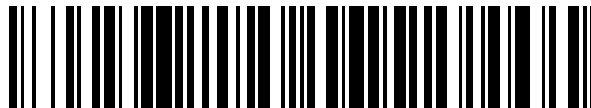


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 430**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2009 PCT/EP2009/065797**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10060916**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2009 E 09760847 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2370591**

54 Título: **Proceso para la producción de las toxinas Actinobacillus pleuropneumoniae APXI o APXIII en un medio de cultivo líquido mediante el suministro de aire enriquecido con dióxido de carbono**

30 Prioridad:

**27.11.2008 EP 08105880  
01.12.2008 US 118766 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.02.2018**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)  
Wim De Körverstraat 35  
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**SLAGMAN, SIMEN-JAN y  
SMITS, CHRISTIAN THEODOOR GERARDUS**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 656 430 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

Proceso para la producción de las toxinas *Actinobacillus pleuropneumoniae* APXI o APXIII en un medio de cultivo líquido mediante el suministro de aire enriquecido con dióxido de carbono

5 **[0001]** La presente invención hace referencia a un método para la producción de toxinas RTX ApxI o ApxIII mediante el cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un medio de cultivo líquido.

10 **[0002]** La pleuroneumonía porcina, una enfermedad respiratoria de gran importancia en los cerdos, se ha extendido por todo el mundo y está causando graves pérdidas económicas en la industria porcina debido a muertes graves, tratamiento de cerdos muy enfermos y retrasos en la comercialización de animales con enfermedades crónicas. El agente etiológico culpable es el *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se transmite, principalmente, por contacto directo entre animales, teniendo como resultado infecciones que dan lugar a una evolución clínica que va de muy grave a crónica. Esta enfermedad consiste básicamente en una infección en las vías respiratorias, mostrando síntomas clínicos como fiebre alta, dificultades respiratorias graves, tos y anorexia. La aparición de la enfermedad es rápida y la morbilidad y mortalidad altas. Uno de los medios para controlar las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (a partir de ahora referido como "APP") es a través de programas de vacunación. Las vacunas bacterianas se utilizaron en el pasado en dichos programas pero se hicieron famosas por sus graves efectos secundarios. Hoy en día es común el uso de vacunas de subunidades basadas en toxinas de APP.

20 El APP produce las conocidas como toxinas RTX (RTX representa "repeat-in-toxin"). Es la presencia de estas toxinas RTX lo que contribuye en gran medida al carácter patogénico de esta bacteria. Las toxinas RTX han sido extensamente revisadas en el pasado y descritas en la bibliografía. Como es comúnmente sabido, no todos los serotipos de APP producen todas las toxinas RTX. Por ejemplo, los serotipos 1, 5, 9 y 11 producen ApxI y ApxII. Los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 producen ApxII y ApxIII. El serotipo 10 solo produce ApxI y los serotipos 7 y 12 producen ApxII únicamente. Las vacunas comercializadas en la actualidad contra el APP se basan en las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII. De modo reciente, se ha observado que todos los serotipos de APP producen una cuarta toxina RTX, ahora denominada ApxIV (véase EP 0 875 574).

25 **[0003]** Es comúnmente sabido cómo producir las toxinas RTX ApxI o ApxIII a través del cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un medio de cultivo líquido. En particular, la EP 0 453 024 ya describe un método para producir ApxI (véase el "Ejemplo 2", párrafo 2, "Purificación y caracterización de la hemolisina", subpárrafo "Métodos") y ApxIII (véase el "Ejemplo 4", párrafo 2, "Purificación y caracterización de la toxina macrófaga App (Mat)", subpárrafo "Métodos"). Obsérvese que se solía hacer referencia a ApxI como "HLY", mientras que para referirse a ApxIII se utilizaba "Mat" (véase Frey y otros, en "J. Gen. Microbiol.", Agosto de 1993, 139 (8): 1723-8"). El medio debe soportar el crecimiento de bacterias APP. Es de conocimiento general cómo constituir un medio que soporte el crecimiento de bacterias. Los medios de cultivo clásicos fueron originalmente desarrollados por Eagle, Ham y otros en los años 50 y 60. Mostraron que un medio que cumpla con las necesidades básicas para el crecimiento debería incluir sales inorgánicas, una fuente de nitrógeno (por ejemplo, en forma de compuestos que contienen nitrógeno, tales como péptidos o proteínas), una fuente de carbono y vitaminas. Los medios son ventajosamente tamponados para evitar que se vuelvan demasiado ácidos o demasiado alcalinos. Dentro de esta receta básica, se dispone de muchas constituciones diferentes. Por ejemplo, se podría optar por componentes derivados de animales para aportar los aminoácidos, pero también se podrían escoger aminoácidos químicamente definidos. Para los otros compuestos, también son posibles numerosas variaciones. De hecho, constituir un medio que soporte el crecimiento de bacterias es relativamente sencillo. Sin embargo, la optimización del crecimiento y/o la producción de metabolitos puede llevar algún tiempo de desarrollo, en particular cuando se prefiere un medio que esté libre de suero u otros componentes derivados de animales. No obstante, se conocen comúnmente en la técnica estrategias para mejorar el rendimiento del medio de fermentación y se describen elaboradamente en la bibliografía (véase, por ejemplo, un artículo de revisión de Kennedy y Krouse en el *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1999), 23, 456-475). Dicha optimización forma parte de los experimentos rutinarios en un laboratorio de fermentación. En el caso del cultivo de APP, el NAD (dinucleótido de nicotinamida y adenina) forma parte inherentemente del medio, ya que el APP es dependiente del NAD. Sin NAD, el medio no soportará el crecimiento de las bacterias *Actinobacillus pleuropneumoniae* y no puede ser, por lo tanto, considerado como un medio líquido para soportar el crecimiento de APP en el sentido de la presente solicitud y de las reivindicaciones adjuntas. Se dispone comercialmente de medios líquidos para soportar el crecimiento de bacterias o de componentes de diversas compañías que permiten constituir dichos medios, tales como Sigma Aldrich, Quest International, Oxoid, Becton Dickinson, Pharmacia, VGD Inc., Mediatech, Invitrogen, Marcor, Irvin Scientific, etc.

55 **[0004]** Aunque la técnica anterior proporciona métodos para producir las toxinas RTX ApxI y ApxIII por medio del cultivo de APP, es necesaria una mejora en el rendimiento de la producción. Hasta la fecha, los intentos para mejorar el rendimiento de la producción básicamente tenían como objetivo el índice de producción de toxinas en la fase

estacionaria del cultivo de APP, puesto que es sabido que la producción máxima de toxinas RTX tiene lugar en densidades celulares altas; por tanto, al final de la fase de crecimiento exponencial (ver, por ejemplo, *Microbial Pathogenesis* 37 (2004) 29-33). Dichos intentos no han obtenido una mejora significativa del rendimiento de la producción total. No obstante, el solicitante sorprendentemente descubrió que, cuando se hace pasar aire a través del medio durante la fase de producción (así, durante el nacimiento y/o fase estacionaria de la bacteria APP) de dichas toxinas RTX de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y dicho aire presenta un contenido de dióxido de carbono por encima del nivel atmosférico normal, la producción de la toxina RTX aumentaba significativamente. De hecho, es de conocimiento general el uso de un nivel aumentado de dióxido de carbono durante el cultivo de colonias de bacterias en placas (ver, por ejemplo, US 6 019 984: EJEMPLOS "*Bacterial Strains and Growth Conditions*"). No obstante, este hecho afecta al cultivo de colonias de bacterias, las cuales se utilizan para inocular fermentadores. En esta etapa, solo tiene lugar el crecimiento de las bacterias por sí mismas, pero no la producción de toxinas RTX (al menos no a un nivel significativo). Tan pronto como las bacterias APP se sitúan en un medio líquido para crecer hacia densidades celulares altas aptas para la producción de toxina RTX, la técnica indica prescindir de dicho nivel aumentado de dióxido de carbono. Claro está que este procedimiento está en línea con el método de la técnica anterior mencionada en líneas superiores que muestra que la producción máxima de Apx en fermentadores tiene lugar únicamente en densidades celulares altas; por tanto, al final de la fase de crecimiento exponencial. En esta etapa, el crecimiento de la célula ha finalizado y no juega ningún papel, por lo que se ha considerado previamente que el dióxido de carbono no ha sido significativo. Además, las bacterias APP por sí mismas producen dióxido de carbono mientras crean las toxinas RTX. Así pues, se cree que la adición voluntaria de dióxido de carbono al medio incluso suprime la producción de toxinas. Estos hechos explican por qué el dióxido de carbono no se ha reconocido nunca como un factor estimulante para el rendimiento de la producción de toxinas RTX. Sin embargo, no está clara la razón por la que el dióxido de carbono estimula la producción de ApxI y ApxIII, aún más porque el dióxido de carbono parece no tener efecto positivo en el nivel de producción de la toxina RTX ApxII.

**[0005]** Cabe señalar que muchas técnicas que existen permiten el paso de aire a través del medio. Un concepto utilizado comúnmente es el de introducir aire a través de un dispositivo que permite que el aire se escape por algún lado del medio (por ejemplo, por debajo de la superficie del medio) en forma de burbujas. Dichos dispositivos pueden tener una cánula o varias dependiendo, entre otras cosas, de si se quiere o no establecer una situación de equilibrio (cercano) en el medio, y si se quiere, determinar la rapidez en la que dicho equilibrio se debería conseguir. En cualquier caso, el paso de aire a través del medio contrasta con el uso de un espacio de cabeza de aire y se confía simple y principalmente en la difusión. Se ha probado que dicha técnica proporciona resultados inadecuados. "Aire" en el contexto de la presente invención hace referencia a un medio gaseoso que comprende uno o más componentes gaseosos que están normalmente presentes en el aire atmosférico, como el oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, helio, neón, argón, xenón, radón, etc. Un "nivel atmosférico normal de dióxido de carbono es del 0,04% de volumen de CO<sub>2</sub> sobre el volumen total de aire".

**[0006]** La presente invención hace referencia a un método para la producción de toxinas RTX ApxI o ApxIII a través del cultivo de bacterias *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un medio de cultivo líquido que soporte el crecimiento de las bacterias, caracterizado por el paso de aire a través del medio durante la fase de producción de toxinas RTX, en la que dicho aire presenta más del 0,04 % del volumen de dióxido de carbono sobre el volumen total del aire.

**[0007]** En una realización, se introdujo aire durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La fase de crecimiento exponencial, en contraste con lo que se ha descrito en la técnica anterior, se presenta como una fase que forma parte de la fase de producción total de las toxinas RTX (junto con la fase estacionaria). Sorprendentemente, el solicitante descubrió que el dióxido de carbono introducido durante dicha fase de crecimiento exponencial supuso una estimulación muy significativa en la producción de la toxina RTX, hasta el punto que incluso al final de esta fase, una cantidad relevante económicamente de la toxina estaba presente en el fermentador. Por consiguiente, la presente realización proporciona la opción de terminar la fermentación al final de la fase de crecimiento exponencial o al principio de la fase estacionaria. Una ventaja importante muestra que puede suponer un ahorro de tiempo de producción significativo y, además, que la cantidad de lipopolisacáridos al final del producto puede reducirse.

**[0008]** En otra realización, en la que el medio es tamponado (por ejemplo, se incluye una sustancia que minimiza un cambio en la acidez de una solución cuando se añade una base o ácido a la solución) mediante el uso de un bicarbonato (entre otros, una sal que contiene iones HCO<sub>3</sub>). A través del uso de un tampón de bicarbonato, se muestra que el efecto inherente reductor del pH del dióxido de carbono sobrante puede contrarrestarse de manera muy efectiva. Aparentemente, utilizando dicho tampón (por ejemplo, de bicarbonato de sodio u otro tampón de bicarbonato alcalino), podrá conseguirse casi instantáneamente un estado de equilibrio (cercano) en el medio.

**[0009]** En una tercera realización, el aire atraviesa el medio en forma de flujo constante. De hecho, se pueden encontrar diferentes formas de dejar pasar el gas a través del medio. Una de ellas sería un flujo pulsátil de aire con

un contenido extremadamente alto de dióxido de carbono (por ejemplo, hasta el 90%). No obstante, se demostró que con un flujo constante se podían conseguir muy buenos resultados. Con dicho flujo constante, se pueden utilizar en el aire niveles moderados de dióxido de carbono. Este hecho proporciona un efecto ventajoso de manera que el tampón podrá mantener con mayor facilidad el pH entorno al valor de equilibrio en cualquier momento. A tener en cuenta que un flujo constante no tiene por qué significar necesariamente en todo momento, sino que la adición de dióxido de carbono no se interrumpa en determinados momentos durante el tiempo. Por ejemplo, una pequeña interrupción en el flujo durante el cultivo no excluye que antes y después de la interrupción el flujo haya sido constante. En una realización, el aire pasa continuamente durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*; por ejemplo, durante la fase de crecimiento exponencial el flujo no se verá interrumpido.

**[0010]** En otra realización, el contenido de dióxido de carbono alcanza hasta los 10% v/v. En esta realización, el contenido volumétrico máximo de dióxido de carbono en el aire es del 10%. Por encima de este nivel, es posible que el tampón no sea capaz de proporcionar un equilibrio en algún momento a gran velocidad.

**[0011]** Esto puede influir negativamente en el rendimiento de la producción de toxinas RTX. En una realización preferida, el contenido de dióxido es de 5% v/v. Se han obtenido buenos resultados con este contenido de dióxido de carbono y, además, desde un punto de vista económico, esta es la cantidad preferida de dióxido de carbono ya que dicha mezcla está disponible comercialmente a precios muy bajos.

**[0012]** Se describe que, si la toxina RTX es ApxI, el medio de cultivo puede contener borogluconato de calcio. De hecho, se conoce comúnmente que la actividad transcripcional del operón ApxI se ve mejorada por la adición de calcio al medio de crecimiento (ver *Microbiol Pathogenesis* 37 (2004) 29-33). Son varias las ventajas que se han discernido cuando se utiliza el borogluconato (en forma de 2,3-dihidroxi-3-[2-hidroxi-5-(hidroximetil)-1,3,2-dioxaborolan-4-il]propanoato) para acomplejar los iones calcio. En primer lugar, se muestra que los problemas generales con los que se encontraban de sales de calcio precipitadas en los procesamientos en cadena, en particular los filtros que suelen obstruirse, pueden evitarse o, al menos, reducirse significativamente. Junto a esto, también se dispone que se puede producir ApxI en un nivel significativamente incrementado cuando se compara con los métodos de la técnica anterior, que utiliza otros agentes complejantes como el EDTA. Aparentemente, mediante el uso de este agente complejante particular, de manera que el medio contenga el borogluconato de calcio complejo (en forma de calcio 2,3-dihidroxi-3-[2-hidroxi-5-(hidroximetil)-1,3,2-dioxaborolan-4-il]propanoato, también conocido como ácido D-glucónico, 4,5-éster cíclico con ácido bórico, sal cálcica 2:1), se puede evitar la precipitación sustancial de iones calcio con otros iones negativos, mientras que al mismo tiempo los iones calcio seguirán aún disponibles para potenciar la actividad transcripcional del operón ApxI de la *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

**[0013]** Aunque no es esencial para la presente invención, el medio deberá estar libre de componentes de origen animal. Una desventaja de muchos de los métodos de las técnicas anteriores radica en que confían en el uso de medios que contienen componentes de origen animal, tales como el caldo Columbia. Otros componentes derivados de animales mencionados en la técnica anterior son, por ejemplo, el caldo Columbia modificado o el caldo de infusión de cerebro y corazón. Como es comúnmente sabido, el uso de componentes animales presenta algunos inconvenientes importantes. En primer lugar, la composición química puede variar considerablemente entre los lotes de producción. Además, los suplementos de origen animal pueden estar contaminados con agentes infecciosos. Un temor importante es la presencia de priones que causen EET en humanos o animales. Se podría optar simplemente por un medio libre de componentes animales (al que con frecuencia se hace referencia como un medio "ACF"). Por "componente animal", en este sentido, se entiende cualquier componente que esté presente como tal en un animal (por ejemplo, sangre o una proteína) o que derive de dicho componente (por ejemplo, suero modificado derivado de la sangre o aminoácidos derivados de la proteína). El solicitante comprobó, sin embargo, que la eficacia en la producción de ApxI es muy inferior cuando se usan dichos medios ACF en comparación con medios que contienen componentes derivados de animales, incluso cuando la concentración de calcio tiene un nivel suficiente. Sin inclinarnos por la teoría, puede ser que, con el uso de suero, el problema con la precipitación de sales de calcio no sea tan grave debido a la presencia de agentes que forman complejos solubles de los iones calcio. En cualquier caso, cuando se usa borogluconato para acomplejar los iones calcio, se puede obtener también un significativo aumento en el rendimiento de ApxI, sorprendentemente dando lugar a un rendimiento que es incluso mayor que un rendimiento conseguible con un suero tradicional conteniendo un medio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cepa bacteriana y medios**

**[0014]** Los estudios fueron realizados utilizando una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* productora de ApxI, serotipo 10, en adelante denominada APP 10, y una cepa productora de ApxII y ApxIII (por ejemplo, una cepa de

- serotipo 2), en adelante denominada APP 2. En todos los casos, se reconstituyeron semillas de trabajo de estas cepas utilizando placas de Blood AgarBASE (BAB) Columbia (de Becton Dickinson, EE.UU.). Los medios líquidos utilizados eran, o bien caldo Columbia (de Becton, Dickinson, EE.UU.), o bien un medio libre de componentes animales (conocido como "ACF"). El último medio presentaba como tampón una mezcla de  $K_2HPO_4$  (14.6 g/l) y  $NaH_2PO_4$  (3.6 g/l) y, junto con esto,  $NaNO_3$  (0.2 g/l), solución glucosa al 50 % (10 ml), extracto de levadura 15g/l (disponible de Becton Dickinson), elementos traza (por ejemplo, 2,5 ml de solución SL-10 como se menciona en el *Handbook of Microbiological Media*, 3ª Edición, Ronald Atlas, CRC Press, 2004) y una solución de aminoácidos 10 mM (que contiene los 20 aminoácidos a excepción del triptófano). Un medio alternativo testado libre de componentes animales (llamado "ACF-alt") contenía cisteína, HCl (0,1 g/l),  $NaNO_3$  (0.5 g/l), KCl (0.1 g/l), elementos traza (como anteriormente), solución glucosa al 50 % (10 ml), una solución de aminoácidos 10 mM (como anteriormente), tampón HEPES (6 g/l; por ejemplo, disponible de Sigma Aldrich) y extracto de levadura (10 g/l).

**[0015]** Estos medios fueron utilizados en los precultivos y en las fermentaciones. Se usó dinucleótido de nicotinamida y adenina (0,01%) en dichos precultivos y fermentaciones. Todos los medios fueron esterilizados por filtración a 0,22  $\mu$ m. Antes de su utilización en las fermentaciones, los medios fueron calentados a 85°C durante un minuto.

## 15 Cultivo

### *Precultivo*

- [0016]** Se plaquearon semillas de trabajo de cepas de APP sobre una placa de BAB Columbia y se incubaron durante aproximadamente 24 h a 37°C. Se recogieron varias colonias para inocular botellas de 500 ml que contenían 75 ml de caldo Columbia. Se incubaron las botellas durante aproximadamente 6 horas a 37°C bajo agitación para formar un precultivo. Con estos precultivos se llevaron a cabo varias fermentaciones.

### *Cultivo en fermentador SIXFORS*

- [0017]** En un fermentador SIXFORS (Infors AG, Suiza) que contenía aproximadamente 400 ml de medio de cultivo, se añadieron 20 ml del precultivo como inóculo. La temperatura de cultivo era de 37°C, pH =  $7.2 \pm 0.1$  (a través de la adición de hidróxido de sodio 4N o ácido acético 4N) y la aireación era del 50% de  $pO_2$ . Se paró el cultivo del fermentador tras unas 24 horas.

### *Cultivo en fermentador Biostat*

- [0018]** En un fermentador Biostat C (B. Braun Biotech, Alemania) que contenía 10 l de medio de cultivo, se añadieron 500 ml del precultivo de APP como inóculo. Se aplicó la misma configuración que para los fermentadores SIXFORS. No obstante, el nivel de dióxido de carbono se aumentó manteniendo un flujo de aire constante de 1vvm (= volumen de gas por volumen de medio por minuto) para una mezcla de gas aire/CO<sub>2</sub> 95/5 v/v. Estos resultados en la configuración de aireación mostraban un  $pCO_2$  de un 5 %. El cultivo del fermentador se detuvo al final de la fase exponencial tras, aproximadamente, 8,5 horas.

### *Cultivo a escala de planta piloto*

- [0019]** Los experimentos en una planta piloto se llevaron a cabo en fermentadores esterilizables con lotes de 100 l. Los ejes de los agitadores estaban equipados con tres impulsores de turbinas Rushton con seis hélices. Al fermentador se le añadieron 75 litros de medio y se inoculó con 3 litros de precultivo. Se mantuvo la temperatura a 37°C y el pH a 7,3 por medio de un controlador automático de pH utilizando un 20 % (w/v) de NaOH y ácido acético 8 N. El cultivo estándar se llevó a cabo bajo una sobrepresión de CO<sub>2</sub> de espacio de cabeza y los impulsores giraron a una velocidad constante de 250 r.p.m. La presión de oxígeno no estaba controlada. Para los experimentos de cultivo enriquecidos con CO<sub>2</sub>, el medio se suplementó con NaHCO<sub>3</sub> para una concentración final de 10 mM y aireado con un flujo constante de aire enriquecido de 0,25 vvm con 0,014 vvm de CO<sub>2</sub>. Esto lleva a un  $pCO_2$  de un 5 % aproximado. En el caso de la cepa APP 10, el medio fue suplementado por 25 mM de CaCl<sub>2</sub> y una aireación del 50 % de  $pO_2$ .

**Análisis**

**[0020]** Al final de cada experimento, muestras de los cultivos de células bacterianas fueron tomadas del fermentador de manera aséptica para determinar la densidad óptica a 648 nm, el nivel de ApxI, ApxII y/o ApxIII (ELISA; unidades por ml) y, opcionalmente, el nivel de LPS (ensayo LAL, unidades\* 10<sup>5</sup> por ml).

**RESULTADOS**

- 5 **[0021]** Se llevó a cabo un primer experimento a escala de planta piloto con la cepa APP 2 con el fin de estudiar el efecto del dióxido de carbono al atravesar el medio (experimentos enriquecidos con CO<sub>2</sub>). El medio empleado fue caldo Columbia. Los resultados aparecen recogidos en la Tabla 1, en la que se muestran los resultados de dos experimentos (exp. 1 y exp. 2).

**Tabla 1**

10

Método de cultivo	Tiempo (h)	OD <sub>648</sub>	ApxII	ApxIII	LPS
Estándar, exp. 1	12	1.35	44	130	0.36
Estándar, exp. 2	11	1.47	77	146	0.32
Enriquecido con CO <sub>2</sub> , exp. 1	5	1.42	52	242	0.34
Enriquecido con CO <sub>2</sub> , exp. 2	5	1.86	38	287	0.09

- 15 **[0022]** De estos resultados se puede deducir que el rendimiento de la producción de ApxIII puede casi doblarse gracias al paso del dióxido de carbono a través del medio a un nivel por encima de la presión atmosférica normal. No se ha observado aumento alguno con respecto al nivel de ApxII. La concentración de LPS al final de la fase de crecimiento exponencial (que se produjo al final de cada experimento de la Tabla 1) no difiere enormemente. No obstante, como el nivel de ApxIII es dos veces superior, la cantidad de LPS por dosis de ApxIII al final del producto será, como máximo, la mitad que la del producto obtenido con configuración estándar.

- 20 **[0023]** En un segundo experimento realizado también a escala de planta piloto, se recurrió a una cepa APP 10 con el objetivo de estudiar el efecto del dióxido de carbono al atravesar el medio (experimentos "enriquecidos" con CO<sub>2</sub>) en la producción de ApxI. El medio utilizado fue caldo Columbia. Los resultados se muestran en la Tabla 2 donde, de nuevo, se proporcionan los resultados de dos experimentos.

**Tabla 2**

Método de cultivo	Tiempo (h)	OD <sub>648</sub>	ApxI	LPS
Estándar, exp. 1	12	2.99	520	4.10
Estándar, exp. 2	11	3.11	643	6.10
Enriquecido con CO <sub>2</sub> , exp. 1	6	3.08	1074	3.36
Enriquecido con CO <sub>2</sub> , exp. 2	5	2.99	1774	5.48

- 25 **[0024]** Como se discierne de la Tabla 2, para ApxI se pueden obtener resultados comparables.

- 30 **[0025]** En un tercer experimento, el efecto del dióxido de carbono que atravesó el medio se estudió utilizando un medio ACF como se ha descrito anteriormente. Se llevó a cabo un primer cultivo en un fermentador SIXFORS sin añadir dióxido de carbono extra para que atravesara el medio. Un segundo cultivo se llevó a cabo en un fermentador Biostat C, con dióxido de carbono atravesando el medio como se ha indicado en líneas superiores. Debido al hecho de que en un fermentador Biostat se pueden controlar algo mejor las condiciones, se esperaba que el rendimiento de la toxina Apx, con todos los parámetros iguales, fuera dos veces superior (tres veces como mucho) al del fermentador SIXFORS. Los resultados se recogen en la Tabla 3.

**Tabla 3**

Método de cultivo	Tiempo (h)	OD660	ApxIII
ACF, no enriquecido con CO <sub>2</sub>	7	4.00	1003
ACF, enriquecido con CO <sub>2</sub>	4.75	3.13	4575

**[0026]** Puesto que el nivel de ApxIII en el fermentador Biostat es unas 4½ veces superior, se puede concluir que el dióxido de carbono conducido a través del medio tiene un efecto positivo en el rendimiento de producción de Apx, también cuando se utiliza un medio ACF.

- 5 **[0027]** En un cuarto experimento (quedando al margen del alcance de la presente invención), realizado en un fermentador SIXFORS con una cepa APP 10, se investigó si se podía añadir calcio en forma de borogluconato complejo (en lugar de calcio no complejado). La concentración de borogluconato podía variar entre 40, 50 y 70 mM. Se paró el cultivo al final de la fase de crecimiento exponencial. Los resultados aparecen recogidos en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Método de cultivo	ApxI
ACF-alt, sin calcio añadido, 5% CO <sub>2</sub>	0
ACF-alt, 40 mM borogluconato de calcio añadido, 5% CO <sub>2</sub>	520
ACF-alt, 50 mM borogluconato de calcio añadido, 5% CO <sub>2</sub>	357
ACF-alt, 70 mM borogluconato de calcio añadido, 5% CO <sub>2</sub>	222

10

**[0028]** De los resultados expuestos se puede concluir que el calcio debe estar presente en forma de borogluconato de calcio complejo con el fin de obtener niveles suficientes de ApxI. La ventaja del presente experimento muestra que la precipitación del calcio no influye negativamente en el procesamiento en cadena del medio (en particular, en la acción de filtrado). Concentraciones superiores de borogluconato influyen negativamente el rendimiento de la producción.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Método para producir toxinas RTX Ap<sub>VI</sub> o Ap<sub>XIII</sub> a través del cultivo de la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un medio de cultivo líquido que soporta el crecimiento de la bacteria, **caracterizado por que** se deja pasar aire a través del medio durante la fase de producción de las toxinas RTX; donde el  
5 aire comprende más de un 0,04 % de volumen de dióxido de carbono sobre el volumen total de aire.
2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el aire ha pasado durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medio es tamponado, **caracterizado por que** el medio es tamponado utilizando un bicarbonato.
- 10 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el aire atraviesa el medio a través de un flujo constante.
5. Método según la reivindicación 4, **caracterizado por que** el aire se deja pasar de manera continuada durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- 15 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el contenido de dióxido de carbono es de hasta un 10 % v/v.
7. Método según la reivindicación 6, **caracterizado por que** el contenido de dióxido de carbono es de un 5 % v/v.