5 ml de medio recién preparado con 10<sup>9</sup> ufc de *pertussis* que representaban una proporción de 99:1 de células *bvg*<sup>+</sup> con respecto a células *bvg*<sup>-</sup>. Todos los cultivos subsiguientes en matraces de agitación contenían 100 ml de medio recién preparado. Todos los cultivos se incubaron durante 24 h (± 1 h) a 35 °C (± 1 °C). Al final del tercer y cuarto pase, se midió la proporción de células *bvg*<sup>+</sup> con respecto a células *bvg*<sup>-</sup> mediante la siembra en placa de diluciones apropiadas del cultivo en medio BG que contenía sangre al 5 % (Tabla 3).

En ausencia de concentraciones moduladoras de MgSO<sub>4</sub> o niacina (serie A), LAS células *bvg*<sup>-</sup> se acumularon rápidamente. La adición bien de MgSO<sub>4</sub> (20 mM, serie C) o de niacina (0,604 g/l, serie B) o ambos produjo una acumulación significativamente inferior de células *bvg*<sup>-</sup>.

**Tabla 3. Efecto de los compuestos moduladores MgSO<sub>4</sub> y niacina sobre la absorción de las células *bvg*<sup>-</sup> durante los cultivos en matraces de agitación en serie**

	Serie A	Serie B	Serie C	Serie D
MgSO <sub>4</sub>	-	-	20 mM	20 mM
Niacina	0,004 g/l	0,604 g/l	0,004 g/l	0,604 g/l
Proporción de células <i>bvg</i> <sup>-</sup>				
Inicio del primer cultivo	1 %	1 %	1 %	1 %
Fin del tercer cultivo	5 %	1 %	3 %	0 %
Fin del cuarto cultivo	8 %	2 %	2 %	2 %

**Ejemplo 4 - Efecto de la dosis del compuesto modulador niacina sobre la absorción de células *bvg*<sup>-</sup> durante cultivos en matraces de agitación en serie**

El efecto de la dosis de niacina sobre la absorción de las células *bvg*<sup>-</sup> se evaluó durante los cultivos en matraces en matraz de agitación en serie de *Bordetella pertussis*. Se realizaron cuatro series de cultivos en paralelo en un medio adaptado de Stainer y Scholte (*J. Gen. Microbiol.* 63:211-220 (1971)), con las modificaciones descritas en el Ejemplo 1. El medio también contenía las siguientes modificaciones: reemplazo del hidrolizado de caseína ácida con una mezcla de 12 aminoácidos (L-Aspartato, Glicina, L-Valina, L-Metionina, L-Isoleucina, L-Leucina, L-Fenilalanina, L-Histidina, L-Alanina, L-Tirosina, L-Serina y L-Lisina) a concentraciones equivalentes a las obtenidas con el hidrolizado de caseína a 10 g/l, mayores concentraciones de Na-L-glutamato (20 g/l) y L-Prolina (1,04 g/l) y ausencia de NaCl. Cada serie contenía diferentes concentraciones de niacina, como se describe en la Tabla 4. Para cada serie, se inoculó el primer matraz de agitación que contenía 100 ml de medio recién preparado con 4 x 10<sup>9</sup> ufc de *B. pertussis* que representaban una proporción de 94:6 de células *bvg*<sup>+</sup> con respecto a células *bvg*<sup>-</sup>. Todos los cultivos subsiguientes en matraces de agitación contenían 100 ml de medio recién preparado, y se inocularon con el cultivo anterior a una concentración de células inicial de aproximadamente 4 x 10<sup>8</sup> ufc/ml. Todos los cultivos se incubaron durante 24 h (± 1 h) a 35 °C (± 1 °C) y 150 rpm. Al final de cada pase, se midió la proporción de células *bvg*<sup>+</sup> con respecto a células *bvg*<sup>-</sup> mediante la siembra en placa de diluciones apropiadas del cultivo en medio BG que contenía sangre al 5 % (Tabla 4). Se calculó el número de generaciones en cada pase en función de las mediciones de la densidad óptica (DO<sub>650nm</sub>). En la Figura 2, se representa la absorción de las células *bvg*<sup>-</sup> en función del número de generaciones.

Las bajas concentraciones de niacina fueron menos eficaces para controlar la absorción de las células *bvg*<sup>-</sup>. Sin embargo, cuando se añadió niacina a una alta concentración (0,604 g/l), no se observó absorción de *bvg*<sup>-</sup>, hasta 15 generaciones.

**Tabla 4. Efecto de la dosis del compuesto modulador niacina sobre la absorción de las células *bvg*<sup>-</sup> durante los cultivos en matraces de agitación en serie**

	Serie A	Serie B	Serie C	Serie D
Niacina	0,004 g/l	0,021 g/l	0,113 g/l	0,604 g/l
Proporción de células <i>bvg</i> <sup>-</sup>				
Inicio del primer cultivo	6 %	6 %	6 %	6 %
Fin del primer cultivo	9 %	9 %	10 %	5 %
Fin del segundo cultivo	14 %	15 %	14 %	5 %
Fin del tercer cultivo	24 %	19 %	21 %	4 %

**Ejemplo 5 - Uso del compuesto modulador niacina para controlar la absorción de células *bvg*<sup>-</sup> en fermentación a escala de 20**

Se realizaron dos fermentaciones de 20 l de *B. pertussis* en paralelo. Las dos fermentaciones fueron idénticas, a excepción de la presencia de una alta concentración de niacina (0,604 g/l) en los dos precultivos de fermentación COQ255, para controlar la absorción de *bvg*<sup>-</sup>, mientras que los dos siguientes precultivos de fermentación COQ255 contenían una baja concentración de niacina (0,004 g/l). En la fermentación COQ254, los cuatro precultivos se realizaron en presencia de 0,004 g/l de niacina. La concentración de niacina en cada etapa del procedimiento se indica en la Tabla 5. Debido a la dilución del medio en cada etapa de precultivo, la concentración inicial de niacina en el fermentador de 20 l fue de 0,004 g/l, es decir, por debajo de la concentración moduladora, lo que permite la producción de PT.

**Tabla 5. Concentración inicial de niacina en cada etapa del procedimiento de fermentación para fermentaciones de *B. Pertussis* con control (COQ255) o sin control (COQ254) de la absorción de *bvg*<sup>-</sup> en la etapa de precultivo**

	COQ254	COQ255
Concentración añadida de niacina*	0,004 g/l	0,604 g/l
Primer precultivo	0,004 g/l	0,604 g/l
Segundo precultivo	0,004 g/l	0,004 g/l
Tercer precultivo	0,004 g/l	0,004 g/l
Cuarto precultivo	0,004 g/l	0,004 g/l
Fermentador de 20 l		
Concentración eficaz de niacina**	0,004 g/l	0,596 g/l
Primer precultivo	0,004 g/l	0,604 g/l
Segundo precultivo	0,004 g/l	0,022 g/l
Tercer precultivo	0,004 g/l	0,005 g/l
Cuarto precultivo	0,004 g/l	0,004 g/l
Fermentador de 20 l		

\*Representa la concentración de niacina en el medio recién preparado.

\*\*Representa la concentración de niacina calculada, teniendo en cuenta la concentración de niacina en el medio recién preparado, la dilución del medio recién preparado debida a la adición del inóculo y la niacina llevada junto con el inóculo de la etapa anterior (suponiendo la no utilización de niacina o la degradación durante el crecimiento).

Se usó el mismo banco de células congeladas para inocular los primeros precultivos de ambas fermentaciones, que consistían en un matraz de agitación que contenía 30 ml de medio recién preparado (adaptado de Stainer y Scholte (*J. Gen. Microbiol.* 63:211-220 (1971)), con las modificaciones descritas en el ejemplo 1) con aproximadamente  $1 \times 10^9$  ufc de *B. pertussis* que representaban una proporción de 99:1 de células *bvg*<sup>+</sup> con respecto a *bvg*<sup>-</sup>. El primer precultivo se incubó a 35 °C ( $\pm 1$  °C) y 150 rpm durante 24 h ( $\pm 1$  h), y se usó para inocular un segundo precultivo en matraz de agitación que contenía 1 l de medio recién preparado. Se incubó el segundo precultivo a 35 °C ( $\pm 1$  °C) y 150 rpm durante 24 h ( $\pm 2$  h), y se usó para inocular un tercer matraz de agitación que contenía 1 litro de medio recién preparado. Tras la incubación a 35 °C ( $\pm 1$  °C) y 150 rpm durante 24 h ( $\pm 1$  h), y se usó el tercer precultivo para inocular dos matraces de agitación que contenían cada uno 1 litro de medio recién preparado. Tras el crecimiento a 35 °C ( $\pm 1$  °C) y 150 rpm durante 13 h ( $\pm 1$  h), se agruparon los dos matraces agitados del cuarto precultivo. Se usó el precultivo agrupado para inocular un fermentador tan pronto como se detuvo el cuarto precultivo. En paralelo, se midió la proporción de células *bvg*<sup>+</sup> y *bvg*<sup>-</sup> al final del cuarto precultivo mediante la siembra en placas de diluciones apropiadas en medio BG que contenía sangre al 5 %. Esta proporción representaba la proporción inicial de células *bvg*<sup>-</sup> en la fermentación de 20 l (Tabla 6). El número de generaciones del tren de precultivos (18 generaciones, calculado a partir de mediciones de DO<sub>650nm</sub>) representa un número de generaciones que puede usarse para realizar la fermentación a escala comercial (aproximadamente 2.000 l de caldo de fermentación).

Se usó un fermentador de 20 l (Biolafitte). Se transfirieron 10 l del medio en condiciones asépticas al fermentador. Se usaron las siguientes condiciones para calibrar el nivel de oxígeno disuelto al 100 % (OD): temperatura (35 °C),

presión de la cabeza (40 kPa), caudal de aire (4,6 l de aire filtrado por minuto) y velocidad de agitación (50 rpm).

La inoculación se realizó mediante la adición de 1,5 l del precultivo agrupado.

5 Durante la fermentación, se mantuvieron la temperatura (35 °C) y la presión de cabeza (40 kPa) a un nivel constante. Se usó un rompedor mecánico de espuma para controlar la formación de espuma durante la fermentación. El caudal de aire se fue aumentando progresivamente durante la fermentación, de acuerdo con una curva predefinida. El nivel de oxígeno disuelto se fijó en el 25 % y se reguló aumentando la agitación cuando el OD cayó por debajo del 25 %. Se ajustó la velocidad de agitación mínima a 50 rpm; la velocidad máxima de agitación se fijó en 550 rpm. El pH se reguló a 7,2 mediante la adición de ácido acético al 50 % (p/v).

10 Durante la fermentación, se controló el crecimiento en función de la densidad óptica a 650 nm ( $DO_{650nm}$ ). Al final de la fermentación (definida como el tiempo en que el consumo de oxígeno disminuye como consecuencia del agotamiento del glutamato, produciendo la reducción de la velocidad de agitación), se determinó la producción de toxina *pertussis* (PT) en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA, y se midió la proporción de células *bvg*<sup>+</sup> y *bvg*<sup>-</sup> mediante la siembra en placa de diluciones apropiadas de caldo de fermentación en medio BG que contenía sangre al 5 % (Tabla 6). Esta proporción representaba la proporción final de células *bvg*<sup>-</sup> en la fermentación de 20 l (Tabla 6).

15 La adición de una alta concentración de niacina durante las dos primeras etapas de precultivo dio lugar a una proporción inferior de células *bvg*<sup>-</sup> al comienzo de la fermentación de 20 l. Aunque no se ejerció control sobre la absorción de *bvg*<sup>-</sup> durante la propia fermentación (0,004 g/l de niacina, para permitir la expresión de PT), la inferior proporción inicial de células *bvg*<sup>-</sup> se reflejó al final de la fermentación y resultó en un aumento significativo de los títulos de PT en el caldo de fermentación. La fermentación COQ255 fue ligeramente más lenta, de acuerdo con la observación de que las células *bvg*<sup>-</sup> crecen más rápido que las células *bvg*<sup>+</sup>. La concentración final de biomasa fue similar entre las dos fermentaciones: solo se vio afectada la composición de la población bacteriana en términos de la proporción de *bvg*<sup>+</sup>:*bvg*<sup>-</sup>. Esto se ilustra por el aumento en la producción específica de PT (Tabla 6).

**Tabla 6. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de *B. Pertussis* con control (COQ255) o sin control (COQ254) de la absorción de *bvg*<sup>-</sup> en la etapa de precultivo**

	COQ254	COQ255
<b>Control de la absorción de <i>bvg</i><sup>-</sup> en la etapa de precultivo</b>	sin	con
<b>Proporción inicial de <i>bvg</i><sup>-</sup> en el fermentador de 20 l</b>	13 %	3 %
<b>Tiempo de fermentación total*</b>	40 h	43 h
<b>Biomasa final (<math>DO_{650nm}</math>)</b>	6,7	7,2
<b>Proporción final de <i>bvg</i><sup>-</sup> en fermentador de 20 l</b>	34 %	13 %
<b>Concentración de PT al final de la fermentación</b>	18,7 mg/l	22,8mg/l
<b>Producción específica de PT al final de la fermentación</b>	2,8 mg/l $DO_{650nm}^{-1}$	3,2 mg/l $DO_{650nm}^{-1}$

\*El tiempo de fermentación total se define como el punto de tiempo en el que disminuye el consumo de oxígeno (como consecuencia del agotamiento de glutamato), que da lugar a una reducción de la velocidad de agitación.

#### **Ejemplo 6: bajo nivel de oxígeno disuelto como condición que inhibe la producción de PT**

25 Se realizaron dos fermentaciones de 20 l de *B. pertussis* en paralelo. Las etapas de precultivo se realizaron como se describe en el Ejemplo 2. Se usó el mismo tren de precultivos para inocular dos fermentadores de 20 l. Las fermentaciones de 20 l se realizaron como se describe en el Ejemplo 1, a excepción de que la velocidad máxima de agitación se fijó en 550 rpm en la primera fermentación (COQ238, condiciones de oxígeno suficiente) y 280 rpm en la segunda fermentación (COQ239; condiciones de oxígeno limitado). Las fermentaciones se detuvieron cuando las fuentes de carbono se agotaron por completo, como lo demuestra una interrupción abrupta del consumo de oxígeno.

30 En la Fig. 3, se compara el perfil de oxígeno disuelto para ambas fermentaciones (oxígeno disuelto absoluto calculado a partir de mediciones en línea de la temperatura, la presión de cabeza y el oxígeno disuelto relativo, usando la ley de Henry). Las producciones de biomasa y PT se muestran en la Tabla 7. El suministro limitado de oxígeno (COQ239) tuvo un efecto negativo tanto en la biomasa final como en la concentración de PT. La velocidad de crecimiento del cultivo también se vio afectada negativamente en condiciones de oxígeno limitado.

**Tabla 7. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de *B. Pertussis* en condiciones de oxígeno suficiente (COQ238) y de oxígeno limitado (COQ239)**

	COQ238	COQ239
<b>Suministro de oxígeno</b>	suficiente	limitado
<b>Tiempo de fermentación total*</b>	35 h	44 h
<b>Biomasa final (<math>DO_{650nm}</math>)</b>	6,9	5,9

(Continuación)

<b>Tabla 7. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de <i>B. Pertussis</i> en condiciones de oxígeno suficiente (COQ238) y de oxígeno limitado (COQ239)</b>		
	<b>COQ238</b>	<b>COQ239</b>
<b>Concentración de PT al final de la fermentación</b>	22,1 mg/l	13,9 mg/l
<b>Producción específica de PT al final de la fermentación</b>	3,2 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>	2,4 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>

\*El tiempo de fermentación total se define como el punto de tiempo en el que disminuye el consumo de oxígeno (como consecuencia del agotamiento de glutamato), que da lugar a una reducción de la velocidad de agitación.

**Ejemplo 7: Uso de extracto de levadura para inhibir la producción de PT**

Se realizaron dos fermentaciones de 20 l de *B. pertussis* en paralelo. Las etapas de precultivo se realizaron como se describe en el Ejemplo 2, a excepción de la concentración de Na-L-Glutamato (20 g/l). Las fermentaciones de 20 l se realizaron como se describe en el Ejemplo 1, a excepción de las siguientes adaptaciones a la composición del medio: en la fermentación COQ199, se añadió extracto de levadura al medio a una concentración de 20 g/l, mientras que en la fermentación COQ182, se añadió hidrolizado de caseína a una concentración de 10 g/l. En ambas fermentaciones, se controló la formación de espuma mediante la adición automática de una emulsión de polidimetilsiloxano a través de un controlador de espuma. Las fermentaciones se detuvieron cuando las fuentes de carbono se agotaron por completo, como lo demuestra una interrupción abrupta del consumo de oxígeno.

En la Tabla 8, se muestran las producciones de biomasa y de PT. El uso de extracto de levadura (COQ199) en lugar de hidrolizado de caseína (COQ182) tuvo un efecto positivo en la concentración de biomasa y un efecto negativo en la producción de PT (reducción del 43 % en comparación con las condiciones de referencia).

<b>Tabla 8. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de <i>B. Pertussis</i> en medio que contiene 20 g/l de extracto de levadura (COQ199) o 10 g/l de hidrolizado de caseína (COQ182)</b>		
	<b>COQ182</b>	<b>COQ199</b>
<b>Materia prima compleja en el medio</b>	Hidrolizado de caseína a 10 g/l	Extracto de levadura a 20 g/l
<b>Biomasa final (DO<sub>650nm</sub>)</b>	10,0	15,2
<b>Concentración de PT al final de la fermentación</b>	34,4 mg/l	19,5 mg/l
<b>Producción específica de PT al final de la fermentación</b>	3,4 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>	1,3 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>

**Ejemplo 8: Uso de alta concentración de prolina y baja concentración de sodio para inhibir la producción de PT**

Se realizaron tres fermentaciones de 20 l de *B. pertussis* en paralelo. Las etapas de precultivo se realizaron como se describe en el Ejemplo 2, a excepción de la composición del medio, que fue como la descrita en el Ejemplo 4. Las fermentaciones de 20 l se realizaron como se describe en el Ejemplo 1, a excepción de la composición del medio: en la fermentación COQ280, se añadió prolina para obtener una concentración final de 1 g/l, mientras que en la fermentación COQ278, la concentración de prolina fue de 12 g/l. Con el fin de mantener una cantidad similar de fuente de carbono entre las dos condiciones, la concentración de glutamato (proporcionado como glutamato sódico) se redujo de 20 g/l en la fermentación COQ280 a 7 g/l en la fermentación COQ278. En la fermentación COQ281, la concentración de prolina y glutamato fueron idénticas a COQ278, pero se añadió NaCl a una concentración de 4 g/l para compensar la reducción del glutamato sódico en comparación con COQ280. Las fermentaciones se detuvieron cuando las fuentes de carbono se agotaron por completo, como lo demuestra una interrupción abrupta del consumo de oxígeno.

En la Tabla 9, se muestran las producciones de biomasa y de PT. Cuando había prolina presente a una concentración alta (COQ278), se observó una reducción significativa de la producción de PT (reducción del 58 % en comparación con COQ280). Este efecto se alivió parcialmente cuando se añadió NaCl para compensar la concentración reducida del glutamato de sodio (COQ281, reducción del 37 % en comparación con COQ280). Estas observaciones indican que tanto la alta concentración de prolina como la baja concentración de sodio tienen un efecto negativo en la producción de PT, y que estos efectos son aditivos (es decir, no redundantes).

<b>Tabla 9. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de <i>B. Pertussis</i> en medio que contiene 1 g/l de prolina (COQ280), 12 g/l de prolina (COQ278), o 12 g/l de prolina y 4 g/l de NaCl (COQ281)</b>			
	<b>COQ280</b>	<b>COQ278</b>	<b>COQ281</b>
<b>Concentración de prolina (g/l)</b>	1	12	12
<b>Concentración de glutamato sódico (g/l)</b>	20	7	7
<b>Concentración de NaCl (g/l)</b>	0	0	4
<b>Biomasa final (DO<sub>650nm</sub>)</b>	9,7	11,3	9,8



(Continuación)

<b>Tabla 9. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de <i>B. Pertussis</i> en medio que contiene 1 g/l de prolina (COQ280), 12 g/l de prolina (COQ278), o 12 g/l de prolina y 4 g/l de NaCl (COQ281)</b>			
	<b>COQ280</b>	<b>COQ278</b>	<b>COQ281</b>
<b>Concentración de PT al final de la fermentación</b>	19,0 mg/l	8,0 mg/l	12,0 mg/l
<b>Producción específica de PT al final de la fermentación</b>	2,0 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>	0,7 mg/l DO <sub>650nm</sub>	1,2 mg/l DO <sub>650nm</sub>

**Ejemplo 9 – Uso de alta concentración de fosfato para inhibir la producción de PT**

Se realizaron dos fermentaciones de 20L l de *B. pertussis* en paralelo. Las etapas de precultivo se realizaron como se describe en el Ejemplo 8. Las fermentaciones de 20 l se realizaron como se describe en el Ejemplo 1, a excepción de las siguientes adaptaciones a la composición del medio: en la fermentación COQ280, se añadió KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a una concentración de 0,5 g/l, mientras que en la fermentación COQ279, la concentración de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> fue de 0,8 g/l. Las fermentaciones se detuvieron cuando las fuentes de carbono se agotaron por completo, como lo demuestra una interrupción abrupta del consumo de oxígeno.

En la Tabla 10, se muestran las producciones de biomasa y de PT. Cuando había fosfato presente a una concentración alta, se observó una reducción significativa de la producción de PT (reducción del 32 % en comparación con COQ280).

<b>Tabla 10. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de <i>B. Pertussis</i> en medio que contiene 0,5 g/l (COQ280) o 0,8 g/l (COQ279) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>		
	<b>COQ280</b>	<b>COQ279</b>
<b>Concentración de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (g/l)</b>	0,5	0,8
<b>Biomasa final (DO<sub>650nm</sub>)</b>	9,7	9,2
<b>Concentración de PT al final de la fermentación</b>	19 mg/l	13 mg/l
<b>Producción específica de PT al final de la fermentación</b>	2,0 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>	1,4 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>

**Ejemplo 10: Combinación de alta concentración de fosfato, alta concentración de prolina y baja concentración de sodio para inhibir la producción de PT**

Se realizaron dos fermentaciones de 20L l de *B. pertussis* en paralelo. Las etapas de precultivo se realizaron como se describe en el Ejemplo 8. Las fermentaciones de 20 l se realizaron como se describe en el Ejemplo 1, a excepción de las siguientes adaptaciones a la composición del medio (detalladas en la Tabla 11): en la fermentación COQ269, el medio contenía una combinación de alto contenido de fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,8 g/l), baja concentración de sodio (glutamato sódico a 7 g/l y sin NaCl) y alta concentración de prolina (12 g/l). Las fermentaciones se detuvieron cuando las fuentes de carbono se agotaron por completo, como lo demuestra una interrupción abrupta del consumo de oxígeno.

En la Tabla 11, se muestran las producciones de biomasa y de PT. En presencia de altas concentraciones de fosfato, bajo contenido de sodio y alto contenido de prolina (COQ269), no se observó ningún impacto negativo en la producción de biomasa. Sin embargo, la producción de PT se redujo severamente (reducción del 84 % en comparación con COQ280).

<b>Tabla 11. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de <i>B. Pertussis</i> en medio que contiene una combinación de alta concentración de fosfato, baja concentración de sodio y alta concentración de prolina</b>		
	<b>COQ280</b>	<b>COQ269</b>
<b>Concentración de prolina (g/l)</b>	1	12
<b>Concentración de glutamato sódico (g/l)</b>	20	7
<b>Concentración de NaCl (g/l)</b>	0	0
<b>Concentración de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (g/l)</b>	0,5	0,8
<b>Biomasa final (DO<sub>650nm</sub>)</b>	9,7	11,5
<b>Concentración de PT al final de la fermentación</b>	19,0 mg/l	3 mg/l
<b>Producción específica de PT al final de la fermentación</b>	2,0 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>	0,3 mg/l DO <sub>650nm</sub>

**Ejemplo 11: Uso de alta concentración de cisteína para inhibir la producción de PT**

Se realizaron dos fermentaciones de 20 l de *B. pertussis* en paralelo. Las etapas de precultivo se realizaron como se describe en el Ejemplo 2. Las fermentaciones de 20 l se realizaron como se describe en el Ejemplo 1, a excepción de las siguientes adaptaciones a la composición del medio: en la fermentación COQ280, se añadió L-cisteína a una concentración de 0,04 g/l, mientras que en la fermentación COQ396, la concentración de L-cisteína fue de 0,2 g/l. Las fermentaciones se detuvieron cuando las fuentes de carbono se agotaron por completo (cuando hubo una interrupción abrupta del consumo de oxígeno).

En la Tabla 12, se muestran las producciones de biomasa y de PT. Cuando había L-cisteína presente a una concentración alta, se observó una reducción significativa de la producción de PT (reducción del 32 % en comparación con COQ280).

**Tabla 12. Parámetros principales de fermentación para fermentaciones de 20 l de *B. Pertussis* en medio que contiene 0,04 g/l (COQ280) o 0,2 g/l (COQ396) de L-cisteína**

	COQ280	COQ279
Concentración de L-cisteína (g/l)	0,04	0,2
Biomasa final (DO <sub>650nm</sub> )	9,7	11,0
Concentración de PT al final de la fermentación	19 mg/l	13 mg/l
Producción específica de PT al final de la fermentación	2,0 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>	1,2 mg/l DO <sub>650nm</sub> <sup>-1</sup>

**Ejemplo 12 – Control a largo plazo de la absorción de *bvg*<sup>-</sup> con niacina**

Los Ejemplos 3 y 4 indican que se puede usar la niacina a 0,6 g/l para controlar la absorción de las células *bvg*<sup>-</sup> en un número limitado de generaciones, incluso a partir de una proporción relativamente baja de células *bvg*<sup>-</sup> (hasta el 6 %). Para extender esta observación a un número superior de generaciones y a un intervalo más amplio de proporción inicial de células *bvg*<sup>-</sup>, se realizaron dos grupos de cuatro cultivos en serie en matraces de agitación, como se describe a continuación.

En primer lugar, se inocularon por separado un aislado *bvg*<sup>+</sup> y un aislado *bvg*<sup>-</sup> en 100 ml de medio recién preparado adaptado de Stainer y Scholte (como se describe en el Ejemplo 4) (*J. Gen. Microbiol.* 63:211-220 (1971)), y que contenía 0,004 g/l de niacina. Se incubaron los dos matraces de agitación durante 24 h ( $\pm 1$  h) a 35 °C ( $\pm 1$  °C) y 150 rpm. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron dos veces con medio recién preparado y se volvieron a suspender en medio nuevo. A continuación, se prepararon diferentes mezclas de las dos suspensiones celulares para obtener suspensiones que contenían un 93,8 %, 72,1 %, 4,2 % o 4 % de células *bvg*<sup>-</sup>. Se usó cada una de estas cuatro suspensiones de células mixtas para inocular dos matraces de agitación separados que contenían 100 ml de medio recién preparado con 0,0004 g/l de niacina o 0,6 g/l de niacina. Después de la incubación durante 24 h ( $\pm 1$  h) a 35 °C ( $\pm 1$  °C) y 150 rpm, se usó cada cultivo para inocular un matraz de agitación que contenía 100 ml de medio nuevo que contenía la misma concentración de niacina. Para cada uno de los 8 cultivos en matraces de agitación, se repitió el procedimiento 17 veces en total, para alcanzar un número total de generaciones de aproximadamente 90 a 100. Al final de cada etapa (aproximadamente 5 generaciones), se midió la proporción de células *bvg*<sup>+</sup> y *bvg*<sup>-</sup> sembrando en placa las diluciones apropiadas del cultivo en medio BG. Los resultados se representan en la Figura 4 para los cuatro cultivos en serie con niacina a 0,004 g/l, y en la Figura 5 para los cuatro cultivos en serie con niacina a 0,6 g/l.

Estos resultados demuestran que el uso de niacina a 0,6 g/l en lugar de a 0,004 g/l, puede controlar de manera eficaz la absorción de las células *bvg*<sup>-</sup>, independientemente de la proporción inicial de estas células. También muestran que este control es eficaz durante hasta 100 generaciones, lo que normalmente corresponde al número de generaciones necesario para producir un banco de células de trabajo y suficiente biomasa (tren de precultivos) para la inoculación de una fermentación a escala industrial, a partir de una cepa de *B. Pertussis*.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de fermentación que comprende las siguientes etapas:
  - a) proporcionar una muestra de bacterias de una especie de *Bordetella*;
  - b) incubar la muestra de bacterias de una especie de *Bordetella* en un primer medio de cultivo en presencia de al menos un modulador de bvg (genes de virulencia de *Bordetella*) durante al menos 5 generaciones, produciendo así un cultivo maduro, en el que el modulador de bvg se selecciona del grupo que consiste en niacina, una sal de magnesio, una sal de sulfato, una sal de fosfato, una sal de carbonato, sacarosa, prolina, iones de sodio a una concentración superior a 100 mM, un agente antiespumante, glutatona y un aminoácido que contiene azufre;
  - c) incubar el cultivo maduro en un segundo medio de cultivo en ausencia de al menos un modulador de bvg;
- 5 en el que la etapa c) tiene lugar después de la etapa b) y en el que al menos parte de la etapa b) se lleva a cabo en un recipiente de un volumen superior o igual a 25 ml.
2. El procedimiento de fermentación de la reivindicación 1, en el que la especie de *Bordetella* expresa al menos un factor de virulencia seleccionado del grupo que consiste en la toxina *Pertussis*, hemaglutinina filamentosa, pertactina y aglutinógeno fimbrial, y es una especie seleccionada del grupo que consiste en *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*.
- 15 3. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento es un procedimiento para:
  - (i) preservar la especie de *Bordetella* en un genotipo bvg<sup>+</sup> en cultivo industrial;
  - (ii) reducir al mínimo la pérdida de expresión de factores de virulencia en crecimiento en cultivo industrial; o
  - (iii) aumentar la producción de factores de virulencia de la especie de *Bordetella*.
- 20 4. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la niacina está a una concentración superior o igual a 0,004 g/l, superior o igual a 0,01 g/l, superior o igual a 0,1 g/l, superior o igual a 0,2 g/l, superior o igual a 0,3 g/l, o superior o igual a 0,6 g/l, inferior o igual a 400 g/l, inferior o igual a 300 g/l, inferior o igual a 200 g/l, inferior o igual a 100 g/l, inferior o igual a 50 g/l, o inferior o igual a 5 g/l, de entre 0,004 g/l y 500 g/l, de entre 0,01 g/l y 400 g/l, de entre 0,1 g/l y 300 g/l, de entre 0,4 g/l y 200 g/l, o de entre 0,2 g/l y 100 g/l.
- 25 5. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sal de sulfato está a una concentración superior o igual a 10 mM.
6. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sal de magnesio o la sal de sulfato es MgSO<sub>4</sub> a una concentración de 20 mM.
- 30 7. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el modulador de bvg comprende iones de sodio a una concentración:
  - (i) superior a 120 mM, superior a 150 mM, superior a 175 mM, superior a 200 mM o superior a 250 mM; o
  - (ii) de entre 100 mM y 2.000 mM, de entre 120 mM y 2.000 mM, de entre 150 mM y 2.000 mM, de entre 175 mM y 2.000 mM o de entre 200 mM y 2.000 mM.
- 35 8. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente antiespumante es polidimetilsiloxano.
9. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa c) se lleva a cabo en un fermentador, opcionalmente, en el que el volumen de trabajo del fermentador es
  - (i) de entre 5 y 10.000 litros, entre 10 y 5.000 litros, entre 20 y 2.000 litros o entre 50 litros y 1.000 litros;
  - (ii) superior o igual a 5 litros, superior o igual a 10 litros, superior o igual a 15 litros, superior o igual a 20 litros, superior o igual a 25 litros, superior o igual a 50 litros, o superior o igual a 100 litros; o
  - (iii) inferior o igual a 10.000 litros, inferior o igual a 5.000 litros, o inferior o igual a 2.500 litros.
- 40 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura:
  - (i) superior o igual a 32 °C, superior o igual a 33 °C, superior o igual a 34 °C, o superior o igual a 35 °C;
  - (ii) inferior o igual a 45 °C, inferior o igual a 42 °C, inferior o igual a 40 °C, o inferior o igual a 38 °C; o
  - (iii) de entre 32 °C y 45 °C, entre 33 °C y 42 °C, entre 34 °C y 40 °C o entre 35 °C y 38 °C.
- 45 11. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa b) comprende una fase de precultivo.
- 50 12. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa b) comprende una fase de creación de un banco de células.

13. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la creación de un banco de células tiene lugar en la etapa a) y etapa b).
14. El procedimiento de fermentación de la reivindicación 2 que comprende además una etapa d) de purificación del factor de virulencia para producir un factor de virulencia purificado.
- 5 15. El procedimiento de fermentación de la reivindicación 14 que comprende además una etapa e) de formulación de una composición inmunogénica que comprende el factor de virulencia purificado.
16. El procedimiento de fermentación de la reivindicación 15 que comprende además una etapa f) de adición de al menos un antígeno a la composición inmunogénica.
- 10 17. El procedimiento de fermentación de la reivindicación 16, en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en toxina *Pertussis*, hemaglutinina filamentosa, pertactina, un aglutinógeno fimbrial, toxoide diftérico, toxoide tetánico, un antígeno sacárido conjugado de *N. meningitidis*, antígeno de superficie de la hepatitis B, virus de la polio inactivado (IPV) y un antígeno sacárido conjugado de *Haemophilus influenzae* b.
18. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17 que comprende una etapa g) de adición de un excipiente farmacéuticamente aceptable a la composición inmunogénica.
- 15 19. El procedimiento de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones 15-18 que comprende una etapa f) de adición de un adyuvante a la composición inmunogénica.
20. El procedimiento de fermentación de la reivindicación 19, en el que el adyuvante comprende fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

FIGURA 1

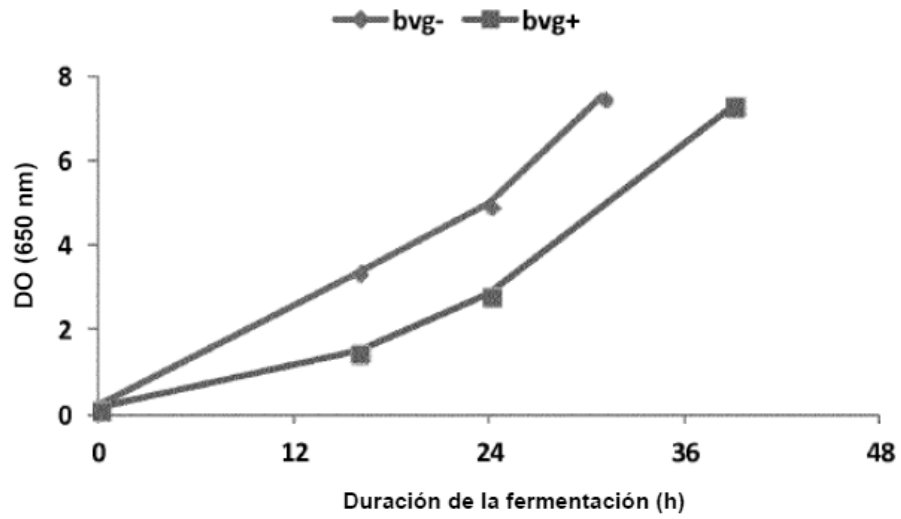


FIGURA 2

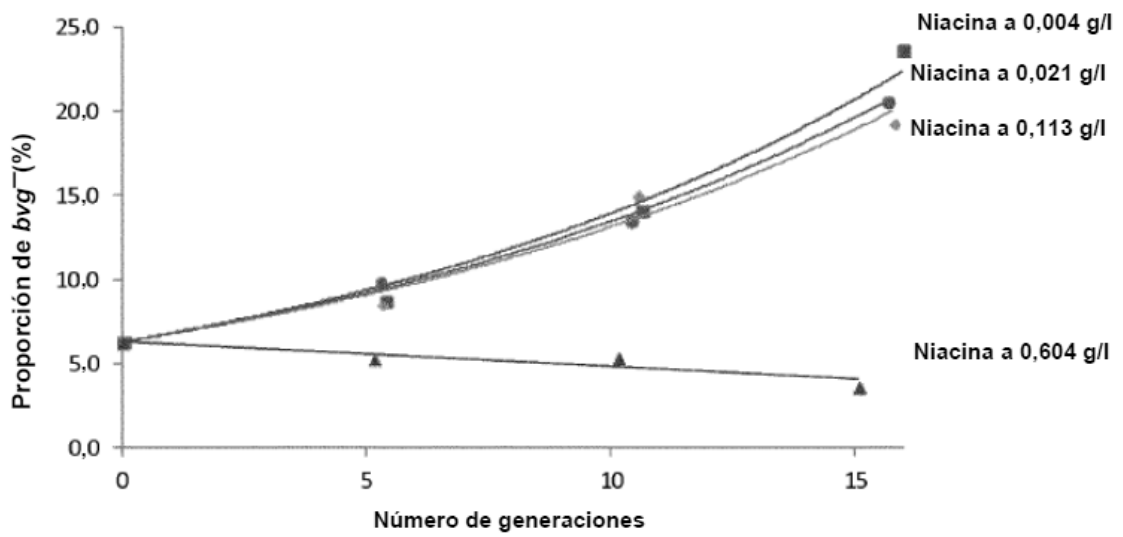


FIGURA 3

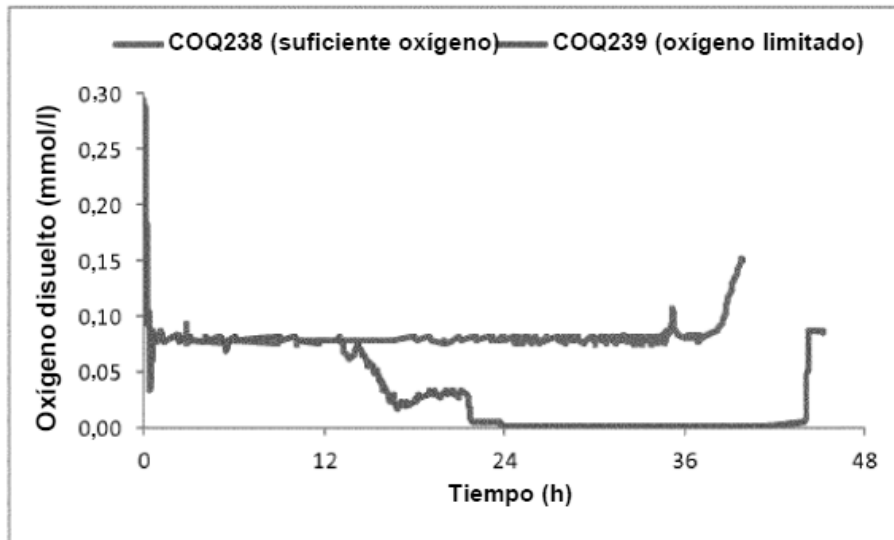


FIGURA 4

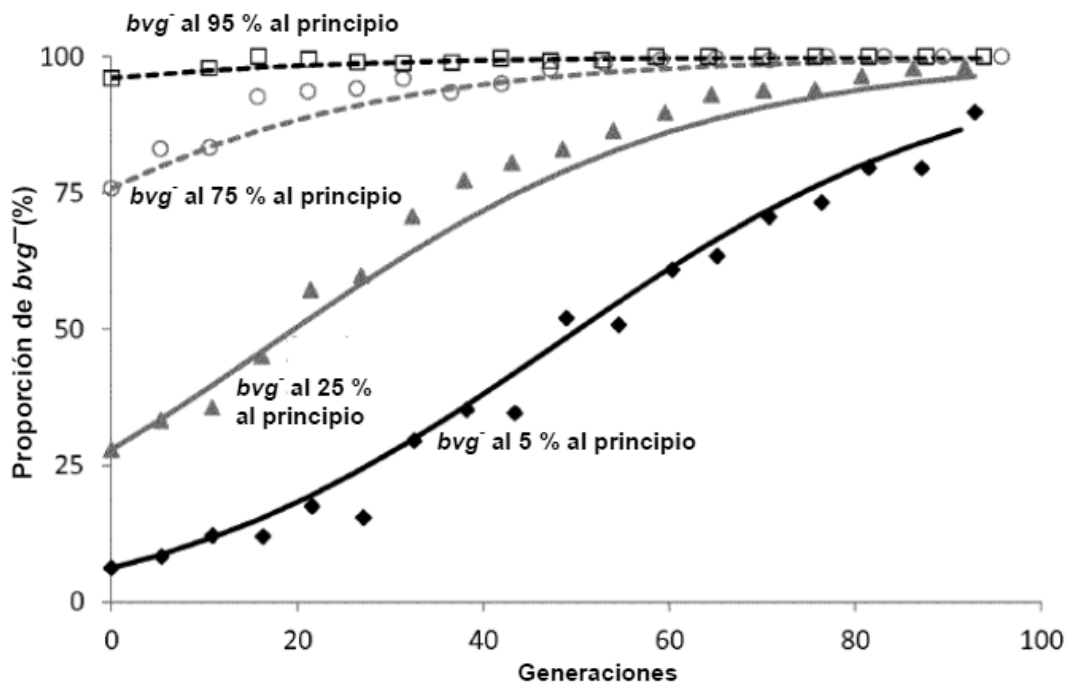


FIGURA 5

