

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 893**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/00** (2006.01)

**C07K 14/195** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2016 PCT/US2016/022297**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16145432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2016 E 16712612 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3268380**

54 Título: **Procedimientos y composiciones de la pirrolisina**

30 Prioridad:

**12.03.2015 US 201562132050 P**

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

**08.05.2019**

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)  
10 Sylvan Way  
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**MOONEN, GLENN, ANDREW;  
MOUTAFIS, GEORGE;  
POPPE, ALLEN y  
HERBERG, JOHN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 711 893 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

Procedimientos y composiciones de la pirrolisina

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a procedimientos para aumentar la cantidad de pirrolisina producida por *Trueperella pyogenes*, un agente causante de la metritis bovina. La invención se refiere además a composiciones que comprenden pirrolisina, aisladas y purificadas usando los procedimientos descritos en el presente documento, y útiles para reducir o evitar la metritis bovina.

**Antecedentes**

10 La metritis es el resultado de una infección uterina en ganado lechero por diversos patógenos microbianos. Por lo general, se desarrolla después del comienzo de la función lútea durante el período de posparto. Las bacterias que normalmente se encuentran en el ambiente en el que reside el ganado probablemente se introducen en el útero durante o después del parto. En las vacas posparto que desarrollan infecciones bacterianas, las bacterias encuentran su camino hacia el útero, pero no comienzan a proliferar de inmediato. La metritis aguda se produce entre el día 0 y el día 21 después del parto. La endometritis clínica (inflamación o irritación del revestimiento del

15 útero o endometrio) se produce entre aproximadamente el día 21 y el día 35 después del parto. Más allá del día 35, la endometritis a menudo se vuelve subclínica.

Existen múltiples factores asociados con la infección natural, tal como el estrés del parto, la producción de leche/lactancia, el balance energético negativo, la inmunosupresión y el hecho de que un animal de este tipo sea más susceptible a las infecciones naturales. Uno de los patógenos bacterianos responsables del comienzo de la metritis y la endometritis clínica es *Trueperella pyogenes*. Este organismo posee un número de factores de virulencia que contribuyen a su potencial patógeno, uno de los cuales es la pirrolisina, una citolisina dependiente del colesterol. Esta proteína es una hemolisina y es citolítica para las células inmunes, incluidos los macrófagos. La expresión de la pirrolisina es necesaria para la virulencia de esta bacteria. Esta proteína parece ser la vacuna de subunidad

20 candidata más prometedora de *T. pyogenes* identificada hasta la fecha. Es crítico que la pirrolisina aislada sea conformacional e inmunológicamente similar/idéntica a la proteína en su estado nativo. Por lo tanto, un procedimiento para producir, y si se requiere, aislar la pirrolisina nativa de *T. pyogenes*, así como una vacuna eficaz basada en ella, son altamente deseables.

**Sumario**

30 Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *Trueperella pyogenes*, en el que el procedimiento comprende usar un medio basal que contiene glucosa, así como una fuente de carbono concentrado adicional seleccionada de entre el grupo que consiste en: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, oligosacáridos, glicerol, lactosa, dextrano, dextrina, mono metil succinato y N-acetil glucosamina; añadir un agente quelante al medio antes del agotamiento de la glucosa en el medio; la recolección de *T. pyogenes*, y el aislamiento de la pirrolisina.

35 Se desvela un procedimiento en el que el agente quelante es ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o una combinación de ambos.

Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, en el que *T. pyogenes* se replica en una densidad de células bacterianas más alta que una densidad óptica (DO) de 5 a 600 nm.

40 Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, en el que el medio se mantiene a una temperatura de entre 28 °C y 32 °C.

Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, que comprende además el uso de un medio basal tamponado con fosfato en una concentración de entre 10 mM y 200 mM.

45 Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, que comprende además el uso de un medio basal en el que el pH del medio está entre 6,0 y 8,0.

Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, que comprende además el uso de un medio basal en el que el medio comprende hemina como fuente de hierro.

Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, que comprende además el uso de un medio basal que comprende polisorbato 80.

50 Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, que comprende además el uso de un medio basal que comprende una solución de vitaminas.

Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, en el que la

solución de vitaminas comprende uno o más de los siguientes: Vitamina B12; mioinositol; nucleobase del uracilo; ácido nicotínico; pantotenato de calcio; piridoxal-HCl; piridoxamina-2HCl; riboflavina; tiamina-HCl; ácido p-aminobenzoico; biotina; ácido fólico; niacinamida; y  $\beta$ -NAD.

5 Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, en el que la solución de vitaminas comprende solo piridoxal-HCl.

Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, que comprende una suplementación continua, semicontinua o de una sola vez con una fuente de carbono concentrada.

10 Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, que comprende permitir que el pH del cultivo disminuya desde el medio basal inicial, comenzando el pH a un nivel entre 5,50 y 6,50 y luego controlar el pH entre 5,50 y 6,50 mediante la adición automática de un titulador básico.

Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, que comprende separar las proteasas de *T. pyogenes* de la pirrolisina.

Se desvela un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *T. pyogenes*, en el que la separación de las proteasas de *T. pyogenes* de la pirrolisina se logra mediante una etapa de cromatografía.

15 Se desvela un procedimiento para inactivar la pirrolisina, comprendiendo el procedimiento añadir formalina a una concentración final de entre el 0,1 % y el 0,5 %.

Se desvelan composiciones inmunogénicas útiles para la vacunación de un bovino, particularmente durante el período seco, para la reducción o prevención de la metritis.

20 Se desvelan composiciones inmunogénicas que comprenden pirrolisina, aisladas de *T. pyogenes* cultivadas en los medios descritos en el presente documento.

Se desvelan composiciones inmunogénicas que comprenden pirrolisina, obtenidas mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Se desvelan composiciones inmunogénicas que comprenden pirrolisina, obtenidas mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, y un portador.

25 Se desvelan composiciones inmunogénicas que comprenden pirrolisina, obtenidas mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, y un adyuvante.

### **Descripción de las figuras**

La Figura 1 es una comparación del nivel de producción de pirrolisina de *Trueperella pyogenes* en un medio que no contiene vitaminas, una solución de vitaminas interna o una solución de vitaminas comercial.

30 La Figura 2 es una comparación del nivel de producción de pirrolisina de *Trueperella pyogenes* en un medio que no contiene vitaminas, una solución de vitaminas interna o una solución de vitaminas comercial complementada con  $\beta$ -NAD y piridoxal.

La Figura 3 es una comparación del nivel de producción de pirrolisina de *Trueperella pyogenes* en un medio que contiene  $\beta$ -NAD, piridoxal o ambos.

35 La Figura 4 es una comparación de la DO (600 nm) de *Trueperella pyogenes* en un medio que contiene piridoxal (Pir) que se ha esterilizado en autoclave (AC) o se ha añadido de forma estéril (SA) en combinación con dextrosa (Dex).

40 La Figura 5 es una comparación del nivel de producción de pirrolisina de *Trueperella pyogenes* en un medio que contiene piridoxal (Pir) que se ha esterilizado en autoclave (AC) o se ha añadido de forma estéril (SA) en combinación con dextrosa (Dex).

La Figura 6 es una comparación de la DO (600 nm) de *Trueperella pyogenes* en un medio que contiene hemina que se ha irradiado durante diversos períodos de tiempo, o no se ha irradiado en absoluto.

La Figura 7 es una comparación del nivel de producción de pirrolisina de *Trueperella pyogenes* en un medio que contiene hemina que se ha irradiado durante diversos períodos de tiempo, o no se ha irradiado en absoluto.

45 La Figura 8 es una comparación del nivel de producción de pirrolisina de *Trueperella pyogenes* en un medio que contiene hemina que se ha mantenido durante diversos períodos de tiempo antes de añadirla al medio.

Las Figuras 9 y 11 son comparaciones de la DO (600 nm) de *Trueperella pyogenes* en medio que se ha mantenido a diversas temperaturas.

Las Figuras 10 y 12 son comparaciones del nivel de producción de pirrolisina de *Trueperella pyogenes* en un medio que se ha mantenido a diversas temperaturas.

La Figura 13 es una comparación del nivel de producción de pirrolisina de *Trueperella pyogenes* en la que la temperatura del medio se ha mantenido a 32 °C, o se ha cambiado de 37 °C a 32 °C, durante el procedimiento de fermentación.

### **Descripción**

Las siguientes definiciones pueden aplicarse a los términos empleados en la descripción de las realizaciones. Las siguientes definiciones reemplazan cualquier definición contradictoria contenida en cada referencia individual incorporada en el presente documento por referencia.

10 A menos que se indique otra cosa en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con las presentes realizaciones tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto indique otra cosa, los términos en singular incluirán pluralidades, y los términos en plural incluirán el singular.

15 Los términos "sobre", "aproximadamente" y similares, como se usa en el presente documento, cuando se usa en relación con una variable numérica medible, significan el valor indicado de la variable, y todos los valores de la variable que están dentro del error experimental de valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95 % para la media), o dentro del 10 por ciento del valor indicado, el que sea mayor. En términos de días, "aproximadamente" se interpreta que significa más o menos 1 día; por ejemplo, "aproximadamente 3 días" puede significar 2, 3 o 4 días.

20 El término "animal", como se usa en el presente documento, significa cualquier animal que es susceptible a la endometritis, incluidos los mamíferos, tanto domesticados como naturales. Preferentemente, "animal", como se usa en el presente documento, se refiere a un bovino.

25 Los términos "bacterias", "especie bacteriana", "bacteria", y similares, como se usa en el presente documento, significan un gran dominio de microorganismos procarióticos. Preferentemente, "bacterias", como se usa en el presente documento, se refiere a microorganismos que incluyen *Trueperella pyogenes* y bacterias relacionadas.

La expresión "densidad de células bacterianas", como se usa en el presente documento, significa el número de bacterias presentes en un cultivo. Un procedimiento para cuantificar el número de bacterias es medir la densidad óptica de un cultivo en un espectrofotómetro, típicamente a 600 nm.

30 La expresión "medio basal", como se usa en el presente documento, significa el medio en el que se inocula inicialmente un microorganismo. Aún no se ha producido ninguna replicación del microorganismo, lo que podría tener un efecto sobre el pH y/o la concentración de diversos componentes del medio.

35 El término "bovino", como se usa en el presente documento, significa un grupo diverso de ungulados de tamaño mediano a grande, generalmente con pezuñas hendidas, y al menos uno de los sexos con cuernos verdaderos. Los bovinos incluyen, pero sin limitación, ganado doméstico, bisontes, búfalos africanos, búfalos de agua, yak, y antílopes de cuatro cuernos o cuernos de espiral.

Las expresiones "cultivo" o "medio de cultivo", como se usa en el presente documento, significan el medio que contiene un microorganismo.

La expresión "período seco", como se usa en el presente documento, significa el período durante el cual no se produce el ordeño en una vaca; este período es para preparar a la vaca y su ubre para la siguiente lactancia.

40 El término "endometritis", como se usa en el presente documento, significa una inflamación o irritación del revestimiento interno del útero, también denominado "endometrio".

45 La expresión "agotamiento de la glucosa", como se usa en el presente documento, significa el consumo, el metabolismo o la descomposición de la mayor parte o la totalidad de la glucosa disponible en un cultivo. Por ejemplo, el "agotamiento" puede ser cuando la concentración de la fuente de carbono está en o por debajo de 10 mM.

50 Las expresiones "hormona liberadora de gonadotropina", "GnRH", "hormona liberadora de hormona luteinizante", "LHRH" y similares, como se usa en el presente documento, significan una hormona peptídica responsable de la síntesis y la secreción de la pituitaria anterior de las gonadotropinas, la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La secreción de GnRH es pulsátil en todos los vertebrados, y es necesaria para la correcta función reproductiva.

El término "inóculo", como se usa en el presente documento, significa una cantidad o cultivo de un microorganismo. Preferentemente, "inóculo" se refiere a una cantidad de un cultivo bacteriano.

Las expresiones "intramuscular", "por vía intramuscular" y similares, como se usa en el presente documento, significan la inyección de una sustancia en un músculo.

El término "irritación", como se usa en el presente documento, significa una condición o reacción a un estímulo o agente que causa daño a las células en la superficie de un tejido.

- 5 Los términos "lactato", "lactancia" y "lactación", como se usa en el presente documento, significan la secreción de leche de las glándulas mamarias y el período de tiempo en que una hembra produce leche para alimentar a sus crías.

El término "parto", como se usa en el presente documento, significa el momento en que un bovino da a luz a un ternero.

- 10 Las expresiones "microorganismo patógeno" o "patógeno", como se usa en el presente documento, significan un microbio capaz de causar una enfermedad o una afección patológica en un animal. Estas pueden incluir, pero sin limitación, una bacteria, un virus, un hongo o una levadura.

Los términos "embarazada" o "embarazo", como se usa en el presente documento, significan la fertilización y el desarrollo de una o más crías, conocidas como embriones o fetos, en el útero de una mujer.

- 15 El término "progesterona", como se usa en el presente documento, significa una hormona esteroide del ciclo estral, el embarazo y la embriogénesis de los animales. La progesterona pertenece a una clase de hormonas llamadas progestágenos.

- 20 Los términos "útero", "uterino" y similares, como se usa en el presente documento, significan el órgano reproductor femenino sensible a las hormonas de la mayoría de los mamíferos que nutren el embrión y el feto durante el embarazo.

Las expresiones "portador veterinariamente aceptable" o "portador", como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias que, dentro del ámbito del buen criterio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de animales, sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, en proporción con una relación razonable entre beneficios y riesgos, y eficaz para el uso previsto.

## 25 Técnicas de cultivo

- Las bacterias, incluida la *Trueperella pyogenes*, se pueden cultivar en un vaso que contiene medio de crecimiento que permitirá la replicación de la bacteria a un número elevado, facilitando el aislamiento de la(s) proteína(s) deseada(s). El medio de crecimiento puede estar en forma de un caldo nutritivo y puede contener cualquier número de diversos ingredientes que sirvan como fuentes para diversos compuestos y componentes necesarios o útiles para el crecimiento. Esto incluye una(s) fuente(s) de nutrientes. Los componentes nutritivos de los medios de cultivo se seleccionan cuidadosamente y pueden incluir proteínas, péptidos y aminoácidos. Estos componentes pueden servir como fuentes de carbono y nitrógeno para las bacterias. Los organismos más exigentes pueden requerir la adición de fuentes de nutrientes suplementarios.
- 30

- Una fuente de energía también es crítica en el medio de crecimiento. A menudo se suministra en forma de un carbohidrato. La sustancia más común añadida a los medios de cultivo como fuente de energía para aumentar la velocidad de crecimiento de los organismos es la glucosa. Otros carbohidratos también pueden ser usados o requeridos. Las fuentes de carbono alternativas pueden incluir, pero sin limitación, galactosa, diversos disacáridos, tal como la sacarosa, la lactosa o la maltosa, y oligosacáridos. Otras fuentes de carbono también pueden incluir glicerol, dextrano, dextrina, mono metil succinato y N-acetil glucosamina.
- 35

- Metales y minerales esenciales también se pueden añadir en el medio. Estos componentes inorgánicos de los medios de cultivo pueden incluir macro-componentes, tales como Na, K, Cl, P, S, Ca, Mg y Fe. También pueden requerirse diversos micro-componentes, tales como Zn, Mn, Br, B, Cu, Co, Mo, V y Sr. PO<sub>4</sub> también pueden requerirse en el medio. Puede estar presente en una concentración de entre 10 mM y 200 mM, incluyendo 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 y 200 mM.
- 40
- 45

- También es importante que el pH de un medio de cultivo se mantenga alrededor del intervalo necesario para el crecimiento de las bacterias deseadas. El pH del medio de cultivo puede estar entre 6,0 y 8,0, incluyendo 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 y 8,0. El uso de compuestos tampón a valores de pK específicos es especialmente importante cuando se añaden carbohidratos fermentables como fuentes de energía. Los fosfatos, acetatos, citratos, compuestos zwitteriónicos y aminoácidos específicos son ejemplos de agentes de tamponamiento que pueden añadirse a los medios de cultivo. Un efecto secundario potencial de dichos compuestos es su capacidad para quelar (o unirse) a cationes divalentes (por ejemplo, Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>). El efecto de estos agentes de unión o quelantes se puede ver en el crecimiento disminuido o en la incapacidad de crecer en absoluto, a menos que se tenga cuidado de complementar los cationes esenciales en la formulación. El pH también puede regularse mediante la adición de diversas soluciones ácidas o básicas, tales como el bicarbonato de sodio y
- 50
- 55

el hidróxido de sodio. El CO<sub>2</sub> disuelto también se puede usar para ajustar el pH de un cultivo.

El medio de crecimiento también puede contener sustancias indicadoras de color, que pueden servir como una forma efectiva de detectar la fermentación de carbohidratos específicos en un medio de cultivo. Dichos compuestos deben cambiar de color de manera clara y rápida a valores críticos de pH. La mayoría de estos compuestos usados, tal como el rojo fenol, el bromocresol púrpura y la fucsina, pueden ser tóxicos; por lo tanto, es esencial usar bajas concentraciones de los mismos.

Los agentes selectivos también pueden ser necesarios en el medio de crecimiento. Se añaden sustancias químicas o antimicrobianos a los medios de cultivo para que sean selectivos para determinados microorganismos. Los agentes selectivos se eligen y se añaden a concentraciones específicas para suprimir el crecimiento de organismos no deseados, o para mejorar el crecimiento de organismos deseados, en una muestra polimicrobiana. Es esencial establecer que los agentes selectivos no solo inhibirán a los organismos no deseados, sino que también permitirán el crecimiento desinhibido de los organismos deseados.

Los agentes gelificantes también pueden ser útiles en medios de crecimiento. La sustancia formadora de gel más común usada en los medios de cultivo es el agar. El agar se obtiene de algas agarófitas, principalmente de las especies *Gelidium*, *Gracilaria* y *Pterocladia*. Se extrae como una solución acuosa a más de 100 °C, se decolora, se filtra, se seca y se muele hasta obtener un polvo. El agar no es un agente gelificante inerte, y puede aportar nutrientes y/o agentes tóxicos a los medios de cultivo, dependiendo de los procedimientos químicos usados en su producción.

También se pueden añadir otros componentes a los medios de crecimiento, con una finalidad específica. Estos pueden incluir diversos factores de crecimiento, sangre completa o componentes de la sangre y hormonas.

La temperatura a la que se mantiene el medio de cultivo es un factor importante con respecto a la cantidad de toxina producida. Para maximizar la cantidad de toxina producida, la temperatura del medio se puede mantener a 37 °C o menos. Preferentemente, la temperatura se puede mantener entre 21 °C y 36 °C. Más preferentemente, la temperatura se puede mantener entre 25 °C y 34 °C. Lo más preferentemente, la temperatura se puede mantener entre 28 °C y 32 °C.

#### Técnicas de purificación de proteínas

En el presente documento se contemplan diversos procedimientos preparativos de purificación de proteínas. Dichos procedimientos tienen como objetivo recuperar cantidades relativamente grandes de proteína(s) purificada(s) para su uso posterior, incluida la preparación de composiciones inmunogénicas. (Los procedimientos de purificación analítica son más para la producción de pequeñas cantidades de proteínas para una diversidad de fines de investigación o analíticos). Las etapas principales de la purificación preparativa de proteínas incluyen la extracción, la purificación y, si es necesario, la concentración.

Con el fin de extraer una proteína, puede ser necesario llevarla a la solución. Esto se puede lograr rompiendo o alterando el tejido o las células que lo contienen. Existen varios procedimientos para lograr esto: congelación y descongelación repetidas, tratamiento con ultrasonidos, homogeneización por alta presión, filtración o permeabilización por disolventes orgánicos. El procedimiento de elección depende de qué tan frágil es la proteína y qué tan resistentes son las células. Generalmente, para la mayoría de los fines convencionales, la cromatografía en columna se usa para lograr la purificación. Después de este procedimiento de extracción, las proteínas solubles estarán en el disolvente y se pueden separar de las membranas celulares, el ADN, etc., mediante centrifugación.

Puede ser necesario, antes o junto con la extracción de una proteína, inhibir las proteasas que pueden estar presentes y ser capaces de degradar la(s) proteína(s) que se purifican. Existen múltiples clases de proteasas que pueden estar presentes, incluyendo serina proteasas, cisteína proteasas, metaloproteasas y proteasas aspárticas. Están disponibles diversos procedimientos para inhibir las diversas clases de proteasas, y pueden incluir, pero sin limitación, la adición de otras proteínas que actúan para inhibir las proteasas, o diversos compuestos químicos que pueden inhibir la actividad de las proteasas.

Las estrategias de purificación generalmente involucran algún tipo de etapa(s) cromatográfica(s) y equipo. Un procedimiento de purificación generalmente utiliza tres propiedades para separar proteínas. En primer lugar, las proteínas se pueden purificar de acuerdo con sus puntos isoeléctricos, por ejemplo, pasándolas a través de un gel de pH graduado o una columna de intercambio iónico. En segundo lugar, las proteínas se pueden separar según su tamaño o peso molecular, tal como por medio de cromatografía de exclusión de tamaño o por SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida). En tercer lugar, las proteínas se pueden separar por polaridad/hidrofobicidad, tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento o la cromatografía de fase inversa. Un protocolo de purificación de proteínas puede contener una o más etapas cromatográficas. También existen otros procedimientos cromatográficos, incluyendo la cromatografía de interacción hidrofóbica (separación de compuestos basándose en la hidrofobicidad de la superficie) y la cromatografía de afinidad (separación de compuestos usando diversas resinas que tienen especificidad para los ligandos unidos al compuesto).

Si fuera necesaria la concentración de la proteína, esto se puede lograr usando diversas técnicas, que pueden incluir

la liofilización (secado de una proteína) y la ultrafiltración (concentración usando membranas permeables selectivas).

#### Composiciones inmunogénicas

5 Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden administrarse a animales para inducir una respuesta inmunitaria eficaz contra *T. pyogenes*. En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos para desencadenar una respuesta inmunitaria eficaz administrando a un animal una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición inmunogénica de la presente invención descrita en el presente documento.

10 La pirrolisina se puede inactivar antes de su uso en una composición inmunogénica. Los procedimientos de inactivación pueden incluir, pero sin limitación, el tratamiento con calor, el tratamiento con luz UV, el ajuste del pH (hacia arriba o hacia abajo) o el tratamiento con diversos agentes químicos. Dichos agentes químicos pueden incluir, pero sin limitación: agentes reductores, tales como el ditioneitol (DTT) o el beta-mercaptoetanol (BME); detergentes, tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), Triton X-100 o CHAPS; agentes caotrópicos, tales como fenol o urea; y desinfectantes reactivos, tales como formaldehído o glutaraldehído. Los procedimientos para el uso de dichos procedimientos y agentes se logran fácilmente usando técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

15 Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluir uno o más adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, la solución completa e incompleta de Freund, copolímero de bloque (CytRx; Atlanta, GA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), adyuvante AMPHIGEN®, *Bordetella* muerta, saponinas, tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descritas en la patente de EE.UU. n.º 5.057.540, que se incorpora en el presente documento por referencia, y partículas generadas a partir del mismo, como ISCOMS (complejos inmunoestimulantes), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc.; Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil lípido A, adyuvante de amina lipídica avridina, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* (recombinante o de otro tipo), toxina del cólera o dipéptido muramilo. También es útil el MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.912.094 y por la presente se incorpora por referencia. También son adecuados para su uso como adyuvantes los análogos de lípidos A sintéticos o los compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles en Corixa (Hamilton, MT), y que se describen en la patente de EE.UU n.º 6.113.918, incorporada por la presente por referencia. También se puede usar una combinación de Quil A y colesterol como adyuvante.

20 Polinucleótidos sintéticos, tales como oligonucleótidos que contienen motivos CpG (documento US 6.207.646 incorporado por la presente por referencia), también pueden usarse como adyuvantes. Los oligonucleótidos CpG, tales como los oligonucleótidos inmunoestimuladores de clase P, son útiles, incluidos los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la clase P modificados en E. Los esteroides también pueden ser útiles como adyuvantes. Los adecuados para su uso pueden incluir  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. Las composiciones adyuvantes pueden incluir además uno o más polímeros tales como, por ejemplo, DEAE dextrano, polietilenglicol, ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico (por ejemplo, CARBOPOL®). Las composiciones adyuvantes pueden incluir además uno o más estimulantes Th2 tales como, por ejemplo, Bay R1005(R) y aluminio. Las composiciones adyuvantes pueden incluir además uno o más agentes inmunomoduladores, tales como compuestos de amonio cuaternario (por ejemplo, DDA), interleucinas, interferones u otras citoquinas.

25 Se ha demostrado que varias citoquinas o linfocinas tienen actividad moduladora de la inmunidad y, por lo tanto, pueden usarse como adyuvantes. Estas pueden incluir, pero sin limitación, las interleucinas 1- $\alpha$ , 1- $\beta$ , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, el documento US 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (véase, por ejemplo, el documento US 5.078.996 y ATCC número de referencia 39900), el factor estimulante de colonias de macrófagos, el factor estimulante de colonias de granulocitos, GSF, y los factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ . Otros adyuvantes útiles en la presente invención incluyen quimiocinas, que incluyen, sin limitación, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES. Las moléculas de adhesión, tales como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina también pueden ser útiles como adyuvantes. Otros adyuvantes útiles incluyen, sin limitación, una molécula similar a la mucina, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia de integrinas tales como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95; un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas como PECAM, ICAM, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3), CD2 y LFA-3; moléculas coestimuladoras tales como CD40 y CD40L; factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1 y factor de crecimiento endotelial vascular; moléculas receptoras que incluyen Fas, receptor de TNF, Fit, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6. Otra molécula adyuvante más incluye la caspasa (ICE).

30 Los portadores catiónicos también pueden ser útiles en composiciones adyuvantes. Los portadores catiónicos adecuados incluyen, sin limitaciones, dextrano, dextrano-DEAE (y derivados de los mismos), PEG, gomas de guar, derivados de quitosán, derivados de poliacelulosa como hidroxietilcelulosa (HEC), polietilenoimino, poliaminos, como polilisina y similares.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden fabricar en diversas formas, dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas se pueden fabricar en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles, adecuadas para su uso inyectable, o en formas liofilizadas usando técnicas de liofilización. Las composiciones inmunogénicas liofilizadas se mantienen típicamente a aproximadamente 4 °C, y pueden reconstituirse en una solución estabilizadora, por ejemplo, una solución salina o HEPES, con o sin adyuvante. Las composiciones inmunogénicas también pueden fabricarse en forma de suspensiones o emulsiones.

Estas composiciones inmunogénicas pueden contener aditivos adecuados para la administración a través de cualquier vía de administración convencional. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden prepararse para la administración a sujetos en forma de, por ejemplo, líquidos, polvos, aerosoles, comprimidos, cápsulas, comprimidos o cápsulas con recubrimiento entérico, o supositorios. Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas también pueden estar en forma de, pero sin limitación, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables. En una realización de una formulación para la administración parenteral, el principio activo se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Otras formulaciones útiles administrables por vía parenteral incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, o como un componente de un sistema de polímero biodegradable. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables, tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble o una sal poco soluble.

Las composiciones inmunogénicas generalmente comprenden un portador veterinariamente aceptable. Dichos portadores incluyen, sin limitación, agua, solución salina, solución salina tamponada, tampón fosfato, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones. Otros diluyentes, adyuvantes y excipientes empleados convencionalmente pueden añadirse de acuerdo con técnicas convencionales. Dichos portadores pueden incluir etanol, polioles y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables. También se pueden emplear tampones y agentes de ajuste de pH, e incluyen, sin limitación, sales preparadas a partir de un ácido o base orgánico. Los tampones representativos incluyen, sin limitación, sales de ácidos orgánicos, tales como sales de ácido cítrico (por ejemplo, citratos), ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, ácido ftálico, Tris, clorhidrato de trimetilamina o tampones de fosfato. Los portadores parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa, trehalosa, sacarosa, Ringer lactato o aceites fijos. Los portadores intravenosos pueden incluir reabastecedores de líquidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos, tales como los basados en la dextrosa de Ringer, y similares. También se pueden proporcionar conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes (por ejemplo, EGTA; EDTA), gases inertes y similares en los portadores farmacéuticos. La presente invención no está limitada por la selección del portador. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables, a partir de los componentes descritos anteriormente, que tienen un pH, isotonicidad, estabilidad y otras características convencionales adecuadas, está dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, textos tales como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, pub., 2000; y The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4<sup>a</sup> edición, eds. R.C. Rowe y col., APhA Publications, 2003.

#### Técnicas recombinantes

En otras realizaciones más de la invención, la composición inmunogénica puede comprender una vacuna recombinante. Dichas vacunas recombinantes podrían comprender una proteína recombinante, o como alternativa un vector y una inserción heteróloga que codifican dicha proteína recombinante. Las inserciones heterólogas en algunas realizaciones comprenden una o más secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de la presente invención. La inserción puede comprender opcionalmente un promotor heterólogo, tal como, por ejemplo, promotores sintéticos conocidos en la técnica. Como alternativa, los promotores del vector huésped pueden ejercer control transcripcional sobre la expresión de las inserciones. Ejemplos no limitantes adecuados de promotores, que pueden ser nativos o heterólogos, dependiendo de la elección del vector, son el promotor de vacuna H6, el promotor de vaccinia I3L, el promotor poxviral 42K, el promotor de vaccinia 7.5K, y el promotor de vaccinia Pi.

En algunas realizaciones, los vectores pueden ser vectores virales, que incluyen, sin limitaciones, vectores de virus vaccinia y pox, tales como parapox, racoonpox, swinepox y diferentes vectores avipox (por ejemplo, cepas de canarypox y fowlpox). En general, las secuencias que no son esenciales para el huésped viral son sitios de inserción adecuados para las inserciones de la presente invención. Las cepas enumeradas anteriormente están bien caracterizadas en la técnica, y algunos sitios de inserción en estos vectores son bien conocidos.

Existen varios procedimientos o técnicas conocidas que pueden usarse para clonar y expresar las secuencias de nucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, las secuencias pueden aislarse como fragmentos de restricción y clonarse en vectores de clonación y/o expresión. Las secuencias también pueden amplificarse por RCP y clonarse en vectores de clonación y/o expresión. Como alternativa, pueden clonarse mediante una combinación de estos dos procedimientos. Las técnicas convencionales de biología molecular conocidas en la técnica, y no descritas específicamente, pueden seguirse generalmente como se describe en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989); Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning,

John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., Recombinant DNA, Scientific American Books, Nueva York; Birren y col (eds) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); y la metodología expuesta en los documentos US 4.666.828; US 4.683.202; US 4.801.531; US 5.192.659 y US 5.272.057. La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se lleva a cabo generalmente como se describe en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990).

La presente invención abarca el uso de sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos, incluidos vectores y células huésped, que pueden usarse para expresar formas truncadas y de longitud completa de los polipéptidos recombinantes expresados por las secuencias de nucleótidos de la presente invención. Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vectores de expresión de huésped para expresar los polipéptidos de la presente invención. Dichos sistemas de expresión de huésped también representan vehículos mediante los cuales se pueden clonar las secuencias codificantes de interés, y la(s) proteína(s) expresada(s) se purifica(n) posteriormente. La presente invención proporciona además células huésped que pueden, cuando se transforman o se transfectan con el vector o secuencia de nucleótidos adecuadas, expresar el producto génico del polipéptido codificado de la invención. Dichas células huésped incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) transformados con ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias codificantes; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen las secuencias codificantes; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificantes; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes; o sistemas celulares de mamíferos (por ejemplo, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores procedentes del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor de metalotioneína), o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia), y las secuencias codificantes.

Los vectores de la invención se pueden obtener de, pero sin limitación, plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus de mamíferos, cromosomas de mamíferos y combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos que incluyen, pero sin limitación, cósmidos y fagémidos.

Los vectores de la presente invención se pueden usar para la expresión de polipéptidos. En general, los vectores de la invención incluyen regiones reguladoras que actúan en cis, unidas de forma operacional al polinucleótido que codifica los polipéptidos a expresar. Las regiones reguladoras pueden ser constitutivas o inducibles. Los factores que actúan en trans adecuados son suministrados por el huésped por un sistema de traducción *in vitro*, por un vector complementario, o por el propio vector en la introducción en el huésped.

Para facilitar el aislamiento de la pirrolisina, se puede fabricar un polipéptido de fusión, en el que la pirrolisina está unida a un polipéptido heterólogo, que permite el aislamiento mediante cromatografía de afinidad. Preferentemente, un polipéptido de fusión se fabrica usando uno de los sistemas de expresión conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica la pirrolisina está unido en su extremo 5' o 3' a un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo. Los ácidos nucleicos están unidos en el marco de lectura de codones adecuado, para permitir la producción de un polipéptido de fusión, en el que el extremo amino y/o carboxilo de la pirrolisina se fusiona con un polipéptido heterólogo, lo que permite la recuperación simplificada del antígeno como un polipéptido de fusión. El polipéptido de fusión también puede evitar que el antígeno se degrade durante la purificación. En algunos casos, puede ser deseable eliminar el polipéptido heterólogo después de la purificación. Por lo tanto, también se contempla que el polipéptido de fusión comprenda un sitio de escisión en la unión entre la pirrolisina y el polipéptido heterólogo. El sitio de escisión consiste en una secuencia de aminoácidos que se escinde con una enzima específica para la secuencia de aminoácidos en el sitio. Ejemplos de dichos sitios de escisión que se contemplan incluyen el sitio de escisión de enterocinasa (escindido por enterocinasa), el sitio de escisión del factor Xa (escindido por el factor Xa) y el sitio de escisión GENENASE (escindido por GENENASE; New England Biolabs; Beverly, Mass.).

Un ejemplo de un sistema de expresión procariota para producir polipéptidos recombinantes para su uso en composiciones inmunogénicas es el sistema de fusión génica de glutatión S-transferasa (GST) (Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ). Otro procedimiento para producir la proteína de fusión es un procedimiento que vincula una secuencia de ADN que codifica una etiqueta de polihistidina en el marco con el ADN que codifica el antígeno. La etiqueta permite la purificación del polipéptido de fusión mediante cromatografía de afinidad de metales, preferentemente cromatografía de afinidad de níquel. El sistema Xpress (Invitrogen; Carlsbad, CA) es un ejemplo de un kit comercial disponible para fabricar y luego aislar proteínas de fusión polihistidina-polipéptido. Además, el sistema de purificación y fusión pMAL (New England Biolabs; Beverly, MA) es otro ejemplo de un procedimiento para fabricar un polipéptido de fusión, en el que una proteína de unión a maltosa (MBP) se fusiona con el antígeno. La MBP facilita el aislamiento del polipéptido de fusión por cromatografía de afinidad de amilosa. Otros socios de fusión, y procedimientos para generar dichas fusiones, están fácilmente disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Estas fusiones se pueden usar en su totalidad como la composición inmunogénica, o se pueden escindir en la unión entre el antígeno recombinante y el polipéptido heterólogo.

Los vectores de la invención pueden incluir cualquier elemento típicamente incluido en un vector de expresión o visualización, que incluyen, pero sin limitación, origen de secuencias de replicación, uno o más promotores, genes de resistencia a antibióticos, secuencias peptídicas líder o señal, diversas secuencias de etiquetas, sitios de restricción, sitios de unión a ribosomas, potenciadores de la traducción (secuencias capaces de formar estructuras de bucle de vástago para la estabilidad posterior de la transcripción del ARNm), secuencias que codifican aminoácidos que carecen de un codón de parada, y secuencias que codifican una proteína de la cubierta bacteriana.

La presente invención se ilustra con más detalle, pero no se limita de ningún modo a los siguientes ejemplos.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1. Procedimiento mejorado para la expresión, aislamiento y purificación de la pirrolisina.**

El medio usado para todas las etapas de fermentación fue una solución de triptonona/extracto de levadura/Tween 80/glucosa/fosfato/hemina esterilizada por calor. Se añadió una solución estéril de vitaminas filtrada y otra solución de glucosa esterilizada con filtro al medio después de la esterilización por calor. Se descongeló una ampolla de *Trueperella pyogenes* de tipo natural congelada y se usó para inocular un matraz (a ~30 % de volumen de llenado) que contenía el medio (0,5 % v/v); esto se incubó durante 16-28 horas, a 37 °C, 100 rpm en una incubadora de CO<sub>2</sub> configurada al 5 %. Un segundo matraz que contenía el medio fue luego inoculado con 10 % v/v de cultivo del primer matraz; esto se incubó luego durante 4 a 8 horas, nuevamente a 37 °C, 100 rpm en una incubadora de CO<sub>2</sub> configurada al 5 %. A continuación se inoculó un fermentador con 0,5 % v/v de cultivo del segundo matraz. La temperatura se mantuvo a 37 °C y el pH inicial fue de 7,2 a 7,4. Se dejó que el pH cayera a pH 6,15, y luego se controló en una dirección solo con NaOH al 30 %. El oxígeno disuelto se mantuvo al 5 % usando oxígeno puro a un caudal máximo de 0,05 w/m, y el vaso se agitó a una velocidad lenta (20 rpm en la escala de 2 litros). El fermentador se enriqueció con una solución de EGTA ajustada a pH 6,15, a una concentración final de 2 g/l justo antes del agotamiento de la glucosa. En este mismo tiempo, se añadió solución de lactosa filtrada estéril a una concentración final de 4 a 8 g/l. Luego se determinó el tiempo de recolección a través de un análisis de cromatografía líquida de rendimiento ultra (UPLC) en proceso, nominalmente alrededor de 48 a 80 horas. El cultivo de recolección se enfrió entonces a < 20 °C, y luego las células fueron extraídas por centrifugación y filtración. El sobrenadante se concentró de 10 a 30 veces mediante filtración de flujo tangencial, usando membranas UF de acetato de celulosa modificadas a 10 kDa (corte). El sobrenadante se diafiltró luego con 4 a 5 lavados usando un tampón que contenía MES 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 500 mM, pH 5,8. El retenido diafiltrado se filtró luego de forma estéril y se preparó para la purificación.

Con respecto a las mejoras del procedimiento corriente arriba, históricamente, el cultivo produce la cantidad máxima de pirrolisina a las 4 h en la fase estacionaria, que es cuando se produce el agotamiento de la glucosa. Sin embargo, el organismo comienza a producir proteasas, que con el tiempo degradan completamente la toxina. Por lo tanto, la recolección de las células se realizó típicamente de 3 a 4 h después del agotamiento de la glucosa, cuando la DO a 600 nm fue típicamente  $\square$ 3,7. El pH se ajustó luego de 5,7 a 5,9 para inhibir aún más las proteasas. Una mejora en este procedimiento fue el descubrimiento de que las proteasas se desactivaron con la adición de EGTA. Por lo tanto, la adición de EGTA antes o en el momento del agotamiento de la glucosa permitió que la recolección de las células coincidiera con el rendimiento máximo, ya que la inactivación de las proteasas y la posterior alimentación del cultivo con una fuente de carbono reciente, permitió el logro de rendimientos más altos. Además, la concentración del sobrenadante se realizó anteriormente usando casetes de ultrafiltración con PES de 10 kDa; la recuperación de la OLP fue de solo alrededor del 65 %. Sin embargo, el cambio a los casetes de ultrafiltración con acetato de celulosa modificada (por ejemplo, Hydrosart) de 10 kDa, permitió mejorar la recuperación de la OLP a aproximadamente el 100 %.

Otras mejoras a este procedimiento incluyeron el tamponamiento con fosfato, la adición de una solución de vitaminas, así como la adición de magnesio al cultivo. Con respecto al tamponamiento con fosfato, se determinó que el fosfato de sodio 25 mM a pH 6,8 era óptimo. En cuanto a la solución de vitaminas, se añadió la siguiente composición: Vitamina B12 (2,5 mg/l); mioinositol (50 mg/l); uracilo (50 mg/l); ácido nicotínico (10 mg/l); pantotenato de calcio (50 mg/l); piridoxal-HCl (25 mg/l); piridoxamina-2HCl (25 mg/l); riboflavina (50 mg/l); tiamina-HCl (25 mg/l); ácido p-aminobenzoico (5 mg/l); biotina (5 mg/l); ácido fólico (20 mg/l); niacinamida (25 mg/l); y  $\beta$ -NAD (62.5 mg/l). Con respecto a la adición de magnesio, esto podría suministrarse en forma de citrato de magnesio, gluconato de magnesio o sulfato de magnesio.

Las mejoras adicionales a este procedimiento incluyeron estrategias de fermentación por lotes y/o por lotes alimentados, usando una suplementación de fuente de carbono única o múltiple. La fuente de carbono también puede contener factores nutricionales y/o sales adicionales, tal como la hemina y el fosfato. Las estrategias de optimización de la fermentación planificadas para maximizar el crecimiento y la producción de pirrolisina incluyen el control de los niveles de oxígeno disuelto, redox, pH y dióxido de carbono. La temperatura de incubación también se puede mejorar, ya que algunos trabajos experimentales han indicado que una temperatura de funcionamiento más baja puede ser beneficiosa.

Con respecto al procesamiento corriente abajo y la purificación de la pirrolisina, la proteína se purificó a través de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina de fenil sefarosa equilibrada con MES 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 500 mM, pH 5,8; se eluyó en MES 50 mM pH 5,8. La proteína purificada se concentró luego, seguido de un

- intercambio de tampón en tampón fosfato (sodio o potasio). A continuación se determinó la actividad hemolítica, para asegurar que la proteína activa se había purificado. Esto se hizo por dilución en serie de la pirrolisina con el tampón de ensayo, seguido de incubación a 37 °C de la pirrolisina con glóbulos rojos de caballo. Luego se centrifugó para sedimentar los glóbulos rojos intactos, el material soluble (lisado) se transfirió a una placa nueva, se midió la DO a 405 nm y se representaron los resultados. Las unidades hemolíticas (UH) se determinaron en el punto medio de la curva, y la pirrolisina se consideró desintoxicada cuando las unidades hemolíticas eran inferiores a 1000 UH. Luego se usaron UPLC y SDS-PAGE para confirmar la identidad de la proteína aislada. Finalmente, la pirrolisina se inactivó mediante el tratamiento con 0,25-0,5 % (v/v) de formalina durante 24-48 h a 20 °C, y luego se filtró de forma estéril.

### Ejemplo 2. Mejoras adicionales para aumentar el nivel de expresión de la pirrolisina.

- 10 Las materias primas necesarias para preparar el medio de semilla de metritis se muestran en las Tablas 1 y 2 (incluidas las concentraciones objetivo).

Tabla 1 Solución de cloruro de hemina

Número	Ingrediente	Concentración objetivo
1	Cloruro de hemina	100 mg/l
2	Solución de NaOH 1 M	10 ml/l

Tabla 2 Medio de semilla de metritis

Número	Ingrediente	Concentración objetivo
1	Polisorbato 80	1 g/l
2	Glucosa	2,75 g/l
3	Hidrato de gluconato de magnesio	1,1 g/l
4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3,588 g/l
5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,934 g/l
6	Triptona	30 g/l
7	Extracto de levadura	15 g/l
8	Solución de cloruro de hemina	40 ml/l

- 15 La solución de cloruro de hemina siempre se prepara fresca el día requerido. El polvo de cloruro de hemina se disuelve primero en el volumen adecuado de NaOH 1 M y, cuando está completamente disuelto, se completa el volumen con agua destilada.

- 20 Debido a la alta viscosidad del polisorbato 80, es más fácil pesar este componente directamente en un vaso de precipitados de vidrio como primera etapa para preparar el medio de semilla de metritis. Añada aproximadamente el 60 % del volumen final de agua destilada al vaso de precipitados con un agitador magnético y proceda a mezclar y calentar la solución a aproximadamente 50 a 60 °C. Tenga en cuenta que esta solución se pondrá turbia cuando se caliente. Añada lentamente todos los demás componentes en el orden que se muestra en la Tabla 2. Disuelva completamente todos los ingredientes y complete el volumen con agua destilada. Esterilice con calor el medio a 121 °C durante 15 a 20 minutos. El medio tiene una vida útil de 7 días a temperatura ambiente. Esta corta vida útil se debe al contenido de hemina. Si se prepara un medio basal sin hemina, esto prolongaría la vida útil a aproximadamente 3 meses a temperatura ambiente. La solución de cloruro de hemina esterilizada con filtro se podría añadir a las porciones de un medio basal en volumen según se requiera. Sin embargo, para determinados mercados, esto requerirá la prueba del material por agentes extraños antes de su uso.

- 30 Para todos los estudios de fermentación realizados hasta la escala piloto de 35 l inclusive, solo han sido necesarias dos etapas de semilla para proporcionar un volumen de inóculo suficiente. La primera etapa puede convertirse en fase estacionaria y tiene mucha flexibilidad en su período de incubación. La segunda etapa se usa para "refrescar" las células y se transfiere a la etapa de fermentación en crecimiento exponencial.

- 35 Los matraces desechables Corning Erlenmeyer con paredes lisas y tapas ventiladas se han usado para todos los estudios de fermentación hasta la fecha. Sin embargo, otros matraces de cultivo desechables o no desechables deben ser igualmente buenos. Para todas las etapas de semillas, los matraces se llenaron hasta el 32 % del volumen total y después de la inoculación, se incubaron en una incubadora de agitación de CO<sub>2</sub> establecida al 5 % y 100 rpm. Una incubadora de CO<sub>2</sub> se usó por primera vez debido a un crecimiento muy mejorado. Sin embargo, desde entonces se ha desarrollado un medio de crecimiento mucho mejor, por lo que una incubadora convencional ahora puede ser satisfactoria (estos estudios no se han realizado).

- 40 Un experimento que probó el número máximo de pasajes de semillas de la semilla maestra de *T. pyogenes* mostró que no había ningún efecto perjudicial sobre el rendimiento de la pirrolisina. El diseño experimental se basó en un

volumen teórico de cultivo de fermentación final de 10.000 l, por lo que 7 pasajes de la semilla maestra serían suficientes para este procedimiento de ampliación. Esto se basó en la preparación de un banco de semillas de trabajo con 3 pasajes generosos de la semilla maestra.

- 5 El experimento probó la productividad de la pirrolisina en un fermentador piloto de 35 l inoculado con el 6º pasaje de la semilla maestra. Los primeros 5 pasajes eran volúmenes de 40 ml en matraces de 125 ml y la 6ª etapa de semilla fue de 320 ml en un matraz de 1000 ml.

Etapa de semilla 1 (125 ml: ejemplo de escala)

- 10 Descongele y abra la ampolla de semillas de trabajo de *T. pyogenes* asépticamente. Inocule 40 ml de medio de semilla de metritis en un matraz de pared lisa de 125 ml con un 0,5 % v/v de ampolla. Incube aeróbicamente de 16-28 horas a 37 °C en una plataforma de agitación a 100 rpm en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %. La DO<sub>600</sub> debe estar entre 3 y 7 y no debe haber glucosa residual restante (consulte la sección 3.6.2). El cultivo debe probarse para determinar su pureza con estrías en placas de agar de sangre de oveja o caballo (consulte la sección 3.6.5).

Etapa de semilla 2 (125 ml: ejemplo de escala)

- 15 Inocule 40 ml de medio de semilla de metritis en un matraz de pared lisa de 125 ml con 10 % v/v de la etapa de la semilla 1(SS1). Incube aeróbicamente de 4-8 horas a 37 °C en una plataforma de agitación a 100 rpm en una incubadora de CO<sub>2</sub> establecida al 5 %. La DO<sub>600</sub> debe estar entre 1 y 3 y asegurarse que queda algo de glucosa residual restante (consulte la sección 3.6.2) en la etapa de semilla 2 (SS2) antes de inocular el(los) fermentador(es). El cultivo debe probarse para determinar su pureza con estrías en placas de agar de sangre de oveja o caballo (consulte la sección 3.6.5).

- 20 Las materias primas necesarias para preparar el medio basal de producción de metritis se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3** Medio basal de producción de metritis (incluidas las concentraciones objetivo)

Número	Ingrediente	Concentración objetivo
1	Polisorbato 80	1 g/l
2	Glucosa	0,5 g/l
3	Hidrato de gluconato de magnesio	1,1 g/l
4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3,588 g/l
5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,934 g/l
6	Triptona	30 g/l
7	Extracto de levadura	15 g/l

- 25 La preparación general del medio basal de producción de metritis es la misma que la descrita anteriormente para el medio de semilla de metritis. El medio es similar, pero no tiene adición de cloruro de hemina y una concentración de glucosa más baja. Esterilice con calor el volumen requerido de medio basal en fermentadores a 121 °C durante 30 a 60 minutos.

- 30 Este medio reemplaza a un medio basado en caldo de soja triptica (TSB) que era sensible a altas cargas de esterilización por calor, por lo que los rendimientos de toxinas se redujeron considerablemente. Este medio mejorado es mucho más tolerante al calor, pero la hemina se excluyó deliberadamente de este estudio de desarrollo para comparar solo triptona con concentraciones de glucosa altas (equivalentes a TSB de aproximadamente 2,5 g/l) y bajas (0,5 g/l) versus TSB. La intención fue luego comparar el medio mejorado esterilizado por calor con y sin hemina. Este trabajo ya se ha realizado.

- 35 Después de que el medio basal de producción de metritis se haya esterilizado por calor en(los) fermentador(es) y se haya enfriado, el medio de producción completo de metritis se prepara añadiendo los componentes 1 y 2 esterilizados con filtro a las velocidades que se muestran en la Tabla 4. La concentración de glucosa residual de este medio debe ser 14 ± 2 mM. Las soluciones de EGTA y lactosa se añaden aproximadamente de 10 a 12 horas después de la inoculación cuando la glucosa residual es inferior a 8 mM y la DO<sub>600</sub> es mayor que 2,5 (consulte las secciones 3.5.4 y 3.5.6, respectivamente). La solución de lactosa se añade como componente número 4a o 4b, dependiendo de si se emplean estrategias en embolada o de alimentación continua.

**Tabla 4** Medio de producción completo de metritis

Número	Ingrediente	Velocidad de adición (por litro de medio basal de producción de metritis)	Comentarios
1	Solución de vitaminas/hemina	40 ml	
2	Solución de glucosa al 50 %	4 ml	
3	100 g/l de solución de EGTA pH 5,8	20 ml	Solo se añadió después de la inoculación cuando la glucosa residual es < 8 mM y la DO <sub>600</sub> > 2,5
4a	Solución de lactosa al 50 % (SOLO para las adiciones en embolada)	8 a 16 ml	Concentración usada para adiciones en embolada únicas o múltiples. Adición post EGTA actualmente añadida
4b	Solución de lactosa al 6 % (SOLO para la adición por lotes alimentados)	70 a 140 ml	Concentración usada para la adición por lotes alimentados. Adición post EGTA actualmente añadida

Solución madre de vitaminas

Las materias primas necesarias para preparar la solución madre de vitaminas se muestran en la Tabla 5. La adición combinada de vitamina K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> sí mostró mejoras en el rendimiento tanto en estudios de fermentación como de matraz. Estos no se han incluido en la solución madre de vitaminas actual, ya que se requiere más trabajo para investigar si esta complejidad adicional está justificada.

No se sabe si solo una o ambas de las vitaminas K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> son beneficiosas. Las vitaminas K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> no son solubles en agua y se disolvieron en DMSO para los experimentos realizados.

**Tabla 5** Solución madre de vitaminas (incluidas las concentraciones objetivo)

Número	Ingrediente	Concentración objetivo
1	Vitamina B12	2,5 mg/l
2	Uracilo	50 mg/l
3	Ácido nicotínico	10 mg/l
4	Pantotenato de calcio	50 mg/l
5	Piridoxal.HCl	25 mg/l
6	Piridoxamina.2HCl	25 mg/l
7	Riboflavina	50 mg/l
8	Tiamina.HCl	25 mg/l
9	Ácido p-aminobenzoico	5 mg/l
10	Biotina	5 mg/l
11	Ácido fólico	20 mg/l
12	Niacinamida	25 mg/l
13	β-NAD	62,5 mg/l
14	Mioinositol	50 mg/l

Es más fácil preparar una solución madre no estéril de vitaminas que pueda congelarse a -20 °C y almacenarse hasta por 12 meses. Añada aproximadamente del 20 al 30 % del volumen final de agua destilada fría en un vaso de precipitados de vidrio, una botella Schott o un matraz Erlenmeyer de vidrio (o cualquier otro vaso adecuado) con un agitador magnético. Pese cada componente de uno en uno y enjuague en el vaso con agua destilada fría con agitación vigorosa. Complete el volumen y asegúrese de que todos los ingredientes estén completamente disueltos y luego aplique 40 ml de partes alícuotas no estériles y congele a -20 °C (o más frío, si lo desea).

Solución de vitaminas/hemina

Es posible esterilizar por calor el componente de cloruro de hemina del medio basal de producción de metritis durante 20 a 30 minutos sin afectar significativamente los rendimientos de toxinas. Se requiere trabajo adicional para determinar si el medio que contiene cloruro de hemina puede esterilizarse por calor usando cargas de calor más altas sin afectar significativamente los rendimientos de la pirrolisina. Esta será una parte importante del diseño de fabricación de antígenos para permitir la robustez y el establecimiento de una plataforma global de vacunas.

Australia, por ejemplo, solo aceptaría una adición de cloruro de hemina esterilizada por calor o irradiada con rayos gamma (es decir, la adición de cloruro de hemina esterilizada con filtro no sería aceptable para las autoridades reguladoras australianas sin pruebas de agentes extraños). Sin embargo, hasta que esto se haya demostrado experimentalmente, se ha usado una solución de vitaminas/hemina esterilizada por filtración como un aditivo medio después de la esterilización por calor. Es importante preparar esta solución el día de la inoculación del(de los) fermentador(es) debido a su corta vida útil. Se usó una solución combinada de hemina y vitaminas para minimizar el aumento de volumen en los fermentadores (de lo contrario, se requerirían 40 ml/l de una solución de cloruro de hemina y vitaminas). Las materias primas necesarias para preparar la solución de vitaminas/hemina se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6** Solución de vitaminas/hemina (incluidas las concentraciones objetivo)

Número	Ingrediente	Concentración objetivo
1	Cloruro de hemina	100 mg/l
2	Solución de NaOH 1 M	10 ml/l
3	Solución de vitaminas	1 l/l

La solución de vitaminas/hemina siempre se prepara fresca en el día requerido. Descongele la cantidad requerida de solución madre de vitaminas y mezcle agitando. El cloruro de hemina primero se disuelve en el volumen adecuado de NaOH 1 M y cuando está completamente disuelto, se añade al volumen requerido de solución de vitaminas no estéril. Esto produce un volumen ligeramente mayor que el total requerido por la cantidad de NaOH añadido, pero este aumento del 1 % es insignificante. Hasta que se resuelva el efecto de la esterilización por calor sobre la hemina en el medio basal, este procedimiento de preparación es satisfactorio. Si se decide permanecer con una solución de hemina/vitaminas esterilizada con filtro, entonces esto podría realizarse con mayor precisión preparando la solución madre de vitaminas a un 95 % de volumen y luego completando el volumen después de la adición de hemina. Esterilice con filtro la solución y almacene de 2 a 8 °C hasta que esté lista para su uso el día de la preparación.

**Tabla 7** Solución de glucosa al 50 % (incluidas las concentraciones objetivo)

Número	Ingrediente	Concentración objetivo
1	Glucosa	500 g/l

Coloque cerca del hervor aproximadamente el 50 % del volumen final de agua destilada en un vaso de precipitados de vidrio cubierto con papel de aluminio (o similar) con un agitador magnético. Añada lentamente el polvo de glucosa y continúe agitando mientras se cubre con calentamiento (evitando que la solución hierva) hasta que esté completamente disuelto. Complete el volumen, deje enfriar y esterilice por filtración.

**Tabla 8** Solución de EGTA al 10 % pH 5,8 (incluidas las concentraciones objetivo)

Número	Ingrediente	Concentración objetivo
1	EGTA	100 g/l
2	NaOH al 30 %	~27 ml/l
3	NaOH 1 M	ND

Añada EGTA a aproximadamente el 60 % del volumen final de agua destilada fría en un vaso de precipitados de vidrio con un agitador magnético. Con agitación continua, mida el pH inicial de la solución que aparecerá como una suspensión en esta etapa. Añada rápidamente el 80 % del 30 % p/v total de la solución de NaOH requerida con un pH objetivo de 5,8 cuando esté completamente disuelto. Cuando esté casi disuelto, añada lentamente el resto del 30 % p/v de NaOH requerido para alcanzar el pH objetivo, así como para lograr una disolución completa. Es fácil sobrepasar el pH objetivo al final de la preparación, por lo que en este punto puede ser mejor usar NaOH 1 M para el ajuste final. Si el pH objetivo se sobrepasa ligeramente, se puede volver a ajustar con una solución de HCl 2 M (o similar). Después de ajustar con precisión a un pH de 5,8, complete el volumen y esterilice con filtro.

**Tabla 9** Solución de lactosa al 50 % (incluidas las concentraciones objetivo)

Número	Ingrediente	Concentración objetivo
1	Lactosa	500 g/l

Coloque cerca del hervor aproximadamente el 50 % del volumen final de agua destilada en un vaso de precipitados de vidrio cubierto con papel de aluminio (o similar) con un agitador magnético. Añada lentamente el polvo de lactosa

y continúe agitando mientras se cubre con calentamiento (evitando que la solución hierva) hasta que esté completamente disuelto. Complete el volumen, deje enfriar y esterilice por filtración.

**Tabla 10** Solución de lactosa al 6 % (incluidas las concentraciones objetivo)

Número	Ingrediente	Concentración objetivo
1	Lactosa	60 g/l

- 5 Añada polvo de lactosa a aproximadamente el 80 % del volumen final de agua destilada en un vaso de precipitados con un agitador magnético y mezcle hasta que esté completamente disuelto. complete el volumen y esterilice con filtro.

#### Escalabilidad de la fermentación

- 10 El procedimiento de fermentación de *T. pyogenes* se ha desarrollado con éxito a escalas de 0,5, 2, 5 y 35 l. Por lo general, los cambios en las propiedades fisicoquímicas más desafiantes se observan cuando los procedimientos de fermentación se escalan de laboratorio a escala piloto. Sin embargo, no se observaron problemas durante el aumento a escala a una escala piloto de 35 l, y el procedimiento demostró una buena escalabilidad desde pequeños fermentadores a escala de laboratorio. Basándose en la buena escalabilidad del procedimiento observada hasta el momento, no se esperan problemas al aumentar a escala los vasos de producción.

La **Tabla 11** resume los parámetros físicos clave de los fermentadores probados.

15 **Tabla 11** Parámetros físicos de los fermentadores

	0,5 l	2 l	5 l	35 l
<b>Tipo de vaso</b>	Vidrio	Vidrio	Vidrio	Acero inoxidable
<b>Controlador</b>	Sartorius DCU Biostat Q	Sartorius Biostat B-DCU II	Sartorius Biostat B-DCU II	Sartorius DCU táctil
<b>Software de control</b>	Sartorius MFCS versión 3.0			
<b>Altura del vaso</b>	104 mm	175 mm	250 mm	482 mm
<b>Diámetro del vaso</b>	85 mm	130 mm	160 mm	305 mm
<b>Relación de aspecto del vaso</b>	1,22:1 (en 0,5 l)	1,35:1 (en 2 l)	1,56:1 (en 5 l)	1,58:1 (en 35 l)
<b>Tipo y número de propulsor</b>	1 x Rushton 6 palas	2 x Rushton 6 palas	2 x Rushton 6 palas	3 x Rushton 6 palas
<b>Diámetro del propulsor</b>	49 mm	53 mm	62 mm	101 mm
<b>Volumen del vaso</b>	0,67 l	3 l	6,6 l	50 l
<b>Volumen de trabajo</b>	0,45 a 0,5 l	2 a 2,2 l	4 a 5 l	35 l
<b>Tipo de aspensor</b>	Orificio perforado	Orificio perforado	Orificio perforado	Orificio perforado
<b>Agitación</b>	70 rpm	20 a 600 rpm	50 rpm	35rpm
<b>Número de controladores de flujo de masa por vaso</b>	1	6	6	4
<b>Gases requeridos</b>	Aire, nitrógeno y oxígeno			

(continuación)

	0,5 l	2 l	5 l	35 l
<b>Caudales de gas</b>	0,03 a 0,2 vvm	0,05 a 0,2 vvm	0,03 a 0,2 vvm	0,03 a 0,2 vvm
<b>Número de puertos de la sonda</b>	Al menos 3	Solo 3	Solo 3	Solo 3
<b>¿Capacidad de control redox?</b>	Disponible, pero no probado	Instalado y probado	Disponible, pero no probado	No disponible, puede medir solo redox
<b>¿Entradas externas disponibles?</b>	Sí, 1 solo por vaso	Sí, 2 por vaso	Sí, 2 por vaso	No
<b>Numero de bombas requeridas</b>	1 por adición de base y 1 por alimentación	1 por adición de base y 1 por alimentación	1 por adición de base y 1 por alimentación	1 por adición de base y 1 por alimentación

Estrategia de fermentación

Antes de la inoculación, las condiciones de funcionamiento iniciales para los fermentadores probados hasta la fecha se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12** Parámetros de funcionamiento iniciales de los fermentadores

	0,5 l	2 l	5 l	35 l
<b>Temperatura</b>	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
<b>Velocidad inicial del agitador</b>	70 rpm	45 rpm	50 rpm	35 rpm
<b>Control de pO<sub>2</sub> usando O<sub>2</sub> puro solo</b>				
<b>Punto de referencia</b>	5 %	5 %	5 %	5 %
<b>Zona muerta</b>	Cero	Cero	Cero	Cero
<b>XP</b>	5 %	5 %	5 %	5 %
<b>TI</b>	999 s	5000 s	5000 s	999 s
<b>TD</b>	10 s	10 s	10 s	10 s
<b>Flujo máx de O<sub>2</sub></b>	0,03 vvm	0,05 vvm	0,03 vvm	0,03 vvm
<b>Caudal de aire inicial</b>	Apagado	Apagado	Apagado	Apagado
<b>pH de inicio</b>	7,0 a 7,4	7,0 a 7,4	7,0 a 7,4	7,0 a 7,4
<b>Procedimiento de control del pH</b>	Base unidireccional usando NaOH del 30 al 40 %	Base unidireccional usando NaOH del 30 al 40 %	Base unidireccional usando NaOH del 30 al 40 %	Base unidireccional usando NaOH del 30 al 40 %
<b>Control del pH</b>				
<b>Punto de referencia</b>	6,15	6,15	6,15	6,15
<b>Zona muerta</b>	Cero	Cero	Cero	Cero
<b>XP</b>	15 %	15 %	15 %	15 %
<b>TI</b>	999 s	1000s	1000s	999 s

(continuación)

	0,5 l	2 l	5 l	35 l
<b>TD</b>	0 s	0 s	0 s	0 s
<b>Control redox</b>	Sin probar todavía	-250 mV usando algoritmos	Sin probar todavía	Sin probar todavía

Control del oxígeno disuelto y ambiente de CO<sub>2</sub>

La estrategia actual para producir los rendimientos más altos de pirrolisina a partir de *T. pyogenes* es inocular el medio de producción completo de metritis en cada fermentador con un 0,5 % de células SS2 en crecimiento activo. El crecimiento inicial se inicia con una velocidad de agitación lenta y el uso de oxígeno puro a pedido para mantener un punto de referencia de oxígeno disuelto del 5 % con un caudal máximo de 0,05 vvm. El concepto detrás de esta estrategia es permitir que las células crezcan rápidamente, pero también minimizar la separación del CO<sub>2</sub> de la fase líquida mediante burbujas de gas. Esta es la razón para usar oxígeno en lugar de aire. Los problemas con el funcionamiento incorrecto de las sondas de OD han ocasionado problemas al usar esta estrategia, por lo que puede ser igualmente bueno implementar un caudal de oxígeno continuo de 0,05 vvm hasta la fase de control redox.

Control redox

La razón por la que el control redox se emplea como parte de la estrategia de fermentación para *T. pyogenes* es para mantener con precisión las condiciones ambientales microaerófilas óptimas para maximizar la productividad de la pirrolisina. Aunque no es técnicamente correcto, es un procedimiento para controlar niveles muy bajos de oxígeno disuelto que no se pueden medir con una sonda de oxígeno disuelto óptica o polarizada convencional. El control redox también ayuda a impulsar reacciones catabólicas importantes tanto en cultivos microaerófilos como aeróbicos. La ventaja del control redox es una mayor mejora de la robustez del procedimiento, por lo que la variabilidad de los lotes de los componentes del medio complejo (por ejemplo, triptona y extracto de levadura) se minimiza mediante el autoajuste del sistema al nivel redox óptimo. En un sistema sin control redox, los rendimientos celulares más bajos observados con un lote pobre de triptona darían lugar a una condición microaerófila subóptima que causaría rendimientos de pirrolisina reducidos. El control redox tiene la capacidad de ajustar automáticamente el ambiente microaerófilo de la fermentación al nivel óptimo sin reparar en pequeñas variaciones en la calidad de las materias primas. La desventaja del control redox es que las sondas redox no se pueden calibrar, pero solo su salida se puede comparar con los valores teóricos de las soluciones convencionales. Estos valores también tienen un error bastante grande de aproximadamente  $\pm 20$  mV.

El control redox no se puede usar inmediatamente después de la inoculación, ya que el sistema requiere suficientes células en crecimiento activo para generar un ambiente gaseoso disuelto lo suficientemente grande como para proporcionar el "impulso" necesario para que el redox sea más bajo que el punto de referencia de control. Esta es la razón por la que el control de pO<sub>2</sub> se usa para la fase de crecimiento inicial de la fermentación.

La estrategia actual de control redox se diseñó usando cambios en la velocidad del agitador a una velocidad fija de rociado de aire para aumentar la redox, y reducir la velocidad de rociado de aire para disminuir la redox. Se usó aire en lugar de oxígeno con un esfuerzo para eliminar por completo la necesidad de usar cualquier oxígeno puro en el procedimiento final de fermentación GMS. La desventaja de usar aire es que la concentración óptima de CO<sub>2</sub> disuelto para maximizar los rendimientos de pirrolisina puede no ser posible con la mayor velocidad de burbujeo del gas.

Actualmente se está usando un algoritmo para controlar la redox (consulte el apéndice 2). Este tipo de algoritmo se puede mejorar en su nivel de sofisticación y capacidad de autoajuste, sin embargo, si se toma la decisión de avanzar con el control redox en el procedimiento de fabricación final, existen alternativas más sólidas disponibles. Una solución tal vez sea tener un proveedor de fermentadores adecuado para hacer un sistema de control PID en cascada similar al que ya está instalado para el pO<sub>2</sub>, por lo que el control también podría conectarse en cascada a través del agitador, el aire y el rociado de oxígeno. Como alternativa, hay fermentadores de control redox personalizados disponibles que controlan la redox pasando una corriente eléctrica a través del cultivo.

Control del CO<sub>2</sub>

Aún no se ha probado una estrategia para controlar el CO<sub>2</sub>. Sin embargo, se cree que controlar la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto puede ayudar a optimizar y mantener la uniformidad en los rendimientos de la pirrolisina. Si bien, probar la estrategia de control redox con una sonda de CO<sub>2</sub> disuelto Mettler Toledo InPro5000i *in situ*, se observó claramente que los caudales de rociado superior de gas tenían un efecto significativo sobre las concentraciones de CO<sub>2</sub> disuelto. La velocidad del agitador pareció tener un efecto mínimo sobre los niveles de CO<sub>2</sub>.

El algoritmo de control redox también podría usarse para controlar el CO<sub>2</sub> disuelto. Un algoritmo complementario escrito podría aumentar o disminuir los caudales de rociado de gas cuando se requiera para controlar una salida de

una sonda de CO<sub>2</sub> disuelto u otro dispositivo de medición de CO<sub>2</sub> (por ejemplo, medición de gases de escape). Esto también podría realizarse desde un controlador de flujo másico separado, de modo que los controles redox y CO<sub>2</sub> sean independientes entre sí. Este concepto ha sido probado de forma manual y funciona, aunque se requiere un cierto esfuerzo para determinar, en primer lugar, si se disuelve o no concentración de CO<sub>2</sub> es importante para optimizar los rendimientos de pirrolisina, y si se descubre que es importante, entonces cuál es el nivel de control óptimo.

Si se descubre que el CO<sub>2</sub> disuelto es importante para optimizar los rendimientos de la pirrolisina, probablemente será más fácil controlar el nivel óptimo usando rociado de oxígeno puro en lugar de aire, debido al control más fino habilitado a través del caudal de gas más bajo requerido.

#### 10 Inhibición de la proteasa

Se deben añadir veinte mililitros de solución de EGTA al 10 % (pH 5,8) por litro de cultivo cuando la concentración de glucosa residual sea inferior a 8 mM y la DO<sub>600</sub> sea mayor que 2,5. Si la concentración de glucosa inicial está en el intervalo de inicio correcto de 14 ± 2 mM, entonces el momento de la adición de EGTA es de aproximadamente 10 a 12 horas después de la inoculación. Esta es una parte crítica de la estrategia de fermentación, y debe ser monitoreada y realizada cuidadosamente. Aunque EGTA quela muchos iones metálicos divalentes, tiene una afinidad muy alta por los iones Ca<sup>2+</sup>. La razón por la que EGTA se añade al cultivo es para inhibir la actividad (y posiblemente la formación) de proteasas. Los investigadores han demostrado que el calcio es el principal metal implicado en la actividad de la proteasa en cultivos de *T. pyogenes*. Cuando se añade calcio extra a los matraces con la cantidad normal de EGTA, las concentraciones de pirrolisina se reducen rápidamente, pero la adición de magnesio mejoró los rendimientos.

#### Lactosa

Es importante añadir la solución de lactosa antes del agotamiento de la glucosa para que el crecimiento no se detenga, pero la estrategia empleada ha sido añadir lactosa al cultivo después de la adición de EGTA. Podría añadirse a la preinoculación del cultivo, pero la única razón para añadirla después de la adición de EGTA es permitir una monitorización precisa de la glucosa residual para la etapa de adición de EGTA mucho más crítica. Si es posible monitorizar la concentración de glucosa en presencia de lactosa, entonces esta metodología podría cambiarse fácilmente sin ningún efecto perjudicial sobre el rendimiento.

Se han realizado varios estudios usando la alimentación de lactosa tanto por lotes como por lotes alimentados. En este momento, no se sabe si una estrategia de alimentación por lotes proporciona algún beneficio sobre una o varias adiciones en embolada de lactosa. Las adiciones en embolada se han realizado usando adiciones de solución de lactosa al 50 %. Debido a la muy baja velocidad de alimentación requerida, se ha usado una solución de lactosa al 6 % para las fermentaciones por lotes alimentados para permitir el uso de bombas peristálticas a un volumen de trabajo de 2 l. Una desventaja de este procedimiento es el mayor efecto de dilución. Se podría añadir una solución más concentrada usando procedimientos de bombeo de mayor precisión (por ejemplo, bombas de jeringa). Como alternativa, si se observan beneficios usando una estrategia de alimentación por lotes, entonces podrían añadirse otros nutrientes y/o ingredientes al alimento (por ejemplo, triptona, magnesio, cloruro de hemina, etc.).

#### Magnesio

Se realizó un pequeño estudio en matraz usando diversas fuentes de magnesio. El sulfato de magnesio inorgánico se comparó en concentraciones de magnesio equimolar con tres fuentes de magnesio orgánico (gluconato de magnesio, citrato de magnesio y clorofila). El gluconato de magnesio proporcionó los mayores rendimientos de pirrolisina, sin embargo, si esta materia prima es difícil de obtener, entonces los estudios de optimización podrían realizarse fácilmente usando otras fuentes de magnesio ya disponibles. El concepto detrás de la prueba de las fuentes de magnesio orgánico es que EGTA debería ser menos capaz de secuestrar el magnesio que está más estrechamente unido que con los enlaces iónicos débiles de las fuentes inorgánicas. Hubo preocupación de que la simple adición de niveles más altos de magnesio inorgánico podría permitir una mayor producción de proteasas (aunque esto puede ser infundado). Dado que el magnesio es necesario para el crecimiento, la mayor masa de células observada con la adición de magnesio debería dar como resultado rendimientos de pirrolisina más altos (como se observa en este estudio en matraz).

#### Procedimientos analíticos en proceso

##### 50 Densidad óptica

El crecimiento celular se determina por los cambios en la densidad óptica medidos a 600 nm en un espectrofotómetro. El agua se usa generalmente como diluyente cuando los valores exceden de 0,5 para asegurar que las muestras se mantengan dentro del intervalo lineal de precisión de medición de absorbancia. El uso del medio de crecimiento de producción proporciona una leve mejora en la precisión, de modo que se deduce la absorbancia de fondo. Esto generalmente no se considera necesario ya que solo afecta realmente los resultados de la etapa inicial de la fase de crecimiento del cultivo.

Glucosa residual

La glucosa residual se mide usando un analizador de glucosa en sangre de mano, disponible en el mercado. Después de insertar la tira de prueba en el dispositivo y esperar una indicación de que está listo para una muestra, se colocan aproximadamente de 10 a 20 µl de cultivo de fermentación sin filtrar en la punta de la tira de prueba y se proporciona un resultado en milimoles por litro.

Lactosa residual

El mismo analizador usado para la glucosa residual también da un resultado para la lactosa residual. El valor real proporcionado no es preciso, pero aún permite el monitoreo de niveles relativos de lactosa residual satisfactorios para el monitoreo de la fermentación. Sin embargo, se ha observado que el crecimiento disminuye significativamente cuando los niveles de lactosa residual caen por debajo de 3 mM al usar este instrumento. Tanto para la alimentación de lactosa en embolada como por lotes alimentados, es necesario mantener una concentración de lactosa residual mayor que 3 mM.

Concentración de pirrolisina

La principal técnica analítica en proceso usada para medir las concentraciones de pirrolisina es la cromatografía líquida de fase inversa usando una CLAR. La otra técnica altamente sensible es un ensayo de hemólisis que mide la concentración de pirrolisina asignando una unidad de hemólisis arbitraria a un patrón bruto y luego mide otras muestras haciendo referencia a este patrón. Este ensayo es muy útil para medir los niveles de inactivación en muestras de toxoides de pirrolisina. Debido a su alta sensibilidad, los errores de dilución se magnifican para las muestras de pirrolisina con altas concentraciones (por encima de 50 µg/ml), lo que hace que el ensayo sea bastante variable a menos que se tenga mucho cuidado.

Prueba de pureza

La pureza del cultivo se puede probar con estrías en placas de agar de sangre de oveja o caballo (SBA o HBA). Incuba las placas aeróbicamente durante 48 a 96 horas a 37 °C. La incubación en un ambiente de CO<sub>2</sub> aumenta la velocidad de crecimiento. Un cultivo puro aparecerá como pequeñas colonias blancas/cremas, convexas y brillantes. Las placas también pueden incubarse, sin embargo, las colonias de *T. pyogenes* también crecerán (aunque más lentamente) en estas condiciones. La contaminación se identifica observando otros tipos de colonias en las placas.

Recolección y extracción de células

Actualmente, el momento de la recolección no está bien definido, pero comienza cuando la concentración de pirrolisina deja de aumentar en la fase estacionaria tardía, aproximadamente 60 a 70 horas después de la inoculación.

La recolección de cultivos y la extracción de células en las escalas de investigación y desarrollo se han realizado enfriando el cultivo a menos de 20 °C, recolectando asépticamente y centrifugando en recipientes de centrifugación preesterilizados a 6.000 x g durante 15 a 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se decanta luego asépticamente en un vaso estéril adecuado y se esteriliza por filtración a través de un filtro de grado de esterilización de baja unión a proteínas. Las membranas de acetato de celulosa han sido la primera opción debido a su propiedad de unión a proteínas muy baja. Los filtros de Sartorius Sartobran se han usado generalmente con un área de membrana de filtro adecuada elegida para adaptarse al volumen que se filtra. Por ejemplo, un Sartorius Sartobran P de 500 cm<sup>2</sup> tiene capacidad suficiente para filtrar al menos 5 l de sobrenadante de cultivo. Estos filtros tienen un prefiltro de 0,45 µm y un filtro de esterilización de 0,2 µm, pero el sobrenadante no es difícil de filtrar, cuando los equivalentes de otros proveedores deberían ser igualmente adecuados.

Concentración y diafiltración

La concentración del producto se ha realizado usando un dispositivo de filtración de flujo tangencial Sartorius Alpha con casetes Sartocon Slice Sartorius de 10 kDa Hydrosart (acetato de celulosa modificado) y 10 kDa PES (polietersulfona) como un procedimiento no estéril. Los casetes Hydrosart demostraron un rendimiento superior a los casetes PES con una recuperación del 100 % en comparación con solo aproximadamente del 70 % para PES. Este resultado se basa en un número limitado de ejecuciones de procesamiento, en las que se requieren pruebas experimentales más rigurosas para comparar cuidadosamente los rendimientos de la membrana.

Antes de comenzar la concentración, el volumen del sobrenadante inicial se mide cuidadosamente en un cilindro medidor de vidrio, se dispensa en el dispositivo de filtración de flujo tangencial y luego se acondiciona a través de la(s) membrana(s) circulando durante 10 minutos con la línea de permeado cerrada. Después de esta configuración inicial, todo el procesamiento de ultrafiltración se realizó con las presiones de alimentación, retenido y permeado mantenidas a 150, 50 y cero kPa, respectivamente, y la temperatura del producto se mantuvo a 15 ± 2 °C. El sobrenadante de pirrolisina bruto generalmente se concentra aproximadamente 10 veces y luego se diafiltra 4 a 5 veces con MES 50 mM/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 500 mM, pH 5,8 (el tampón de inicio de la purificación). Al concluir las etapas de concentración y diafiltración, el sistema se drena cuidadosamente para minimizar la formación de espuma del

producto, lo que puede reducir las velocidades de recuperación. El volumen del producto se mide luego en un cilindro medidor de vidrio para calcular con precisión la concentración final. A continuación, el producto se esteriliza por filtración a través de un filtro de esterilización con acetato de celulosa (generalmente un filtro Sartorius Sartobran) y, si no se purifica de inmediato, se divide en partes alícuotas en volúmenes adecuados (generalmente de 100 a 250 ml) y se congela a -70 °C hasta que esté listo para la purificación.

### Ejemplo 3. Otras mejoras para aumentar el nivel de expresión de la pirrolisina.

Antes de la evaluación de diversas materias primas en los medios, se realizaron mejoras adicionales a los parámetros de fermentación. Con respecto a los parámetros de control, se determinó que para el trabajo de desarrollo a escala experimental, una estrategia de control redox que usa el rociado de O<sub>2</sub>, limitado a 0,1 vvm con agitación, pero que aumentará si fuera necesario para mantener el punto de referencia redox, fue óptima. El punto de referencia redox usado para el trabajo de desarrollo fue de -447 mV. Se llevarán a cabo trabajos adicionales para establecer el intervalo redox (mv) y otros procedimientos potenciales de control de oxígeno y agitación.

Con respecto a los parámetros de control de la fermentación, el pH inicial del cultivo fue de 7,2, y se dejó caer hasta un pH de 6,15 durante el procedimiento de fermentación, en el que se mantuvo. Se realizará un trabajo adicional para establecer el intervalo de control del pH y el control constante del pH. Durante la fase de crecimiento de la fermentación inicial, el oxígeno disuelto (OD) se mantuvo al 5 %, con un rociado de oxígeno limitado a 0,1 vvm; la agitación era limitada también. Cuando la densidad óptica objetivo (600 nm) del cultivo alcanzó al menos 2,5, el cultivo se alimentó con lactosa hasta una concentración final de 30 g/l y EGTA hasta una concentración final de 2 g/l. En este momento, el control se cambió del punto de referencia de OD al programa de control redox, para el crecimiento continuo y la fase de producción de toxinas de la fermentación. La fase de producción de toxinas se continuó durante 30-70 horas adicionales, para la recolección en el momento máximo de producción de la pirrolisina.

Con estos parámetros mejorados implementados, se realizó la evaluación de diversas materias primas en los medios, con el fin de determinar si las fuentes existentes aprobadas por la fabricación serían adecuadas. Después de múltiples ejecuciones de fermentación, se concluyó que se usaría polisorbato 80 a base de verduras, en lugar de polisorbato 80 a base de animales. También se determinó que se prefería el extracto de levadura procedente de Becton Dickinson, valorado a una concentración de 5 gramos/litro. También se determinó que se usaría Oxoid™ triptona.

Anteriormente, la solución de vitaminas añadida al cultivo de fermentación para aumentar el rendimiento de la pirrolisina se preparaba internamente. En un esfuerzo por simplificar el procedimiento de fermentación, se pensó que sería útil comprar una solución de vitaminas disponible en el mercado. Se eligió una solución de vitaminas premezclada de Sigma, "RPMI 1640", debido a que es la más parecida a la preparación de vitaminas interna. Se diseñó un experimento para probar el rendimiento de la pirrolisina usando vitaminas RPMI 1640 frente a las vitaminas internas en fermentadores de 2 l. Los resultados de ese experimento, mostrados en la Figura 1, demostraron que la solución de vitaminas RPMI 1640 se desempeñaba mal en comparación con la solución de vitaminas interna. Cuatro componentes que estaban presentes en la solución de vitaminas interna no se incluyeron en la solución de vitaminas RPMI 1640 ( $\beta$ -NAD, piridoxal, uracilo y ácido nicotínico). Dado que se demostró que el uracilo y el ácido nicotínico no se consumen durante la fermentación (datos no mostrados), se pensó que la falta de  $\beta$ -NAD y/o piridoxal era la causa más probable de la reducción del rendimiento. Se diseñó un experimento para probar la hipótesis de que la adición de  $\beta$ -NAD y/o la suplementación con piridoxal de las vitaminas RPMI 1640 puede aumentar el rendimiento de esta solución de vitaminas. Como se muestra en la Figura 2, el rendimiento de la pirrolisina fue similar entre la solución de vitaminas interna y la solución de vitaminas RPMI 1640 complementada. Se diseñó un experimento adicional para probar si el  $\beta$ -NAD y/o el piridoxal pueden ser los únicos componentes vitamínicos requeridos para complementar el medio de cultivo. Los resultados de este experimento (Fig. 3) confirmaron que el piridoxal era la única vitamina requerida para ser complementada en el medio de cultivo para aumentar el rendimiento de la pirrolisina. En cuanto a cuando se añade piridoxal a los medios, debe hacerse como una solución estéril después de la esterilización por calor, sin embargo, como autoclave, sin afectar la DO del cultivo (Fig. 4), condujo a una disminución en el nivel de producción de la pirrolisina (Fig. 5).

Con respecto a la hemina utilizada en los medios, se determinó que la irradiación de la materia prima en polvo no parecía tener un efecto directo ni en la DO del cultivo ni en el nivel de producción de la pirrolisina, como se muestra en las Fig. 6 y Fig. 7. La Fig. 8 demuestra que la producción de pirrolisina disminuye a medida que aumenta la vida útil de la solución de hemina; por lo tanto, la hemina se añadió inmediatamente antes de la esterilización por calor.

Además de los diversos componentes de los medios, se llevaron a cabo investigaciones adicionales sobre la temperatura a la que se produjo la fermentación. Anteriormente, las fermentaciones se realizaban a 37 °C. Los experimentos posteriores, sin embargo, indicaron que un punto de referencia inferior de 36 °C (versus las temperaturas más altas), si bien no tienen un efecto significativo en la DO del cultivo (Fig. 9), resultaron en un aumento en la cantidad de pirrolisina producida (Fig. 10). Luego se planteó la cuestión de qué efecto podría tener una temperatura aún más baja en el nivel de producción de la pirrolisina. El resultado de estos experimentos lleva a la conclusión de que si bien las temperaturas más bajas conducen a una disminución en la DO del cultivo (Fig. 11), también conducen a un aumento en el nivel de la pirrolisina producida, con una temperatura óptima actual de 32 °C (Fig. 12). En cuanto a si mantener la temperatura del cultivo a 32 °C, o cambiarla de 37 °C a 32 °C durante el

procedimiento de fermentación, que da como resultado mejores rendimientos de pirrolisina, se determinó que la temperatura constante era mejor que el cambio (Fig. 13).

#### **Ejemplo 4. Mejoras adicionales en el procedimiento de purificación de la pirrolisina.**

5 La concentración de la recolección de fermentación clarificada se realizó usando cartuchos de fibra hueca de polisulfona de 10 kDa, con > 95 % de recuperación de pirrolisina. Después de la concentración, se añadió una solución de MES 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 M, pH 5,8, al concentrado para lograr una concentración final de sulfato de sodio 0,425 M. El material tratado con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se filtró antes de la aplicación a la columna de cromatografía.

10 La pirrolisina se purificó a través de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina de fenil sefarosa equilibrada con MES 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 425 mM, pH 5,8. La pirrolisina se cargó en la columna a una concentración desde 1 G de pirrolisina/ litro de resina hasta 12 G de pirrolisina/litro de resina. Luego se eluyó en MES 50 mM, pH 5,8, con un rendimiento de pirrolisina > 80 %. La proteína purificada se concentró luego, seguido de un intercambio de tampón en tampón fosfato (sodio o potasio). A continuación se determinó la actividad hemolítica, para asegurar que la proteína activa se había purificado. Esto se hizo por dilución en serie de la pirrolisina con el tampón de ensayo, seguido de incubación a 37 °C de la pirrolisina con glóbulos rojos de caballo. Luego se centrifugó para sedimentar los glóbulos rojos intactos, el material soluble (lisado) se transfirió a una placa nueva, se midió la DO a 405 nm y se representaron los resultados. Las unidades hemolíticas se determinaron en el punto medio de la curva, y la pirrolisina se consideró desintoxicada cuando las unidades hemolíticas eran inferiores a 1000. Luego se usaron UPLC y SDS-PAGE para confirmar la identidad de la proteína aislada. Finalmente, la pirrolisina se inactivó mediante tratamiento con 0,10 % a 0,5 % (v/v) de formalina durante 20-48 h a 20 °C, y luego se filtró de forma estéril.

20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para aumentar el rendimiento de la pirrolisina producida por *Trueperella pyogenes*, en el que el procedimiento comprende: A) cultivar *T. pyogenes* en un medio basal que contiene glucosa, así como una fuente de carbono concentrado adicional seleccionada entre el grupo que consiste en: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, oligosacáridos, glicerol, lactosa, dextrano, dextrina, mono metil succinato y N-acetil glucosamina; B) añadir un agente quelante al medio antes del agotamiento de la glucosa en el medio; C) recolectar *T. pyogenes*, y D) aislar la pirrolisina.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fuente de carbono concentrado adicional es lactosa.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente quelante es ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o una combinación de los dos.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en la que el agente quelante es EGTA.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que *T. pyogenes* se replica en una densidad de células bacterianas más alta que una densidad óptica (DO) de 5 a 600 nm.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio se mantiene a una temperatura entre 21-37 °C.
- 15 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el medio se mantiene a una temperatura entre 28-32 °C.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además el uso del medio basal, en el que el pH del medio está entre 6,0 y 8,0.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además el uso del medio basal, en el que el medio comprende hemina como fuente de hierro.
- 20 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además el uso del medio basal que comprende Polisorbato 80 (Tween 80).
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además el uso del medio basal que comprende una solución de vitaminas.
- 25 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la solución de vitaminas comprende uno o más de los siguientes: Vitamina B12; mioinositol; nucleobase del uracilo; ácido nicotínico; pantotenato de calcio; piridoxal-HCl; piridoxamina-2HCl; riboflavina; tiamina-HCl; ácido p-aminobenzoico; biotina; ácido fólico; niacinamida; y  $\beta$ -NAD.
13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la solución de vitaminas comprende piridoxal-HCl.
- 30 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además permitir que el pH del cultivo disminuya desde el medio basal inicial, comenzando el pH a un nivel entre 5,50 y 6,50 y a continuación controlar el pH entre 5,50 y 6,50 mediante la adición automática de un titulador básico.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende además separar las proteasas de *T. pyogenes* de la pirrolisina mediante una etapa de cromatografía.

Figura 1

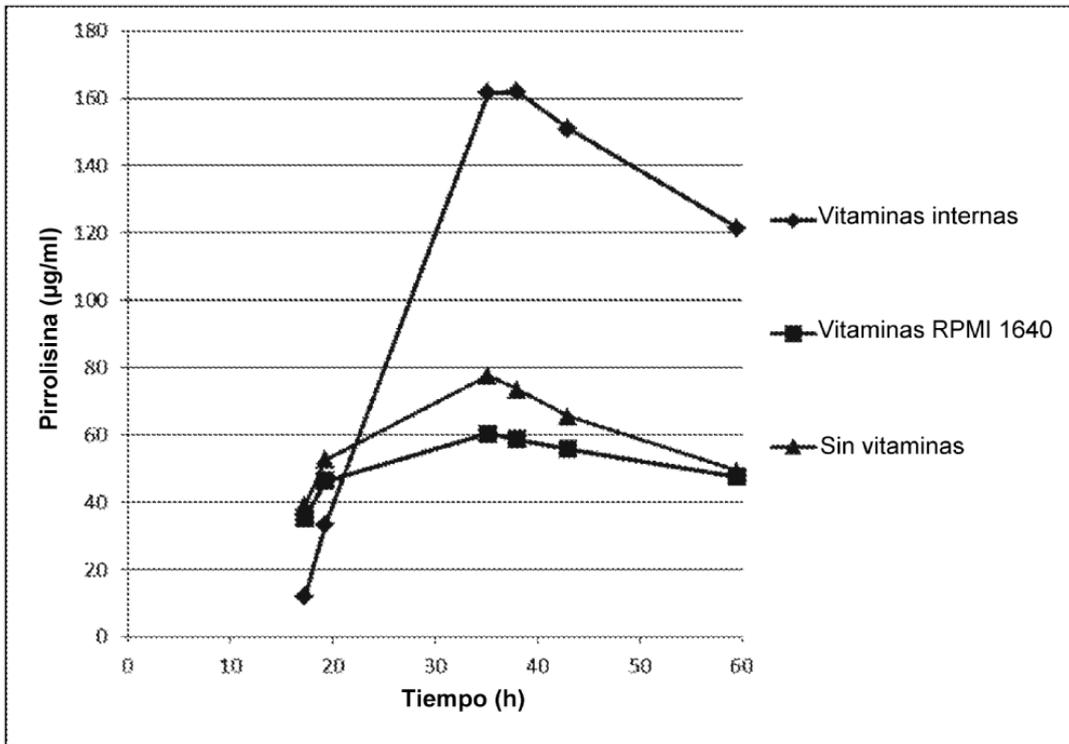


Figura 2

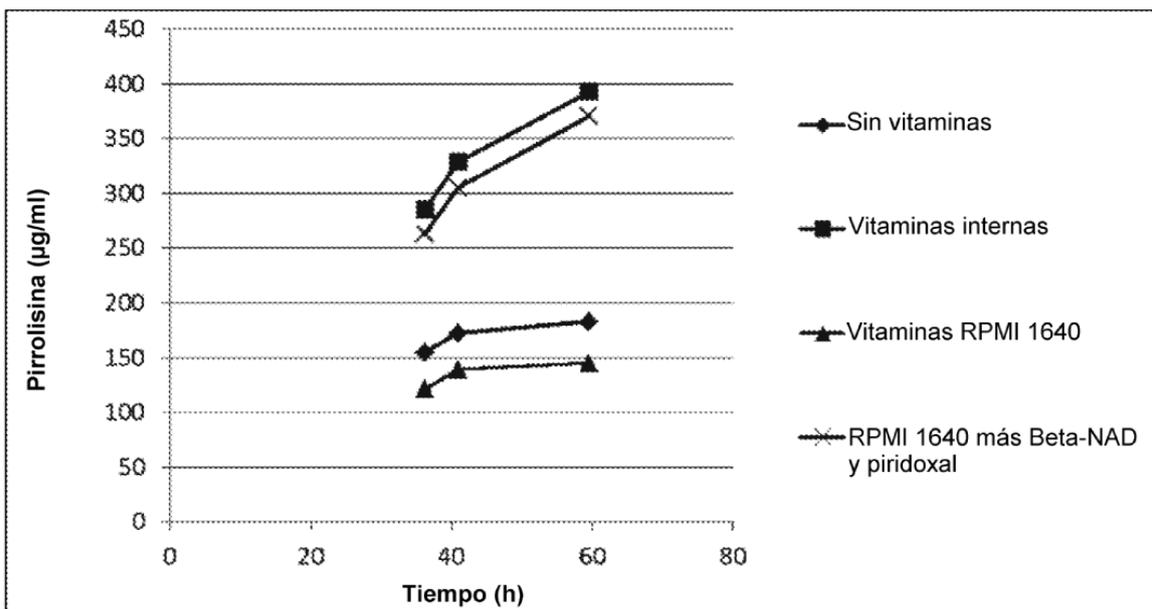


Figura 3

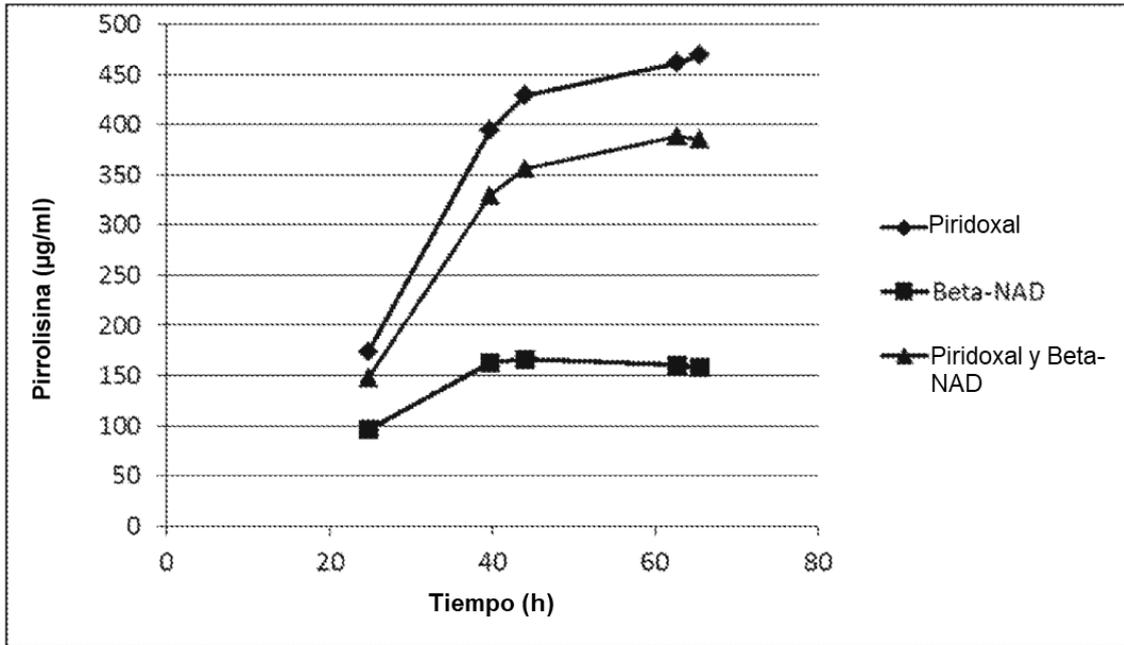


Figura 4

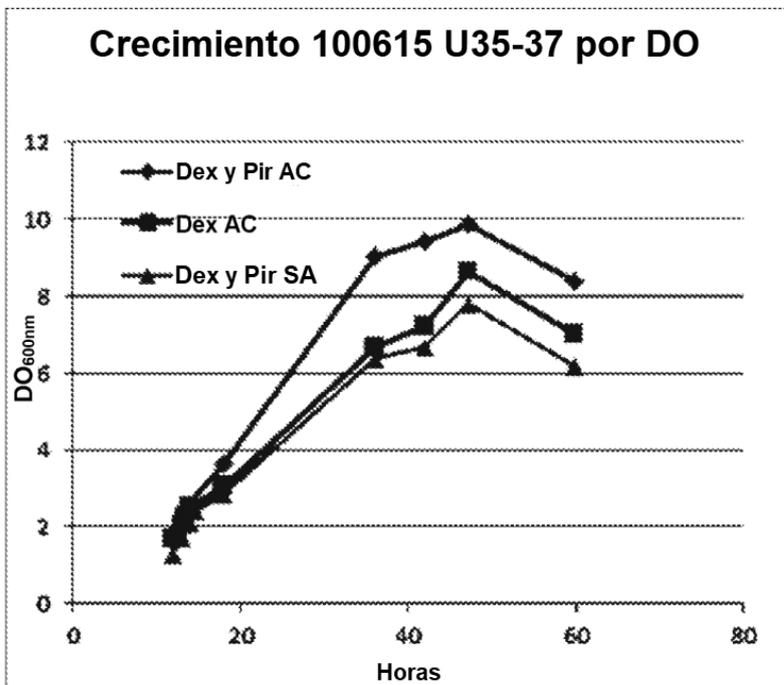


Figura 5

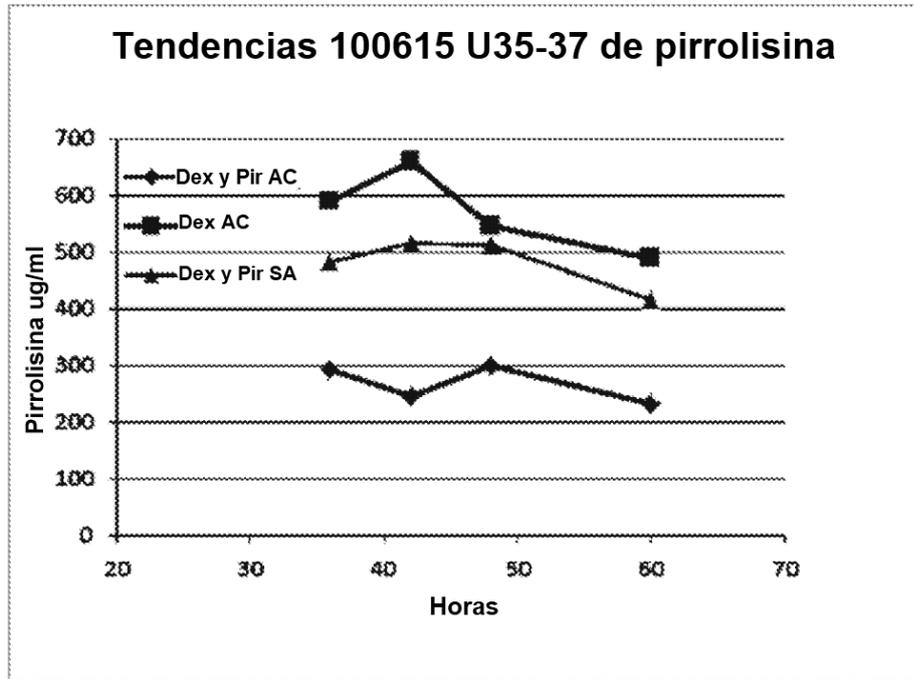


Figura 6

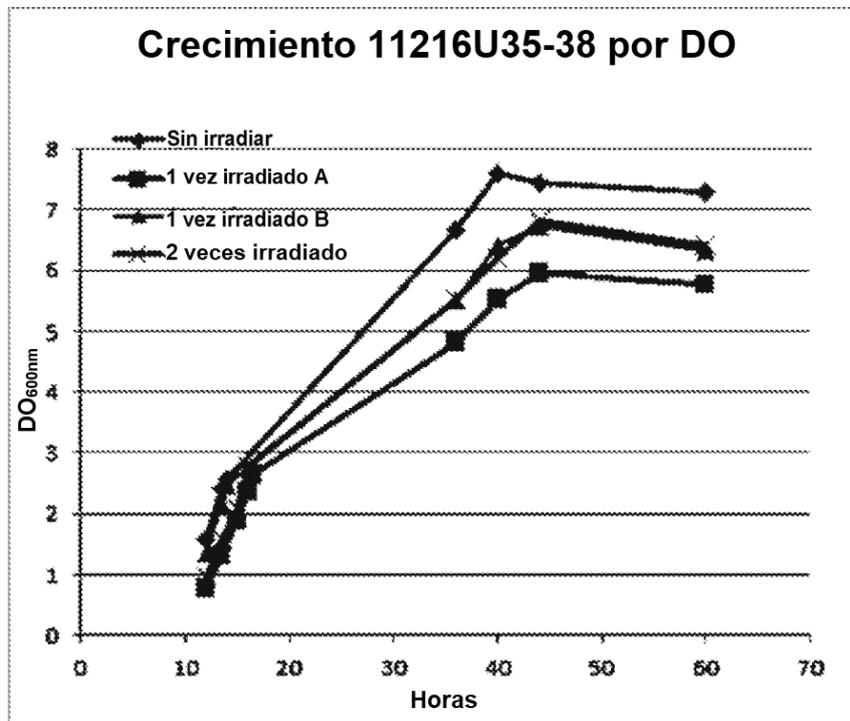


Figura 7

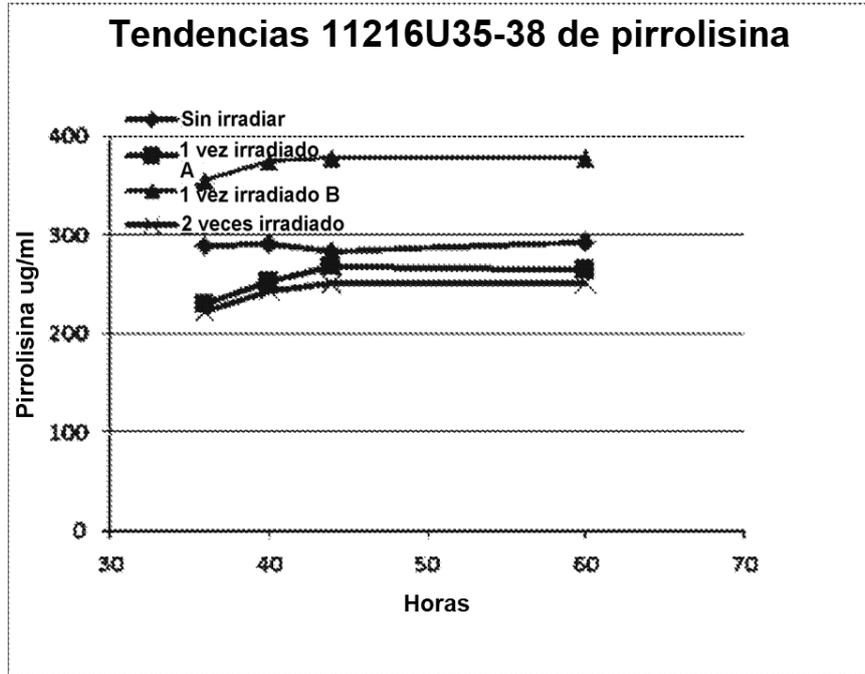


Figura 8

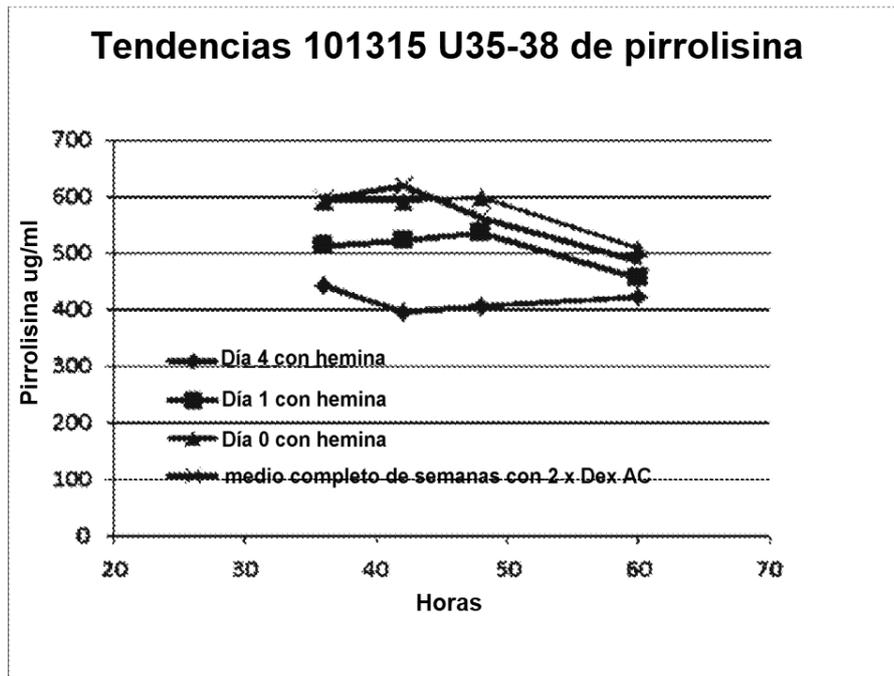


Figura 9

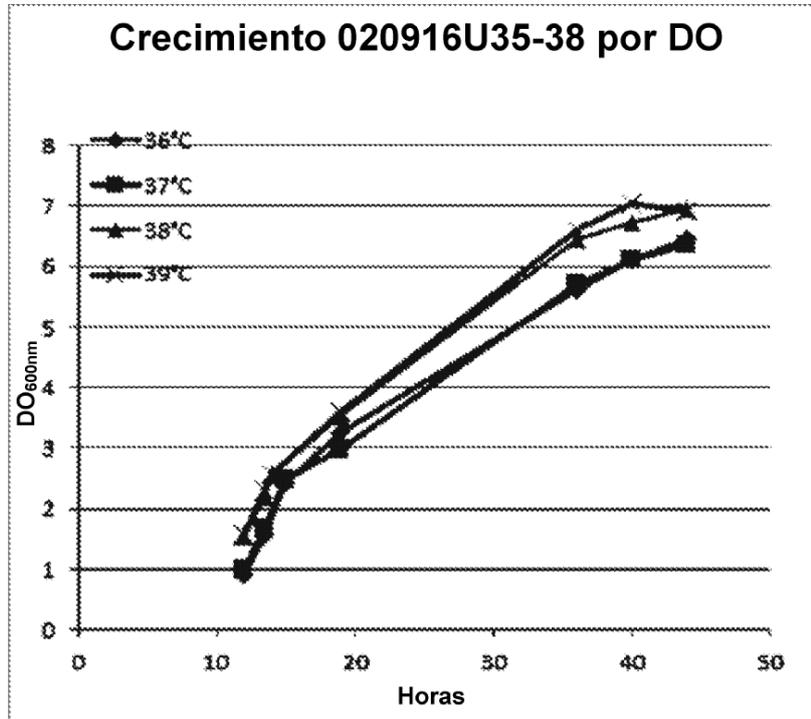


Figura 10

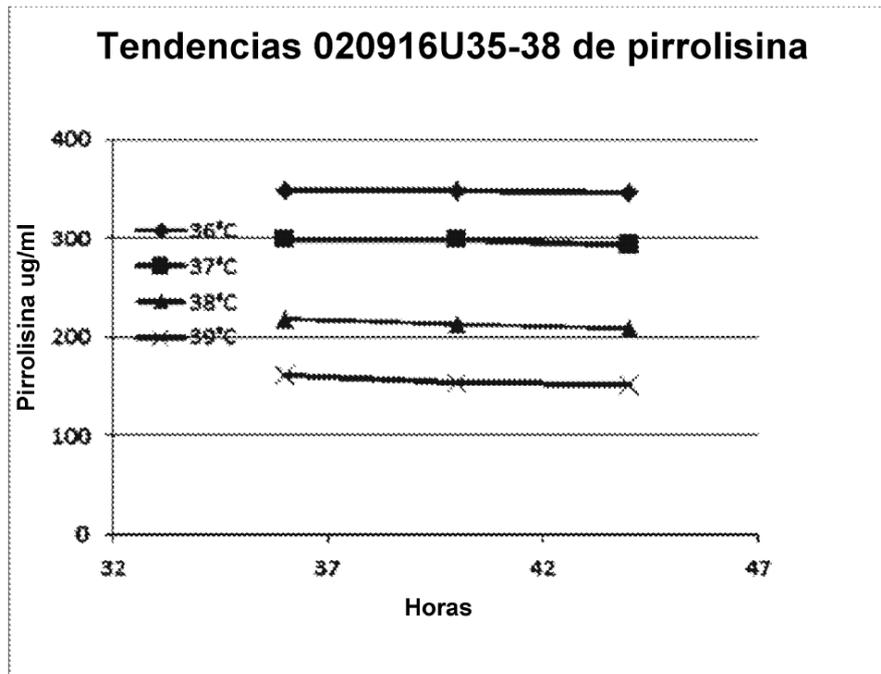


Figura 11

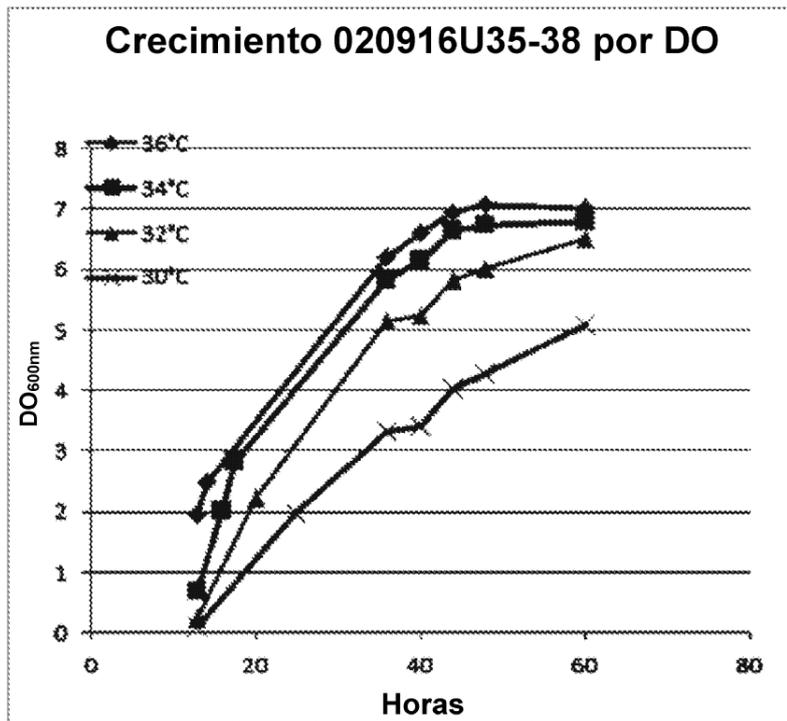


Figura 12

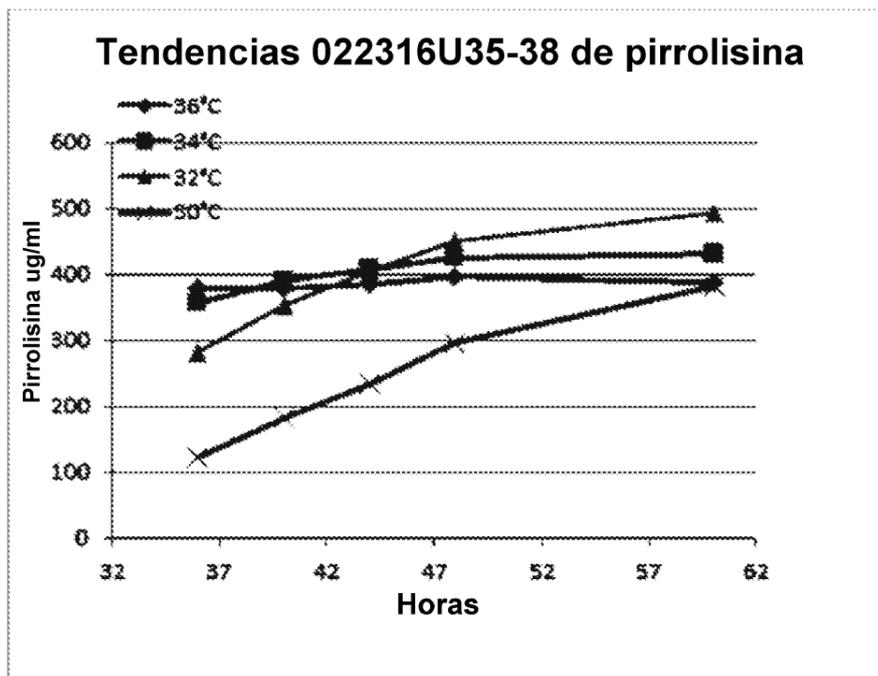


Figura 13

