

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 993**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12P 19/04** (2006.01)

**A61K 39/102** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2015 PCT/FR2013/051549**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006318**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2013 E 13744668 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2885397**

54 Título: **Método para producir antígenos de Haemophilus influenzae de tipo b**

30 Prioridad:

**02.07.2012 FR 1256329**

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

**17.09.2018**

73 Titular/es:

**SANOFI PASTEUR (100.0%)  
14 espace Henry Vallée  
69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**LE HIR, JÉRÔME;  
LOUBIERE, PASCAL;  
BARBIRATO, FABIEN y  
LINDLEY, NICHOLAS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 681 993 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

Método para producir antígenos de *Haemophilus influenzae* de tipo b

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir, a escala industrial, polisacáridos capsulares de *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib), según el cual se cultiva una cepa de Hib en un medio de cultivo concreto, cuya composición está químicamente definida y el cual, por lo tanto, no comprende una fuente compleja de nitrógeno ni de carbono.

10 La técnica anterior, y en particular la solicitud W2009/007641, describe un medio de cultivo mejorado para *Haemophilus influenzae* de tipo b, que no comprende ningún elemento procedente de una fuente animal, como se recomienda cuando el objetivo del cultivo de *Haemophilus influenzae* de tipo b es producir un polisacárido capsular que se introducirá posteriormente como un antígeno en la composición de una vacuna. En el medio descrito en esta técnica anterior, la fuente de nitrógeno constituida normalmente por peptonas animales se reemplaza con peptonas vegetales.

15 Este tipo de medio representa un gran progreso desde el punto de vista de la seguridad de los productos farmacéuticos, en particular respecto a la eliminación del riesgo de transmisión de enfermedades tales como la encefalitis esponjiforme bovina; por lo tanto, estos medios hacen posible cumplir las recomendaciones de la autoridad sanitaria.

20 Sin embargo, la composición de las peptonas puede variar según los lotes proporcionados, lo que puede llevar a variaciones en las cantidades de bacterias producidas y también en los porcentajes de antígenos de interés, que los productores de vacunas tratan de limitar o corregir modificando ciertos parámetros durante la implementación del proceso. Sin embargo, en el contexto de la producción industrial de un producto farmacéutico, es deseable poder disponer de procesos robustos que requieran el menor número de modificaciones posible en cada implementación y cuyos resultados a cada paso sean reproducibles de un lote al otro.

25 Este tipo de procesos también debe permitir rendimientos que sean compatibles con la rentabilidad industrial, donde el criterio no es, en el caso de la producción de antígenos a partir de bacterias, obtener únicamente la mayor cantidad posible de bacterias, sino también obtener la mejor proporción entre el título de antígenos y la cantidad de bacterias producidas; por lo tanto, es deseable que la bacteria se cultive en condiciones que dirijan su metabolismo hacia la producción de un polisacárido capsular.

30 Con este objetivo, un objeto de la presente invención es un proceso para producir, a escala industrial, un polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo b (PRP) destinado a fines de vacunación, según el cual se cultiva una cepa de *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib) en un medio de cultivo y el sobrenadante del cultivo se recolecta y se trata con el fin de extraer el polisacárido capsular a partir de él, comprendiendo dicho medio de cultivo al menos:

- una fuente de carbono,
- protoporfirina,
- 35 - sales,
- aminoácidos,
- NAD o NADH,
- vitaminas,
- un medio para regular el pH,

40 caracterizado por que dicho medio de cultivo está químicamente definido, y comprende al menos zinc, en una cantidad que corresponde a aquella comprendida entre 2,5 y 80 mg/L de ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, y por que la relación PRP/LPS (en masa) es superior a aquella obtenida en un mismo medio que no contiene Zinc.

45 Gracias a la invención, es posible tanto disponer de un proceso industrial robusto como incrementar la producción de un polisacárido capsular, sin tener que incrementar en consecuencia la biomasa, lo que por lo tanto hace posible reducir la cantidad de lipopolisacáridos (LPS) producidos respecto a la cantidad de PRP producido.

Además, la ausencia de proteínas en la composición del medio de cultivo reduce los requisitos necesarios desde el punto de vista de un producto antiespuma y simplifica el paso de purificación que hace posible obtener el antígeno constituido por el polisacárido capsular a partir del sobrenadante del cultivo.

50 Según la invención, el medio de cultivo comprende un medio regulador del pH. Estos medios reguladores del pH pueden estar constituidos por sales tamponadas y/o un medio para medir el pH combinados con un medio para añadir tanto un ácido como una base al medio. Los rendimientos se pueden optimizar mediante la regulación del pH.

Según una realización, el proceso según la invención también consiste en conjugar el PRP producido con una proteína portadora, tal como la proteína del tétanos.

Un proceso para preparar una composición para una vacuna también es un objeto de la invención, según el cual:

- se prepara un antígeno contra *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib), constituido por el polisacárido capsular (PRP), según el proceso de PRP de la invención,
- el polisacárido capsular se conjuga con una proteína portadora.

5 Según una realización, el conjugado obtenido también se combina con al menos uno o más antígenos destinados para la vacunación contra una o más de las siguientes infecciones: difteria, tétanos, polio, hepatitis B, varicela, paperas, rubeola, infecciones causadas por *Neisseria meningitidis* o *Streptococcus pneumoniae*, infecciones causadas por un rotavirus, con el fin de obtener una vacuna combinada que permita la inmunización simultánea contra varias enfermedades.

10 Según el proceso de la invención, el medio de cultivo está químicamente definido, es decir, se conoce la estructura química y también la cantidad de cada uno de los componentes. Este tipo de medio está exento de una fuente compleja de nitrógeno o de carbono, tal como peptonas, caseínas, suero o similares y, por lo tanto, si se desea, se puede garantizar que no contiene elementos originados directamente a partir de un animal.

15 La invención se refiere a un proceso para producir, a escala industrial, un polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo b. Un proceso de este tipo permite obtener rendimientos de biomasa y de polisacáridos capsulares o PRP que son compatibles con las restricciones industriales. Un proceso de este tipo permite, en particular, obtener, a partir de una cepa de *Haemophilus influenzae* de tipo b que tiene en su código genético al menos 2 copias del locus *cap* que codifica las funciones que permiten la síntesis capsular, sin una regulación particular del medio (tal como el pH o pO<sub>2</sub>), una biomasa correspondiente a una D.O. a 694 nm de al menos 2.4, tras 12 horas de cultivo, y una cantidad asociada de PRP de al menos 240 mg/litro de medio de cultivo. La determinación de la

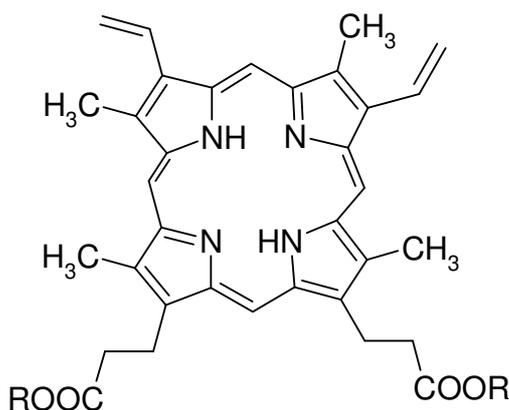
20 cantidad de PRP producida se mide por medio de una cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con una técnica de detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD, por sus siglas en inglés) (Dionex) o un método que proporciona resultados equivalentes. Ventajosamente, el proceso según la invención permite obtener una cantidad de PRP de al menos 270 mg/litro de medio e, incluso más ventajosamente, una cantidad de al menos 300 mg/litro.

25 Entre las fuentes posibles de carbono, cabe mencionar todas aquellas que puedan ser metabolizadas por la cepa de *Haemophilus influenzae* de tipo b y en particular: glucosa, fructosa, galactosa, glicerol, xilosa, ribosa, fucosa, ácido siálico y lactato. También es posible utilizar 2 o más fuentes diferentes, en particular, lactato y glucosa.

Según la invención, la cantidad de glucosa presente en el medio de partida está comprendida entre 5 y 25 g/L, más particularmente entre 10 y 20 g/L y más particularmente entre 12 y 16 g/L.

30 La cantidad de lactato presente en el medio de partida puede estar comprendida entre 0 y 15 g/L y más particularmente entre 0.5 y 10 g/L.

Según una realización de la invención, la protoporfirina del medio es protoporfirina sintética, por ejemplo, la proporcionada por la compañía Sigma-Aldrich con la referencia 258385 (sal disódica de protoporfirina). Por lo tanto, es posible utilizar un medio del que se pueda garantizar que está totalmente exento de una sustancia de origen animal. Como alternativa, se utiliza protoporfirina IX sintética, cuya fórmula es la siguiente:



donde R designa H, o un contraión, preferentemente un contraión de un metal alcalino, en particular sodio.

Una protoporfirina IX de este tipo, y el método para prepararla, se han descrito en la solicitud de patente FR 2 914 302.

40 Según la invención, la cantidad de protoporfirina presente en el medio de partida está comprendida ventajosamente entre 0.1 y 10 mg/L y más particularmente entre 0.25 y 2 mg/L.

El medio de cultivo según el proceso de la invención comprende sales que proporcionan los minerales necesarios para el crecimiento celular, lo que permite asegurar una presión osmótica favorable para la bacteria y que también ejerce una capacidad tamponante sobre el pH.

- 5 Preferentemente, se utiliza una mezcla de cationes monovalentes tales como  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{K}^+$ , de cationes divalentes tales como  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ , de aniones fosfato en forma de  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y/o  $\text{PO}_4^{--}$  y de aniones  $\text{SO}_4^-$  y  $\text{Cl}^-$  en forma de soluciones salinas, donde las molaridades de cada una de ellas pueden variar normalmente en un intervalo de concentración comprendido entre  $10^{-4}$  mM y 1000 mM.

Las sales presentes en el medio de cultivo se escogen en particular entre:

- 10  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CoCl}_2$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ .

Las concentraciones salinas se escogen con el fin de tener una osmolaridad comprendida entre 200 y 700 miliosmol/L, en particular entre 300 y 400 miliosmol/L, especialmente 350 miliosmol/L y un pH comprendido en el intervalo de 6.5 a 7.5.

Por esto, el medio de cultivo según el proceso de la invención puede comprender en particular:

- 15 -  $\text{MgSO}_4$ . 7  $\text{H}_2\text{O}$  con una concentración comprendida entre 150 y 1500 mg/L,  
 -  $\text{CaCl}_2$ . 2  $\text{H}_2\text{O}$  con una concentración comprendida entre 6.5 y 52 mg/L,  
 -  $\text{FeSO}_4$ . 7  $\text{H}_2\text{O}$  con una concentración comprendida entre 1.25 y 10 mg/L,  
 -  $\text{ZnSO}_4$ . 7  $\text{H}_2\text{O}$  con una concentración comprendida entre 2.5 y 80 mg/L,  
 -  $\text{CoCl}_2$ . 6  $\text{H}_2\text{O}$  comprendido entre 0.5 y 2 mg/L,  
 20 -  $\text{MnSO}_4$ .  $\text{H}_2\text{O}$  comprendido entre 2.5 y 10 mg/L,  
 - sodio, en particular en forma de lactato de sodio al 60% en una cantidad comprendida entre 0 y 4 mL/L,  
 -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con una concentración para cada uno de ellos comprendida entre 100 y 1200 mg/litro cuando el efecto tamponante lo proporciona  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .12  $\text{H}_2\text{O}$ / $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . 2  $\text{H}_2\text{O}$ ,  
 -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .12  $\text{H}_2\text{O}$  con una concentración comprendida entre 15 y 120 g/L,  
 25 -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . 2  $\text{H}_2\text{O}$  con una concentración entre 10 y 30 veces inferior a la de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .12  $\text{H}_2\text{O}$ .

Como alternativa, es posible que el efecto tamponante lo proporcione el par  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; en este caso, la concentración de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  está comprendida entre 15 y 120 g/L y la concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  es entre 10 y 30 veces inferior que la de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; la concentración de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .12  $\text{H}_2\text{O}$  y de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . 2  $\text{H}_2\text{O}$  puede estar entonces entre 100 y 1200 mg/litro.

- 30 Entre las sales mencionadas, se puede señalar que la presencia de zinc es particularmente ventajosa para la producción de biomasa y de PRP, en particular en una concentración comprendida en el intervalo entre 2.5 y 80 mg/L o, más particularmente, entre 5 y 20 mg/L. Se han obtenido resultados muy buenos con una concentración de 20 mg/L.

- 35 En el caso en el que el pH del medio de cultivo se regula durante la fase de cultivo mediante la adición en particular de una base sumamente concentrada tal como  $\text{NaOH}$  o  $\text{KOH}$ , es posible reducir la cantidad de sales presente en el medio y, en particular, la cantidad de los pares tamponantes  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , o  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  siempre que, sin embargo, la osmolaridad se mantenga en un valor adecuado, es decir, entre 200 y 700 mOsm/L, mediante una adición opcional de  $\text{NaCl}$ .

- 40 Según el proceso de la invención, el medio de cultivo también comprende NAD o una fuente de NAD o de cualquier otra coenzima equivalente. NAD (o dinucleótido de  $\beta$ -nicotinamida y adenina), también denominado coenzima I o factor V, es un factor de crecimiento esencial para el cultivo de *Haemophilus influenzae* de tipo b. Está ventajosamente presente con una concentración comprendida entre 0.5 y 50 mg/L y, más particularmente, entre 2 y 10 mg/L, en particular 5 mg/L de medio de cultivo. Se puede introducir en el medio como NADH, su forma reducida. Como alternativa al NAD, el medio de cultivo según la invención puede comprender elementos precursores de NAD  
 45 que las bacterias serán capaces de utilizar, tales como NADP/NADPH (fosfato de dinucleótido de  $\beta$ -nicotinamida y adenina) o NMN (mononucleótido de  $\beta$ -nicotinamida y adenina) o NR (ribósido de nicotinamida), dinucleótido de 3-acetilpiridina y adenina (APAD) o mononucleótido de 3-acetilpiridina (APMN).

- Según el proceso de la invención, el medio de cultivo contiene aminoácidos que se escogen ventajosamente entre:  
 50 arginina, alanina, lisina, histidina, triptófano, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, cistina (o un equivalente), asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico.

Una formulación del medio de cultivo comprende únicamente arginina, alanina, histidina, triptófano, tirosina, fenilalanina, cistina, ácido aspártico y ácido glutámico. Como alternativa, todos los aminoácidos mencionados están presentes en el medio de cultivo.

Según un modo particular de la invención, la cistina se reemplaza con glutatión o cisteína.

Según una realización preferida, el proceso según la invención utiliza un medio de cultivo exento de los siguientes aminoácidos: L-metionina, L-glicina, L-prolina, L-serina y L-treonina. Esto se debe a que la presencia de estos aminoácidos da como resultado un incremento en la biomasa, pero no el incremento correspondiente en la producción de PRP.

5 Sigma suministra los aminoácidos suministrados en forma de polvos muy puros. De manera particularmente ventajosa, estos aminoácidos tienen un origen sintético o se han obtenido gracias a procesos que garantizan el hecho de que no contienen ningún elemento originado directamente a partir de un animal, con el fin de excluir cualquier riesgo de contaminación por infecciones transmisibles y, en particular, por BSE (siglas en inglés de la encefalitis espongiforme bovina).

10 Las cantidades de cada aminoácido se escogen con el fin de optimizar el crecimiento celular y la producción de PRP. Las cantidades de ácido aspártico, de asparagina y de glutamina se escogen de modo que causen una deficiencia durante el cultivo celular, para permitir de esta manera dirigir el metabolismo de la célula hacia la producción del polisacárido capsular, mientras que las cantidades de los otros aminoácidos se escogen de modo que no haya deficiencia durante la fase de cultivo.

15 Según el proceso de la invención, el medio de cultivo también contiene vitaminas que se escogen entre: tiamina, pantotenato, uracilo, hipoxantina, biotina, riboflavina y piridoxina. A efectos de la invención, el término "vitaminas" también engloba uracilo e hipoxantina, que son bases nitrogenadas.

De manera particularmente ventajosa, las vitaminas presentes en el medio de cultivo tienen un origen no animal, en particular, un origen sintético, para permitir de esta manera excluir cualquier riesgo de contaminación por infecciones transmisibles y, en particular, por BSE (encefalitis espongiforme bovina). Se utilizan, en particular, vitaminas suministradas por Sigma, cuyo grado de pureza se conoce con exactitud, lo que permite de este modo una dosificación muy exacta durante la preparación del medio de cultivo.

20 Las cantidades de vitaminas presentes en el medio se escogen con el fin de optimizar la producción de biomasa y de PRP.

25 Según un modo particular de la invención, el medio de cultivo comprende citrulina que se puede sustituir por arginina y por uracilo.

En este caso, la cantidad de citrulina incluida en el medio de cultivo está comprendida ventajosamente entre 150 y 500 mg/L.

30 Gracias al medio de cultivo según el proceso de la invención, ha sido posible producir fosfato de polirribosil-ribitol en una cantidad mayor que cuando se utiliza un medio según la técnica anterior, a la vez que no se consumen más carbohidratos, y no se producen más contaminantes, en particular LPS.

Según una realización de la invención, la cepa de *Haemophilus influenzae* de tipo b cultivada es una cepa encapsulada que tiene al menos 2 copias del locus *cap* en su código genético. Este locus *cap*, con un tamaño comprendido entre 17 y 18 kb, agrupa genes cuya expresión está ligada a la síntesis y exportación de la cápsula.

35 La expresión de la cápsula proporciona a la bacteria un color blanco cuando se cultiva en un agar específico; las colonias de bacterias que tienen este locus *cap* se denominan en consecuencia "colonias blancas", mientras que las bacterias que no exportan el polisacárido capsular a la superficie de la cápsula se denominan "colonias grises". La expresión de la cápsula está sometida a una inestabilidad genética potencial, que puede conducir a la aparición de mutantes deficientes en la cápsula, lo que conllevaría, en consecuencia, a un descenso en la producción de PRP.

40 Los estudios han permitido demostrar que el medio definido químicamente utilizado en el proceso según la invención permite asegurar una buena estabilidad genética de la cepa utilizada durante aproximadamente veinte generaciones celulares.

Según la invención, es posible realizar el cultivo de la bacteria de *Haemophilus influenzae* de tipo b en varios pasos sucesivos de modo que se incremente gradualmente la biomasa.

45 En este caso, las bacterias que se originan a partir de una muestra liofilizada o congelada se inoculan en volumen de medio que generalmente no excede 1 litro. Después de cultivar toda la noche o cuando la densidad óptica del medio es suficiente, este primer cultivo se transfiere a un segundo medio de cultivo idéntico al primero, pero cuyo volumen puede ser hasta 10-20 superior. La cantidad de bacterias inoculadas en el segundo medio se ajusta de modo que la densidad óptica (D.O.) inicial del segundo medio de cultivo a 694 nm esté comprendida entre 0.2 y 0.4,

50 de modo que se favorezca un rápido crecimiento de la población bacteriana. Este segundo cultivo se realiza normalmente en un fermentador, pero se pueden utilizar otros tipos de recipientes (matraces, recipientes de agitación, etc). Cuando el cultivo se realiza en un fermentador, normalmente se utilizan una temperatura de 37 °C +/- 1 °C, agitación constante, una presión de 0.1 bar, una pO<sub>2</sub> de un 30% y un caudal de aire de 0.25 volúmenes de gas por volumen de medio por minuto durante la duración del cultivo. Está dentro de la competencia de los expertos en la técnica la elección de otros parámetros para este tipo de cultivo. Al final de la fase de crecimiento bacteriano

55 exponencial, la biomasa se puede amplificar adicionalmente transfiriéndola a otro fermentador de mayor capacidad

utilizando el mismo procedimiento y así sucesivamente. Los volúmenes de cultivo obtenidos pueden alcanzar, o incluso exceder, los 1000 litros. El cultivo o cultivos se realizan generalmente según el modo "discontinuo".

5 Finalmente, se toma el sobrenadante del cultivo final tras la inactivación de las bacterias. La inactivación se lleva a cabo habitualmente utilizando una solución de formol con una concentración final de un 0.35%-0.37% (v/v). El sobrenadante se separa habitualmente de la bacteria por medio de un paso de centrifugación. El PRP contenido en el sobrenadante resultante se extrae a continuación y se purifica según procesos habituales muy conocidos por los expertos en la técnica.

10 El PRP recolectado y purificado se conjuga ventajosamente a continuación a una proteína portadora tal como la proteína del tétanos, con el fin de convertirlo en dependiente de los linfocitos T y de hacer posible, en particular, la inmunización de niños pequeños. El antígeno PRP-T obtenido de esta manera se puede utilizar a continuación solo en una vacuna monovalente o combinado con otros antígenos con el fin de hacer posible la vacunación simultánea contra varias enfermedades.

15 De manera particularmente ventajosa, la presente invención proporciona un proceso para preparar una composición para una vacuna, según la cual el conjugado obtenido se combina con al menos uno o más antígenos presentes normalmente en vacunas pediátricas y, en particular, antígenos contra la difteria, tétanos, poliomielitis, hepatitis B, infecciones causadas por *Neisseria meningitidis* o por *Streptococcus pneumoniae*, varicela, paperas, rubeola, infecciones causadas por un rotavirus, etc.

20 Según una realización, el conjugado PRP-T está presente en forma de polvo, mientras que otros antígenos están en forma líquida, mezclándose todos los antígenos de manera improvisada antes de la administración; según una realización alternativa, la composición para la vacuna es enteramente líquida.

25 El proceso de preparación según la invención permite de esta manera preparar una combinación para una vacuna cuadrivalente que comprende, además del conjugado PRP-T, antígenos de la difteria, tétanos y hepatitis B. Como alternativa, permite preparar una combinación para una vacuna cuadrivalente que comprende, además del conjugado PRP-T, el toxoide diftérico, toxoide tetánico y 2 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis* (toxoides y hemaglutinina filamentosa) o 3 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis* (los dos anteriores + pertactina) o además 5 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis* (los tres anteriores + los aglutinógenos).

También permite preparar una combinación para una vacuna pentavalente que comprende, además del conjugado PRP-T, el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, 2, 3 o 5 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis* y también poliovirus inactivados de tipo 1, 2 y 3.

30 También permite preparar una combinación para una vacuna hexavalente que comprende, además del conjugado PRP-T, el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, 2, 3 o 5 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis*, hepatitis B y también poliovirus inactivados de tipo 1, 2 y 3. Una combinación hexavalente de este tipo puede, en particular, ser líquida y puede comprender, por 0.5 mL de dosis:

- 35
- el toxoide diftérico en una cantidad de 20 IU,
  - el toxoide tetánico en una cantidad de 40 IU,
  - el antígeno superficial de la hepatitis B en una proporción de 10 µg,
  - el toxoide de *pertussis* en una proporción de 25 µg,
  - la hemaglutinina filamentosa de *pertussis* en una proporción de 25 µg,
  - PRP-T en una proporción de 12 µg de PRP,

40

    - poliovirus inactivados de tipo 1, 2 y 3 en una cantidad respectiva de 40, 8 y 32 DU
    - hidróxido de aluminio en una proporción de 0.6 mg de Al<sup>3+</sup>.

Como alternativa, permite preparar combinaciones para vacunas en las que los antígenos de la tosferina están constituidos por la bacteria *Bordetella pertussis* íntegra.

45 Gracias al proceso del cultivo según la invención, es posible incrementar la producción de fosfato de polirribosil-ribitol, sin incrementar la cantidad de biomasa, para permitir de esta manera reducir la cantidad de LPS contaminantes; esta ventaja del proceso según la invención es muy importante para la industria de las vacunas, donde estos productos se introducen en composiciones para vacunas como antígenos y donde las cantidades de LPS se deben reducir al mínimo. El disponer de un proceso que permite no incrementar la cantidad de LPS producida por una cantidad mayor de PRP ofrece la posibilidad de simplificar el proceso de purificación posterior.

50 Ejemplo 1: Preparación de un medio de cultivo según el proceso de la invención

Se preparó un medio de cultivo según el proceso de la invención a partir de medio básico al cual se añadieron de manera improvisada soluciones de enriquecimiento.

La composición del medio básico se indica en la tabla I a continuación:

Tabla I:

Compuestos	Cantidades en mg para 1 L	proveedor	ref. del producto
lactato de sodio al 60%	1.5 mL	Prolabo	27925.292
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	300	VWR Prolabo	26931.263
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300	VWR Prolabo	26923.298
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	368	VWR Prolabo	25165.260
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	28620	VWR Prolabo	28028.298
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1870	VWR Prolabo	28015.294
L-Arginina	87	Sigma	A5006 o A8094
L-Alanina	134	Sigma	A7627 o A7469 o A4349
L-Asparagina	198	Sigma	A0884 o A7094
L-Lisina	140	Sigma	L5626 o L8662 o L7039
L-Glutamina	220	Sigma	G3126 o G8540 o G5792
L-Histidina	78	Sigma	H8000 o H6034 o H3911
L-Triptófano	200	Sigma	T0254 o T8941 o T4196
L-Valina	115	Sigma	V0500 o V0513 o V4638
L-Isoleucina	130	Sigma	I2752 o I7403 o I5281
L-Leucina	130	Sigma	L8000 o L6914 o L8912
L-Tirosina	180	Sigma	T3754 o T8566 o T4321
L-Fenilalanina	165	Sigma	P5482
L-Cistina	61	Sigma	C8755 o C7602 o C5735
Ácido L-aspártico	1065	Sigma	A9256 o A5474
Ácido L-glutámico	1471	Sigma	G1251 o G8415
Piridoxina·HCl	4	Sigma	P5669
Riboflavina	0.2	Sigma	R4500
Tiamina·HCl	4	Sigma	T4625
Biotina	4	Sigma	B4501
Ca pantotenato	4.5	Sigma	P5710
Uracilo	70	Sigma	U0750
Hipoxantina	20	Sigma	H9377
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5	Aldrich	450278
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	Sigma	Z4750
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1	Fluka	60818
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5	Sigma	M7634
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	13	Panreac	131232.1211

Para preparar 1 litro de medio, se añadieron diversos compuestos, en el orden descrito en la tabla anterior, a aproximadamente 100 mL de agua desmineralizada, con agitación utilizando una barra magnética. Antes de la adición, todos los polvos se habían disuelto previamente en un pequeño volumen de agua desmineralizada, en ciertos casos, con la adición de ácido o base.

- 5 Por lo tanto, para la valina, isoleucina y leucina, fue necesario añadir, a las cantidades indicadas en la tabla, 140 µL de KOH 10 N; a la tirosina, fue necesario añadir 280 µL de KOH 10 N; a la fenilalanina, fue necesario añadir 210 µL de HCl al 37% y a la cistina fue necesario añadir 70 µL de HCl al 37%.

Finalmente, se ajustó el pH a  $7.2 \pm 0.1$  con KOH 10 N (en caso de que el pH hubiera sido demasiado elevado, se habría utilizado HCl al 37%), a continuación se utilizó agua desmineralizada para alcanzar el volumen deseado.

- 10 A continuación se esterilizó el medio mediante una filtración sobre un filtro que tenía un valor de corte de 0.22 µm.

De este modo fue posible almacenar el medio durante 72 horas a 5 °C.

Antes de la inoculación del medio, se añadió lo siguiente:

- 27.3 mL de glucosa con 512.8 g/L preparada a partir de D(+)-glucosa anhidra suministrada por la compañía VWR con la referencia 24379.294,

- 5 - 5 mL de una solución de NAD con 1 g/L, suministrada por la compañía Sigma con el nombre dinucleótido de  $\beta$ -nicotinamida y adenina hidratado (ref. 43410),  
 - 4 mL de una solución madre que comprendía protoporfirina con una concentración de 0.25 g/L e hidróxido de amonio con una concentración de 5 mL/L; donde la compañía Sigma Aldrich suministró la protoporfirina con el nombre de sal disódica de protoporfirina IX (ref. 258385) y la compañía VWR el hidróxido de amonio con el nombre de solución de amoniaco al 28% (ref. 21190.292),

con el fin de obtener 1 litro de medio listo para ser inoculado y que comprendía, además de los elementos descritos en la tabla I anterior, los siguientes elementos adicionales con las concentraciones indicadas en la siguiente tabla II:

Tabla II:

Compuestos	Concentración antes de la inoculación en el medio
Protoporfirina	1 mg/L
Amoniaco acuoso	17.7 mg/L
Glucosa anhidra	14 g/L
NAD	5 mg/L

10 Ejemplo 2: Preparación de un medio de cultivo según la técnica anterior

Se preparó un medio de cultivo según la técnica anterior añadiendo soluciones de enriquecimiento específicas a un medio básico.

La composición del medio básico se indica en la tabla III a continuación:

Tabla III:

Compuestos	Concentración en el medio básico
Peptona de guisante	7.42 g/L
Lactato de sodio al 60%	1.5 mL/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	31.14 g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.03 g/L
Cistina (L)	0.07 g/L
HCl (10 N)	0.07 mL/L
Triptófano (L)	0.02 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02 g/L

- 15 Para preparar este medio básico, se añadió cada uno de los elementos, en el orden en el que se indican en la tabla, a 100 mL de agua desmineralizada agitada de manera continua utilizando una barra magnética. Cada uno de los elementos, suministrado en forma de polvo, se había disuelto previamente en un volumen pequeño de agua desmineralizada.

- 20 La peptona de guisante procede de la compañía Kerry y se comercializa con la referencia Hy-pea 7404. El  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lo suministra la compañía VWR con la referencia 21333.296. Los otros elementos proceden de los mismos proveedores y se suministran con las mismas referencias que aquellas descritas en el ejemplo 1 para la preparación del medio según el proceso de la invención.

El pH final se ajustó a  $7.2 \pm 0.1$  con KOH 10 N (en caso de que el pH hubiera sido demasiado elevado, se habría utilizado HCl al 37%).

- 25 A continuación se añadió agua desmineralizada con el fin de obtener el volumen deseado y a continuación se esterilizó por autoclavado, según un ciclo de 30 minutos a 120 °C.

Una vez esterilizado, el medio se pudo almacenar durante 15 días a 4 °C.

Las soluciones de enriquecimiento A, B, C y D se añadieron a este medio básico.

La solución A es una solución que comprende glucosa anhidra con la concentración de 512.8 g/L, suministrada por la compañía VWR con el nombre de D(+)-glucosa anhidra (ref. 24379.294).

La solución B es una solución madre que comprende NAD con la concentración de 1 g/L, suministrada por la compañía Sigma con el nombre de dinucleótido de β-nicotinamida y adenina hidratado (ref. 43410).

- 5 La solución C es una solución madre que comprende protoporfirina con la concentración de 0.25 g/L e hidróxido de amonio con la concentración de 5 mL/L; donde la compañía Sigma Aldrich suministró la protoporfirina con el nombre de sal disódica de protoporfirina IX (ref. 258385) y la compañía VWR el hidróxido de amonio con el nombre de solución de amoniaco al 28% (ref. 21190.292).

- 10 La solución D es una solución concentrada que comprende un ultrafiltrado de un extracto de levadura autolítico (Ufel) con 125 g/L; lo suministra la compañía Biospringer con el nombre Ultrafiltrat d'extrait autolytique de levure (Ufel) [Ultrafiltrado de extracto de levadura autolítico] (Ref. de springer 0701).

Cada una de estas soluciones se esterilizó por filtración en un filtro cuyo valor de corte fue de 0.22 μm.

Se añadió lo siguiente a 1 litro de medio básico:

- 15 - 35.1 mL de solución A  
 - 5 mL de solución B  
 - 4 mL de solución C  
 - 40 mL de solución D.

- 20 La adición de cada una de estas soluciones al medio básico se llevó a cabo en una campana de flujo laminar y dio como resultado un medio de cultivo que tenía, antes de la inoculación, además de los elementos mencionados en la tabla III anterior, los siguientes elementos adicionales en la concentración indicada en la siguiente tabla IV:

Tabla IV:

Compuestos	Concentración antes de la inoculación en el medio
Ultrafiltrado de extracto de levadura autolítico (Ufel)	4.9 g/L
Protoporfirina	1 mg/L
Amoniaco acuoso	17.7 μg/L
Glucosa anhidra	18 g/L
NAD	5 mg/L

Ejemplo 3: Comparación de la producción de PRP con un medio según el proceso de la invención como el descrito en el ejemplo 1 y un medio de la técnica anterior como el descrito en el ejemplo 2

Estos experimentos comparativos se llevaron a cabo según un protocolo de cultivo de 2 pasos:

- 25 - un paso de precultivo en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1 litro sin deflectores, a 36 °C con agitación a 130 rpm (revoluciones por minuto), durante un periodo de 8 horas, al final del cual la cepa está al final de la fase de crecimiento lineal; este precultivo se inicia inoculando 280 mL de medio de cultivo con un inóculo de bacterias de *Haemophilus influenzae* de tipo b que contiene al menos 2 copias del locus *cap*, con una concentración de un 0.5% (volumen/volumen);
- 30 - a continuación una transferencia de 90 mL del precultivo permitió inocular un fermentador Biostat B plus de 2 litros que contenía 1.8 litros de medio de cultivo. Este fermentador se mantuvo a 37 °C, con una agitación de 400 rpm, con una aireación de 0.45 lpm (litros por minuto) durante 12 horas.

- 35 Tras 12 horas de cultivo, se midió la D.O. a 694 nm, lo que permitió determinar la biomasa. Esto es debido a que, durante ensayos previos, fue posible determinar que una unidad de densidad óptica medida a 694 nm correspondía a 0.64 g de biomasa (masa seca)/litro.

- 40 La cantidad de PRP total en el sobrenadante del cultivo se determinó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con una detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), según un método muy similar al descrito en la publicación de Sturgess *et al.* (*Vaccine* 17 (1999) 1169-1178). Se filtró el sobrenadante del cultivo haciéndolo pasar a través de un filtro de 0.22 μm y a continuación se ultrafiltraron 500 μL del sobrenadante mediante la utilización de ultracolumnas Amicon con un valor de corte de 10 kDa (ref. de Millipore UFC5010BK) y a continuación se sometieron a un paso de hidrólisis básica añadiendo NaOH.

La hidrólisis se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas como mínimo.

Se controló la validez del ensayo utilizando un patrón interno, glucosamina-1-fosfato (GlcN1P), presente en la solución de hidrólisis, y haciendo pasar regularmente un control interno que tenía una concentración de PRP conocida. Con relación a las indicaciones de Sturgess *et al.*, la fase móvil estuvo compuesta de NaOH 35 mM y CH<sub>3</sub>COONa 114 mM y la fase de regeneración se llevó a cabo durante 10 minutos con NaOH 100 mM y CH<sub>3</sub>COONa 400 mM.

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente tabla V:

Tabla V:

	Medio según la invención (4 ensayos)	Medio de la técnica anterior (1 ensayo)
D.O. a 694 nm	2.52 ± 0.14	3.9
Biomasa en g de masa seca/litro de medio de cultivo	1.74 ± 0.09	2.6
Concentración de PRP en mg/litro de medio de cultivo	349 ± 22	169
Producción específica en mg de PRP/g de biomasa	199 ± 3	66

Los resultados muestran la ventaja del proceso según la invención para la productividad de PRP: en efecto se señala que, para el mismo volumen del medio de cultivo, aunque la biomasa obtenida fue mayor con un medio de cultivo según la técnica anterior, la cantidad de PRP fue, por otra parte, menor.

Ejemplo 4: Comparación de la cantidad de PRP y de LPS presente en un sobrenadante del cultivo según el proceso de la invención y en un sobrenadante de cultivo según un proceso de la técnica anterior

El cultivo de *Haemophilus influenzae* de tipo b se llevó a cabo de manera comparativa con un medio según el proceso de la invención y con un medio según la técnica anterior, en el modo descrito en el ejemplo 3 con la diferencia, sin embargo, de que el medio básico del proceso según la técnica anterior comprendió 10 g/L de un hidrolizado ácido de caseína suministrado por la compañía Solabia (ref. A1434) en lugar de la peptona de guisante presente en el medio según el ejemplo 3.

El tiempo de precultivo es, como en el ejemplo 3, de 8 horas y el tiempo de cultivo es de 12 horas.

Tanto la realización del ensayo de PRP como la realización del ensayo de LPS se llevaron a cabo por HPAEC-PAD; pero la realización del ensayo de LPS se llevó a cabo por la cuantificación de un monosacárido particular, heptosa, utilizando un intervalo patrón de LPS purificado que se había sometido al mismo protocolo y donde el control interno para este ensayo fue rhamnosa.

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente tabla VI:

Tabla VI:

	Medio según la invención (4 ensayos)	Medio según la técnica anterior (3 ensayos)
DO a 694 nm	2.5 ± 0.1	3.9 ± 0.3
Biomasa en g de masa seca/litro de medio	1.7 ± 0.1	2.5 ± 0.2
Concentración de LPS en mg/L de medio	5 ± 1	4.6 ± 1
Concentración de PRP en mg/L de medio	349 ± 22	17 ± 5
Relación PRP/LPS	74 ± 15	38 ± 6

Los resultados obtenidos muestran la ventaja del proceso según la invención, lo que permite reducir la cantidad de LPS producida respecto a la cantidad de PRP.

Esto representa una ventaja significativa del proceso según la invención, ya que simplifica en gran medida las operaciones de purificación, a la vez que mantiene al mismo tiempo un nivel apropiado de seguridad.

Ejemplo 5: Ensayo para evaluar la importancia del zinc

Se estudió la importancia de la presencia de zinc en el medio de cultivo.

A este efecto, se compararon 3 medios:

- un medio tal como el descrito en el ejemplo 1, denominado MS,
- un medio que tiene una composición idéntica a la del ejemplo 1, pero sin ZnSO<sub>4</sub>, denominado MS Zn-

- un medio tal como el descrito en el ejemplo 1, pero con una concentración de ZnSO<sub>4</sub> que es 4 veces superior, es decir, de 20 mg/L, denominándose dicho medio Ms Zn<sup>++</sup>.

A continuación se esterilizaron los medios mediante una filtración sobre un filtro que tenía un valor de corte de 0.22 µm.

- 5 En primer lugar, se llevó a cabo un paso de precultivo en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1 litro sin deflectores durante 16 horas a 36 °C agitando a 130 rpm, inoculando 280 mL de un medio como el descrito en el ejemplo 4 con una muestra congelada de una bacteria de *Haemophilus influenzae* de tipo b que tenía en el código genético al menos 2 copias del locus *cap*.

- 10 A continuación se lavaron 9.5 mL del precultivo en cada uno de los medios de cultivo que se iban a someter a ensayo, antes de la inoculación para el cultivo que se realizó cada vez en un matraz Erlenmeyer de policarbonato de 500 mL con deflectores que contenía 170 mL de medio de cultivo que se iba a someter a ensayo; el cultivo se realizó durante 12 horas a 37 °C y la agitación se realizó a 150 rpm.

- 15 Para cada medio se determinaron la biomasa, la concentración de PRP y también la cantidad de LPS al final del cultivo, del mismo modo descrito en los ejemplos 3 y 4 y se calcularon las relaciones PRP/biomasa y también LPS/biomasa y PRP/LPS.

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente tabla VII:

Tabla VII:

	MS	MS Zn-	MS Zn <sup>++</sup>
Biomasa en g de masa seca/litro de medio de cultivo	1.98	1.23	2.22
Concentración de PRP en mg/litro de medio de cultivo	319	203	372
Producción específica en mg de PRP/g de biomasa	160	165	167
Concentración de LPS en mg/litro de medio de cultivo	11.5	8.8	12.1
Relación LPS/biomasa en mg/g de biomasa	6.1	7.2	5.5
Relación PRP/LPS en mg/mg	30	23	31

Estos resultados mostraron que la presencia de zinc en el medio de cultivo permite incrementar significativamente la producción de biomasa y también la producción de PRP pero sin incrementar proporcionalmente la cantidad de LPS.

20 Ejemplo 6: Ensayos en un fermentador de 5 litros

- 25 El cultivo de *Haemophilus influenzae* de tipo b se llevó a cabo en el medio de cultivo descrito según la invención en el ejemplo 1, utilizando únicamente productos que los proveedores garantizaban que estaban exentos de componentes animales y utilizando protoporfirina sintética como se describe en la solicitud de patente FR 2 914 302 y suministrada por la compañía Solvias AG con el nombre: Sal disódica de protoporfirina IX (ref. SOL20402). Los ensayos se llevaron a cabo en el modo descrito en el ejemplo 3, con la excepción de que los fermentadores utilizados fueron fermentadores de 5 litros regulados a 37 °C, con agitación a 550 rpm y aireación a 0.5 lpm. El volumen de inóculo fue entonces de 280 mL, es decir, el precultivo íntegro del matraz Erlenmeyer.

La concentración de PRP y LPS se determinó según los protocolos descritos en los ejemplos 3 y 4.

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente tabla VIII:

30 Tabla VIII:

	Medio exento de componentes animales según la invención
D.O. a 694 nm	3.58
Biomasa en g de masa seca/litro de medio	2.29
Concentración de PRP en mg/L de medio	567
Producción específica en mg de PRP/g de biomasa	247

Estos resultados confirman los resultados anteriores y muestran la ventaja del proceso según la invención para obtener una gran cantidad de PRP.

Ejemplo 7: Comparación de la producción de biomasa y de PRP con un medido según la invención como el descrito en el ejemplo 1 y con un medio químicamente definido como el descrito en la técnica anterior

El cultivo de *Haemophilus influenzae* de tipo b se llevó a cabo en el medio de cultivo descrito según la invención en el ejemplo 1 y también en 8 medios descritos en publicaciones relacionadas con el cultivo de *Haemophilus influenzae* y presentadas como químicamente definidas.

Estos 8 medios se prepararon según las recomendaciones de los autores. Son, en orden cronológico, los medios de:

- 5 - Talmadge y Herriott: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (marzo de 1960), vol.2 N.º3, págs. 203-206),
- Butler: *J. gen. Microbiol.* (1962), 27, 51-60,
- Wolin: *J. Bacteriol.* vol.85, (1963) notas, págs. 253-254,
- Herriott *et al.* : *Journal of Bacteriology*, (febrero de 1970), vol. 101, N.º2, 513-516,
- 10 - Klein y Luginbuhl: *Journal of General Microbiology* (1979), 113, 409-411,
- Coleman *et al.* : *Journal of Clinical Microbiology*, (septiembre de 2003), vol.41, N.º9 págs. 4408-4410.

Las referencias de los productos utilizados para preparar estos 8 medios se reproducen en la siguiente tabla IX:

Tabla IX:

Productos	Proveedores	ref. del producto
Uridina	Sigma	U3003
Inosina	Sigma	I4125
Adenosina	Sigma	A4036
Guanina	Sigma	G6779
Guanosina	Sigma	G6264
Vitamina B12	Sigma	V2876
Citrulina	Sigma	C7629
Cloruro de colina	Fluka	26978
Timidina	Sigma	T9250
Inositol	Sigma	I5125
Dihidroclorhidrato de putrescina	Sigma	P5780
Nicotinamida	Sigma	N0636
Hematina porcina	Sigma	H3281
Hemina	Fluka	51280
Oleato de sodio	Sigma	O7501
Acetato de sodio	Fluka	71185
Ácido fólico	Sigma	F7876
Alcohol polivinílico	Sigma	341584
Trietanolamina	Sigma	90278
Tampón de glicilglicina	Libios	B-GLYGLY250
Tween 40	Sigma	P1504
Tween 80	Sigma	P1754
Tampón Tris	VWR	33621.260
etilendiaminotetraacetato	VWR	20302.180
HEPES	Sigma	H3375
Glutación	Sigma	G6013
Adenina	Sigma	A8626
Prolina	Sigma	P0380
Treonina	Sigma	T8625
Glicina	Sigma	G7126
Metionina	Sigma	M9625
Serina	Sigma	S4500
Glicerol	VWR	24387.292
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	VWR	26994.293
KCl	VWR	26764.298

MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	Panreac	131396.1211
NaCl	VWR	27810.295
NaHCO <sub>3</sub>	VWR	27778.260
NH <sub>4</sub> Cl	VWR	21236.291
RMPI 1640 con L-glutamina y HEPES 25 mM	Invitrogen	ref. anterior citada en la publicación de Coleman (2003) ref. 61870036 => nueva ref. 52400025
Piruvato de sodio MEM 100 mM	Invitrogen	ref. anterior citada en la publicación de Coleman (2003) ref. 11360070 => nueva ref. 11360039

A continuación se esterilizaron los medios mediante una filtración sobre un filtro que tenía un valor de corte de 0.22 µm.

5 En primer lugar, se llevó a cabo un paso de precultivo en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1 litro sin deflectores durante 16 horas a 36 °C agitando a 130 rpm, inoculando 280 mL de un medio como el descrito en el ejemplo 4 con una muestra congelada de una bacteria de *Haemophilus influenzae* de tipo b que tenía en el código genético al menos 2 copias del locus *cap*.

10 A continuación se lavaron 9.5 mL del precultivo en cada uno de los medios de cultivo que se iban a someter a ensayo, antes de la inoculación para el cultivo que se realizó cada vez en un matraz Erlenmeyer de policarbonato de 500 mL con deflectores que contenía 170 mL de medio de cultivo que se iba a someter a ensayo; el cultivo se realizó durante 12 horas a 37 °C y se agitó a 150 rpm.

Cada ensayo se llevó a cabo al menos 3 veces.

Para cada medio, se midió cada hora la D.O. a 694 nm y se determinó la concentración de PRP al final del cultivo, del mismo modo descrito en el ejemplo 3.

Los resultados de la D.O. se reproducen en la figura 1.

15 Los resultados de las determinaciones de PRP se indican en la siguiente tabla X:

Tabla X:

a las 12 h	D.O. a 694 nm	PRP (mg/L)
Medio según la invención	2.86 ± 0.12	320 ± 15
Talmadge	0.28 ± 0.10	20 ± 1
Butler	0.04 ± 0.00	2 ± 0
Wolin	0.04 ± 0.00	6 ± 0
Herriot Mic-cit	1.26 ± 0.15	138 ± 7
Herriot Mic	0.98 ± 0.13	101 ± 5
Klein MMA (cit)	0.38 ± 0.01	40 ± 2
Klein MMB	0.20 ± 0.03	27 ± 1
Coleman	1.43 ± 0.04	204 ± 10

Ejemplo 8: Producción de PRP a escala industrial (1000 litros)

20 Se preparó un medio de cultivo según la invención que tenía la composición del ejemplo 1, excepto para el zinc, donde la concentración es de 20 mg/L en lugar de 5 mg/L. Esto se debe a que el ejemplo 5 mostró que esta concentración permitía producir más PRP sin incrementar la cantidad de LPS.

El medio fue idéntico para los precultivos y el cultivo final, excepto para el pH (pH inicial de 7.2 ± 0.1, a continuación pH libre para los precultivos y pH regulado a 6.7 ± 0.1 para el cultivo de producción).

25 Se preparó el medio como en el ejemplo 1. Después de haber mezclado los compuestos disueltos previamente en un volumen pequeño de agua purificada con, en ciertos casos, la adición de ácido o de base (compare con el ejemplo 1) y antes de añadir la cantidad suficiente de agua purificada, se ajustó el pH a 7.2 ± 0.1 para los precultivos y a 6.7 ± 0.1 para el cultivo final (con hidróxido de potasio o hidróxido de sodio 10 N o HCl al 37%).

A continuación se esterilizó el medio mediante una filtración sobre un filtro que tenía un valor de corte de 0.22 µm.

De este modo fue posible almacenar el medio durante 72 horas a 5 °C.

Antes de la inoculación del medio, se añadió lo siguiente:

- glucosa con 512.8 g/L preparada a partir de D(+) glucosa anhidra suministrada por la compañía VWR con la referencia 24379.294,
- una solución de NAD con 1 g/L, suministrada por la compañía Sigma con el nombre dinucleótido de β-nicotinamida y adenina hidratado (ref. 43410),
- 5 - una solución madre que comprendía protoporfirina con una concentración de 0.25 g/L e hidróxido de amonio con una concentración de 5 mL/L; donde la compañía Solvias AG suministró la protoporfirina con el nombre de sal disódica de protoporfirina IX (ref. SOL20402) y la compañía VWR el hidróxido de amonio con el nombre de solución de amoniaco al 28% (ref. 21190.292),

10 con el fin de obtener un medio listo para ser inoculado, y que comprendía, además de los elementos descritos en la tabla I del ejemplo 1, los elementos adicionales con las concentraciones indicadas en la tabla II del ejemplo 1 (excepto la glucosa con una concentración final de 14.87 g/L en lugar de 14 g/L).

El proceso a escala de 1000 litros comprendió una serie de 3 precultivos:

- los primeros precultivos se realizaron en un matraz Erlenmeyer de 1 litro sin deflectores que contenía 290 mL de medio de cultivo completo, a 37 °C agitando a 130 rpm (revoluciones por minuto), durante un periodo de 17-18 horas. Estos precultivos se iniciaron inoculando el medio de cultivo con un inóculo de una bacteria de *Haemophilus influenzae* de tipo b que contenía al menos 2 copias del locus *cap*, con un nivel de inoculación que correspondía a una DO<sub>694 nm</sub> inicial objetivo de 0.014;
- 15 - la segunda serie de precultivo se realizó en un fermentador de 6.8 litros. Dos fermentadores que contenían 5.2 litros de medio de cultivo completo se inocularon, cada uno de ellos, con 260 mL de un precultivo de la serie 1. Estos fermentadores se mantuvieron durante 4 horas a 37 °C ± 1, con un pH inicial de 7.2 ± 0.2, una pO<sub>2</sub> mantenida al 30% con una cascada que conllevaba un incremento en la agitación (de 500 a 800 rpm), a continuación un incremento en la aireación (de 0.5 a 2.5 lpm) y a continuación un caudal de O<sub>2</sub> puro comprendido entre 0 y 6 lpm;
- 20 - la tercera serie de precultivos se realizó en un fermentador de 120 litros que contenía 57 litros de medio completo que se inoculó con 5.8 litros del precultivo originado en la serie 2. Este fermentador se mantuvo durante 3 horas 10 a 37 °C ± 1, con un pH inicial de 7.2 ± 0.2, una pO<sub>2</sub> mantenida al 30% con una cascada que conllevaba un incremento en la agitación (de 300 a 425 rpm), a continuación un incremento en la aireación (de 6 a 28 lpm) y a continuación un caudal de O<sub>2</sub> puro comprendido entre 0 y 50 lpm.

30 El cultivo industrial se realizó en un fermentador de 1000 litros que contenía 778 litros de medio completo que se inoculó con 39 litros de un precultivo de la serie 3. Este fermentador se mantuvo a 32 °C ± 1, con un pH regulado a 6.7 ± 0.2 (con una solución de hidróxido de sodio 2.5 N), una pO<sub>2</sub> mantenida al 70% gracias a una cascada que conllevaba un incremento en la agitación (de 100 a 230 rpm), a continuación un incremento en la aireación (de 70 a 150 lpm) y a continuación un caudal de O<sub>2</sub> puro comprendido entre 0 y 500 lpm. Además, se añadió antiespumante (Biospumex a un 4%) según se necesitara dependiendo del nivel de espuma.

35 Tras 12 horas de cultivo, se midió la D.O. a 694 nm, lo que permitió determinar la biomasa (según la correspondencia por la que una unidad de DO corresponde a 0.64 g de biomasa seca). La concentración de PRP y LPS se determinó según los protocolos descritos en los ejemplos 3 y 4.

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente tabla XI:

Tabla XI:

	<b>Medio según la invención (1 ensayo)</b>
D.O. a 694 nm	3.45
Biomasa en g de masa seca/litro de medio de cultivo	2.21
Concentración de PRP en mg/litro de medio de cultivo	865
Producción específica en mg de PRP/g de biomasa	392
Concentración de LPS en mg/litro de medio de cultivo	35.6
Relación LPS/biomasa en mg/g de biomasa	16.1
Relación PRP/LPS en mg/mg	24.3

40 Estos resultados mostraron la ventaja del proceso según la invención para la productividad de PRP y la relación PRP/LPS, habiéndose demostrado dichos resultados a escala industrial.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso para producir, a escala industrial, un polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo b (PRP) destinado a fines de vacunación, según el cual se cultiva una cepa de *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib) en un medio de cultivo y el sobrenadante del cultivo se recolecta y se trata con el fin de extraer el polisacárido capsular a partir de él, comprendiendo dicho medio de cultivo al menos:
- una fuente de carbono,
  - protoporfirina,
  - sales,
  - 10 - aminoácidos,
  - NAD o NADH,
  - vitaminas,
  - un medio para regular el pH,
- 15 caracterizado por que dicho medio de cultivo está químicamente definido, y comprende al menos zinc, en una cantidad que corresponde a aquella comprendida entre 2,5 y 80 mg/L de ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, y por que la relación PRP/LPS (en masa) es superior a aquella obtenida en un mismo medio que no contiene Zinc.
2. El proceso tal y como se reivindica en la reivindicación anterior, caracterizado por que dichos medios reguladores del pH consisten en sales de tampón.
3. El proceso tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha fuente de carbono puede ser múltiple y se escoge entre: glucosa, fructosa, galactosa, glicerol, xilosa, ribosa, fucosa, ácido siálico y lactato.
- 20 4. El proceso tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha protoporfirina es protoporfirina IX sintética.
5. El proceso tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dichas sales se escogen entre sales de potasio, magnesio, sodio, calcio, hierro, zinc, cobalto y manganeso.
- 25 6. El proceso tal y como se reivindica en la reivindicación anterior, caracterizado por que dichas sales se escogen entre: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O; CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O; FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O; ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O; CoCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O; MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O.
7. El proceso tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dichos aminoácidos se escogen entre:
- 30
- arginina,
  - alanina,
  - al menos uno entre: asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico,
  - lisina,
  - histidina,
  - 35 • triptófano,
  - valina,
  - isoleucina,
  - leucina,
  - tirosina,
  - 40 • fenilalanina,
  - cistina o un equivalente.
8. El proceso tal y como se reivindica en la reivindicación anterior, caracterizado por que dicho medio de cultivo comprende al menos arginina, alanina, histidina, triptófano, tirosina, fenilalanina, cistina, ácido aspártico y ácido glutámico.
- 45 9. El proceso tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la cistina se reemplaza con glutatión o cisteína.
10. El proceso tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dichas vitaminas se escogen entre: tiamina, pantotenato, uracilo, hipoxantina, biotina, riboflavina y piridoxina.
- 50 11. El proceso tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la arginina y el uracilo se reemplazan con citrulina.
12. Un proceso para preparar una composición para una vacuna según el cual:

- a) se prepara un antígeno contra *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib), constituido por el polisacárido capsular (PRP), a escala industrial, según el proceso de la reivindicación 1,
- b) el polisacárido capsular obtenido en el paso a) se conjuga con una proteína portadora.

- 5 13. El proceso tal y como se reivindica en la reivindicación anterior, caracterizado por que la proteína portadora es el toxoide tetánico.
- 10 14. El proceso tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que se combina el conjugado obtenido en la etapa b) con al menos uno o varios antígenos presentes habitualmente en las vacunas pediátricas.
- 15 15. El proceso de preparación de una composición para vacuna tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que se combina el conjugado obtenido en la etapa b) con unos antígenos de la difteria, tetanos y hepatitis B.
- 15 16. El proceso de preparación de una composición para vacuna tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que se combina el conjugado obtenido en la etapa b) con toxoide diftérico, toxoide tetánico, 2 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis* que son el toxoide y la hemaglutinina filamentosa.
- 20 17. El proceso de preparación de una composición para vacuna tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que se combina el conjugado obtenido en la etapa b) con toxoide diftérico, toxoide tetánico, 3 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis* que son el toxoide, la pertactina y la hemaglutinina filamentosa.
- 25 18. El proceso de preparación de una composición para vacuna tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que se combina el conjugado obtenido en la etapa b) con toxoide diftérico, toxoide tetánico, 5 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis* que son el toxoide, la pertactina, los aglutinógenos y la hemaglutinina filamentosa.
- 30 19. El proceso de preparación de una composición para vacuna tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que se combina el conjugado obtenido en la etapa b) con toxoide diftérico, toxoide tetánico, 2, 3 o 5 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis*, así como los virus inactivados de la polio de tipo 1, 2 y 3.
- 35 20. El proceso de preparación de una composición para vacuna tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que se combina el conjugado obtenido en la etapa b) con toxoide diftérico, toxoide tetánico, antígenos de la hepatitis B, 2, 3 o 5 antígenos acelulares de *Bordetella pertussis*, así como los virus inactivados de la polio de tipo 1, 2 y 3.
- 40 21. El proceso de preparación de una composición para vacuna tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que se combina el conjugado obtenido en la etapa b) con la bacteria entera de *Bordetella pertussis*.
- 45 22. El proceso de preparación de una composición para vacuna tal y como se reivindica en una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que se combina el conjugado obtenido en la etapa b) con uno al menos de los antígenos contra la difteria, el tetanos, la poliomielitia, la hepatitis B, las infecciones generadas por *Neisseria meningitidis* o por *Streptococcus pneumoniae*.

Figura 1

