República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021015973-8 A2

(22) Data do Depósito: 20/02/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/10/2021

(54) Título: PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

(51) Int. Cl.: C12N 1/20; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 22/02/2019 EP 19158847.4.

(71) Depositante(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A..

(72) Inventor(es): PHILIPPE DEHOTTAY; ROMAIN KOCKS; QUENTIN ZUNE.

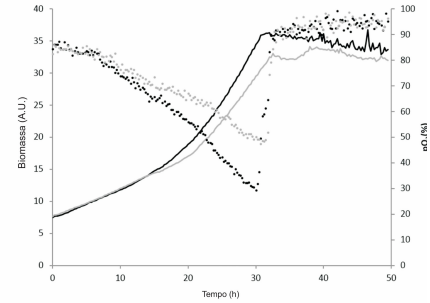
(86) Pedido PCT: PCT EP2020054426 de 20/02/2020

(87) Publicação PCT: WO 2020/169703 de 27/08/2020

(85) Data da Fase Nacional: 12/08/2021

(57) Resumo: PROCESSO DE FERMENTAÇÃO. A presente invenção refere-se a processos para a fermentação e produção do fator de virulência de Bordetella, especialmente produção de PT, para fabricação em grande escala. Mais particularmente, a invenção refere-se a processos incluindo uma etapa de condicionamento do meio realizada antes da inoculação.

FIG. 1



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO DE FERMENTAÇÃO".**

ANTECEDENTES

[001] O gênero *Bordetella* é o agente causador de várias doenças bacterianas, por exemplo, *Bordetella* pertussis (também conhecida como *Haemophilus pertussis*) é responsável pela coqueluche, uma doença respiratória que pode ser grave em bebês e crianças pequenas. O curso clínico da doença é caracterizado por paroxismos de tosses rápidas seguidas de esforço inspiratório, muitas vezes associado a um som de "grito" característico. Em casos graves, a privação de oxigênio pode levar a danos cerebrais; no entanto, a complicação mais comum é a pneumonia secundária.

[002] A coqueluche é geralmente considerada de ser provocada por *B. pertussis*, mas ocasionalmente *B. parapertussis* é isolada de pacientes com sinais e sintomas típicos de coqueluche. A infecção por *B. parapertussis* é de menor frequência do que a *B. pertussis* com 5 a 10% da coqueluche sendo associada a *B. parapertussis* (Mertsola (1985) Eur J Clin Microbiol 4: 123; Lautrop (1971) Lancet 1(7711): 1195-1198). A *B. parapertussis* está associada com os sintomas clínicos leves que, combinados com sua reatividade sorológica cruzada com *B. pertussis*, tornam a *B. parapertussis* difícil de diagnosticar.

[003] A primeira geração de vacinas contra *B. pertussis* eram vacinas de células inteiras, compostas de bactérias inteiras mortas. Estas foram introduzidas em muitos países nas décadas de 1950 e 1960 e tiveram sucesso na redução da incidência de coqueluche. Um problema com as vacinas de células inteiras contra *B. pertussis* é o alto nível de reatogenicidade associado a elas. As vacinas acelulares contendo proteínas purificadas de *B. pertussis* são menos reatogênicas e têm sido adotadas para os programas de vacinação de muitos países. Vacinas acelulares contendo toxina pertussis (PT), hemaglutinina fila-

mentosa (FHA) e com bastante frequência pertactina (PRN), são amplamente utilizadas e fornecem proteção eficaz contra a gravidade da coqueluche.

[004] Fatores de virulência de *Bordetella* para uso em tais vacinas são gerados através de fermentação de *Bordetella* e isolamento dos fatores de virulência produzidos, no entanto, espécies de *Bordetella* são organismos exigentes que são difíceis de crescer em altas concentrações (Doern, Clin. Infect. Dis. 2000, 30: 166-173), além disso, é difícil expressar fatores de virulência de *Bordetella*, em particular a toxina pertussis (PT), que é o antígeno limitativo em vacinas multivalentes da coqueluche.

[005] Permanece uma necessidade na técnica de melhorar a eficiência da fermentação de *Bordetella* e da produção do fator de virulência, especialmente a produção de PT, para fabricação em grande escala. Os presentes inventores descobriram surpreendentemente que uma etapa de condicionamento médio realizada antes da inoculação melhora significativamente várias medidas do desempenho da fermentação de *Bordetella* em grande escala, incluindo aumento do rendimento de PT, aumento da biomassa e diminuição do tempo de fermentação.

SUMARIO DA INVENÇÃO

[006] Em um primeiro aspecto da invenção, é fornecido um processo para a produção de um meio de crescimento condicionado que compreende:

a) fornecer um meio de crescimento;

b) manter o meio de crescimento em uma temperatura entre cerca de 28 ºC e cerca de 35 ºC durante cerca de 20 a 35 horas; e

c) opcionalmente agitar e/ou arejar o meio de crescimento para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1},

fornecendo assim o meio de crescimento condicionado.

[007] Mais particularmente, o primeiro aspecto da invenção fornece um processo para a produção de um meio de crescimento condicionado estéril compreendendo:

a) fornecer um meio de crescimento estéril;

b) manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura entre cerca de 28 ºC e cerca de 35 ºC durante cerca de 20 a 35 horas; e

c) agitar e/ou arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1},

fornecendo assim o meio de crescimento condicionado estéril.

[008] Em um segundo aspecto da invenção, é fornecido um meio de crescimento condicionado produzido por um processo que compreende:

a) fornecer um meio de crescimento;

b) manter o meio de crescimento em uma temperatura entre cerca de 28 ºC e cerca de 35 ºC durante cerca de 20 a 35 horas; e

c) opcionalmente, agitar e/ou arejar o meio de crescimento para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1}.

[009] Mais particularmente, o segundo aspecto da invenção fornece um meio de crescimento condicionado estéril produzido por um processo que compreende:

a) fornecer um meio de crescimento estéril;

b) manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura entre cerca de 28 ºC e cerca de 35 ºC durante cerca de 20 a 35 horas; e

c) agitar e/ou arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigê-

nio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1}.

[0010] Em um terceiro aspecto da invenção, é fornecido um processo para o cultivo de uma espécie de *Bordetella* que compreende:

a) inocular um meio de crescimento condicionado do segundo aspecto com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*; e

b) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam o aumento da biomassa e/ou da produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*.

[0011] Em um quarto aspecto da invenção, é fornecido um processo para a produção de uma proteína de *Bordetella* que compreende:

a) inocular um meio de crescimento condicionado do segundo aspecto com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*;

b) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e

c) isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

[0012] Em um quinto aspecto da invenção, é fornecida uma proteína *Bordetella* isolada produzida por um processo que compreende:

a) inocular um meio de crescimento condicionado do segundo aspecto com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*;

b) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e

c) isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

[0013] Em um sexto aspecto da invenção, é fornecida uma composição imunogênica compreendendo uma proteína de *Bordetella* isolada produzida por um processo que compreende:

a) inocular um meio de crescimento condicionado do segundo aspecto com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*;

b) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e

c) isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0014] FIG. 1: Alterações na biomassa (linhas sólidas) e consumo de oxigênio (pontos), durante a fermentação da *Bordetella* em meio condicionado (preto) e meio não condicionado (cinza).

[0015] FIG.2: Gráficos de superfície para projeto de experimento que avalia o efeito dos parâmetros do processo de condicionamento em quatro medidas de desempenho da fermentação de *Bordetella*: (A) teor de PT; (B) teor de FHA; (C) Biomassa; e (D) Tempo de fermentação. Os resultados preveem que os parâmetros ideais de condicionamento para o rendimento de PT e a produção de biomassa são 34,6 h de condicionamento em uma temperatura de 31,2 ºC e kLa em torno de 90 h^{-1}.

[0016] FIG. 3: Validação dos parâmetros de condicionamento na escala de biorreator de 1 L. Painel direito: As fermentações de *Bordetella* realizadas em meio condicionado (Processos 2, 3 e 4; ver Exemplo 3 para detalhes) produziram um teor de PT que era mais de 10% maior do que as fermentações realizadas em meio não condicionado. Painel esquerdo: o teor de biomassa não foi significativamente afetado pela temperatura ou kLa na escala de biorreator de 1 L.

[0017] FIG. 4: Efeito da duração do condicionamento no teor de PT e biomassa na escala de biorreator de 1 L. Painel superior: O condicionamento médio durante 32 h e 56 h resultou no aumento ≥ 10% no teor de PT durante a fermentação em comparação com o meio não

condicionado. Painel inferior: A biomassa foi aumentada em 32 h e 56 h.

[0018] FIG. 5: Validação de parâmetros de condicionamento ideais na escala de biorreator de 20 L. A fermentação realizada em meio condicionado com parâmetros de processo ideais (31 ^{o}C; 32 h; kLa 90 h^{-1}) produziu pelo menos 10% de aumento no rendimento de PT quando comparado com o meio não condicionado (NC) ou parâmetros de condicionamento abaixo do ideal.

[0019] FIG. 6: Curvas de crescimento médio com barras de erro (desvio padrão) após a fermentação em recipientes de pequena escala (< 1 L) utilizando meio condicionado no tanque de fermentação de 800 L ou no tanque de preparação do meio.

[0020] FIG. 7: Curvas de crescimento médio com barras de erro (desvio padrão) após a fermentação em recipientes de pequena escala (< 1 L) utilizando (A) meio condicionado durante 32 horas no tanque de fermentação de 800 L versus meio não condicionado ou (B) meio condicionado durante 32 horas no tanque de preparação do meio versus meio não condicionado.

[0021] FIG. 8: Curvas de crescimento médio com barras de erro (desvio padrão) após a fermentação em recipientes pequena escala (< 1 L) utilizando meio condicionado no tanque de preparação do meio durante 20 ou 32 horas.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0022] A presente invenção baseia-se na observação inesperada de que a adição de uma etapa de condicionamento do meio antes da inoculação melhora significativamente várias medidas do desempenho da fermentação de *Bordetella*, incluindo aumento do rendimento de proteínas de *Bordetella*, aumento da biomassa e diminuição do tempo de fermentação. Particularmente, a etapa ou processo é executado utilizando meio de crescimento estéril. Mais particularmente, a etapa

ou processo é um processo asséptico. Ainda mais particularmente, a etapa ou processo é um processo asséptico executado utilizando meio de crescimento estéril. Conforme utilizado nesta invenção, o termo "processo asséptico" refere-se a processos e condições que evitam a contaminação através da exclusão de micro-organismos.

[0023] Como aqui utilizado, o termo "condicionamento" refere-se a um processo pelo qual o meio de crescimento estéril é tratado antes da inoculação com bactérias, em outras palavras, o condicionamento é executado na ausência de bactérias e o meio de cultura é estéril. O condicionamento é um processo que geralmente compreende uma fase de aeração e/ou agitação do meio de crescimento estéril para melhorar o desempenho das etapas de fermentação subsequentes. Particularmente, o meio de crescimento estéril permanece estéril durante o processo de condicionamento. Assim, de preferência, os processos para a produção de um meio de crescimento condicionado da invenção são processos assépticos. De preferência, os processos da invenção são processos assépticos que produzem um meio de crescimento condicionado estéril.

[0024] Assim, um aspecto da invenção é um processo para a produção de um meio de crescimento condicionado que compreende: fornecer um meio de crescimento; manter o meio de crescimento em uma temperatura entre cerca de 28 ^{o}C e cerca de 35 ^{o}C durante cerca de 20 a 35 horas; e opcionalmente agitar e/ou arejar o meio de crescimento para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1}, fornecendo assim o meio de crescimento condicionado. Mais particularmente, a invenção é um processo, particularmente um processo asséptico, para a produção de um meio de crescimento condicionado compreendendo: fornecer um meio de crescimento estéril; manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura entre cerca de 28 ^{o}C e cerca de 35 ^{o}C

durante cerca de 20 a 35 horas; e opcionalmente agitar e/ou arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1}, fornecendo assim o meio de crescimento condicionado. O meio de crescimento condicionado, produzido pelo processo a partir do meio de crescimento estéril, é ele próprio estéril, isto é, livre de organismos vivos que se replicam independentemente.

[0025] Um meio de crescimento pode ser qualquer meio capaz de sustentar o crescimento de células de *Bordetella*. Em certas modalidades, o meio de crescimento é o meio Stainer Scholte (SS) quimicamente definido ou um meio Stainer Scholte modificado (MSS). A composição do meio Stainer Scholte é descrita em Cohen and Wheeler, American Journal of Public Health (1946) 36: 371-376. Um meio é um meio Stainer Scholte modificado se contiver essencialmente os mesmos componentes do meio tal como o meio SS, essencialmente nas mesmas concentrações, no entanto, contendo modificação da concentração entre 1 e 5 dos componentes do meio, faltando entre 1 e 3 dos componentes do meio, ou contendo entre 1 e 20 componentes adicionais do meio.

[0026] Em uma modalidade específica, o meio de Stainer and Scholte modificado compreende dimetil-β-ciclodextrina (por exemplo, ao redor de 1 g/L) e hidrolisado de caseína ácida (por exemplo, ao redor de 10 g/L). Nas modalidades adicionais, o meio de Stainer and Scholte modificado compreende L-cisteína (por exemplo, ao redor de 40 mg/L) em vez de L-cistina; concentração aumentada de Na-L-Glutamato (por exemplo, ao redor de 11,84 g/L); concentração reduzida de glutationa (por exemplo, ao redor de 150 mg/L); e/ou concentração reduzida de ácido ascórbico (por exemplo, ao redor de 400 mg/L). Assim, em algumas modalidades, o meio de crescimento é meio Stainer Scholte modificado (MSS). Em algumas modalidades, o meio de

crescimento é meio de Stainer and Scholte modificado compreendendo ao redor de 1g/L de dimetil-β-ciclodextrina e ao redor de 10 g/L de hidrolisado de caseína ácida. Em algumas modalidades, o meio de crescimento é meio de Stainer and Scholte modificado compreendendo ao redor de 40 mg/L de L-cisteína no lugar de L-cistina, ao redor de 11,84 g/L de Na-L-Glutamato, ao redor de 150 mg/L de glutationa e/ou ao redor de 400 mg/L de ácido ascórbico (por exemplo, ao redor de 400 mg/L).

[0027] Os compostos que influenciam a produção de fatores de virulência de *Bordetella* pertussis frequentemente atuam através da modulação do lócus genético bvg (genes de virulência de bordetella) e, portanto, podem ser chamados de moduladores de bvg (ver, por exemplo, a EP2809343B). Assim, em algumas modalidades, o meio de crescimento pode compreender pelo menos um modulador de bvg selecionado do grupo que consiste em niacina, um sal de magnésio, um sal de sulfato, um sal de fosfato, um sal de carbonato, sacarose, prolina, íons de sódio em uma concentração maior do que 100 mM, um agente antiespumante, glutationa e um aminoácido contendo enxofre. Em certas modalidades, o modulador bvg é a niacina. Em algumas modalidades, o meio de crescimento é meio Stainer Scholte modificado que compreende niacina.

Parâmetros do processo de condicionamento: temperatura, duração e kLa

[0028] Em um aspecto da invenção, o condicionamento é executado mantendo um meio de crescimento estéril em uma temperatura definida durante um período de tempo definido antes de utilizar na fermentação. Em uma modalidade, o meio de crescimento estéril é mantido em uma temperatura entre cerca de 28 °C e cerca de 35 °C. Em outra modalidade, o meio de crescimento estéril é mantido em uma temperatura entre cerca de 29 °C e cerca de 33 °C, ou entre cer-

ca de 30 ºC e cerca de 32 ºC. Nas modalidades específicas, o meio de crescimento estéril é mantido ao redor de 29, 30, 31, 32 ou 33 ºC. Nas modalidades adicionais, o meio de crescimento estéril é mantido ao redor de 30,0, 30,2, 30,4, 30,6, 30,8, 31,0, 31,2, 31,4, 31,6, 31,8 ou 32,0 ºC.

[0029] Em certas modalidades, o meio de crescimento estéril é mantido na temperatura desejada durante cerca de 20 a 35 horas. Em outra modalidade, o meio de crescimento estéril é mantido na temperatura desejada durante cerca de 25 a 35 horas ou cerca de 30 a 35 horas. Nas modalidades específicas, o meio de crescimento estéril é mantido na temperatura desejada, por exemplo, ao redor de 31 ºC, durante cerca de 29, 30, 31, 32, 33, 34 ou 35 horas. Em uma modalidade preferida, o meio de crescimento estéril é mantido ao redor de 31 ºC durante cerca de 32 horas.

[0030] Em certas modalidades, o condicionamento do meio de crescimento é realizado em uma escala de pelo menos 10 L, pelo menos 100 L, pelo menos 800 ou pelo menos 1000 L de meio de crescimento. Nas modalidades particulares, o condicionamento do meio de crescimento é realizado em uma escala ao redor de 10 a 100 L, ao redor de 100 a 500 L, ao redor de 500 a 1000 L, ao redor de 1000 a 1500 L, ao redor de 1500 a 2000 L, ao redor de 1000 L a 2500 L ou ao redor de 1500 L a 2500 L.

[0031] Em algumas modalidades, o processo da presente invenção requer a manutenção do meio de crescimento estéril em um kLa constante ao longo do processo de condicionamento. kLa, o coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio, é uma medida da taxa na qual o oxigênio entra no meio. Quanto mais elevado o kLa, tanto maior a taxa na qual o oxigênio é introduzido no meio. Vários fatores, incluindo o volume e a composição do meio, agitação (por exemplo, movimento), aeração, pressão e temperatura, irão influenciar

o kLa de uma preparação de meio de crescimento particular.

[0032] O oxigênio pode ser introduzido no meio de crescimento estéril por agitação (por exemplo, movimento) e/ou aeração (borbulhar ar comprimido através da cultura). Onde diferentes concentrações de oxigênio estão presentes no ar introduzido no meio, a taxa de vazão deve ser adaptada para levar isso em consideração. Por exemplo, onde um suprimento de 100% de oxigênio é introduzido no meio, a taxa de vazão seria correspondentemente mais baixa. Onde gás contendo menos oxigênio do que ar é introduzido no meio, uma taxa de vazão mais elevada pode ser aplicada. Onde a aeração é obtida através do borbulhamento de ar comprimido através da cultura, particularmente o ar comprimido é filtrado estéril através de um filtro, mais particularmente um filtro tendo poros pequenos o suficiente para evitar que microorganismos ou esporos entrem no recipiente (por exemplo, biorreator, fermentador ou tanque de preparação do meio) com o ar, de preferência um filtro com um corte na faixa de cerca de 0,2 µm a cerca de 0,45 µm.

[0033] O kLa pode ser medido utilizando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 1 da US2008/0193475. O método envolve configurar o biorreator com as condições de volume, temperatura, pressão, agitação e aeração médios para as quais o kLa deve ser medido, gaseificação pela substituição do ar por nitrogênio gasoso, gaseificação pela restauração da aeração do ar e medição da taxa em que o pO_2 retorna ao seu nível em estado estacionário.

[0034] O kLa é calculado traçando em gráfico o log (100- pO_2%) em relação ao tempo. O coeficiente angular da parte linear do gráfico corresponde a -kLa. Tipicamente, apenas dados entre 20% e 80% pO_2 são considerados.

[0035] O kLa de uma etapa ou processo de condicionamento do

meio é influenciado por vários fatores, incluindo a velocidade de agitação e a taxa de vazão de aeração do meio. Um kLa constante pode ser mantido enquanto, por exemplo, diminui a velocidade de agitação do meio e aumenta a taxa de aeração, ou vice-versa. Em uma modalidade, a velocidade de agitação e a taxa de aeração do meio de crescimento são constantes durante o condicionamento do meio. Em uma modalidade, o meio de crescimento é agitado continuamente ao longo da duração do condicionamento. Em outra modalidade, o meio de crescimento é aerado continuamente ao longo da duração do condicionamento. Em outra modalidade, tanto a agitação quanto a aeração ocorrem continuamente ao longo da duração do condicionamento.

[0036] O condicionamento do meio de crescimento é realizado, por exemplo, em um kLa entre cerca de 10 a 200 h^{-1}, 10 a 150 h^{-1}, 10 a 100 h^{-1}, 10 a 80 h^{-1}, 10 a 50 h^{-1}, 10 a 40 h^{-1}, 10 a 30 h^{-1}, 20 a 150 h^{-1}, 20 a 100 h^{-1}, 20 a 50 h^{-1}, 20 a 60 h^{-1}, 20 a 80 h^{-1}, 20 a 30 h^{-1}, 20 a 40 h^{-1}, 30 a 60 h^{-1}, 60 a 80 h^{-1}, 60 a 150 h^{-1} ou 60 a 200 h^{-1}. Nas modalidades particulares, o condicionamento do meio de crescimento é realizado em um kLa de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1}, cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}. Em uma modalidade preferida, o kLa do meio de crescimento é mantido ao redor de 90 h^{-1}.

[0037] Para um volume de 10 a 30 litros, um kLa de 10 a 30 h^{-1} é alcançado, por exemplo, utilizando um fluxo de ar ou taxa de aeração de 1 a 5 litros/min e uma velocidade de agitação de 200 a 400 rpm (rotações por minuto), por exemplo, uma taxa de aeração de 2 a 4 litros/min e uma velocidade de agitação de 250 a 350 rpm.

[0038] Para um volume de 30 a 250 litros, um kLa de 30 a 60 h^{-1} é alcançado, por exemplo, utilizando uma taxa de vazão de ar de 15 a 25 litros/min e uma velocidade de agitação de 150 a 250 rpm, por exemplo, utilizando uma taxa de fluxo de ar de 20 a 25 litros/min e uma velocidade de agitação de 200 a 250 rpm, por exemplo, utilizando

uma taxa de fluxo de ar de 15 a 20 litros/min e uma velocidade de agitação de 200 a 250 rpm.

[0039] Em uma modalidade específica, o condicionamento do meio de crescimento é realizado ao redor de 31 graus C, durante cerca de 32 h, em um kLa de cerca de 90 h^{-1}.

[0040] A invenção fornece ainda um meio de crescimento condicionado produzido pelo processo da invenção. O meio de crescimento condicionado é estéril. Por "estéril" pretende-se significar que o meio de crescimento está livre, ou essencialmente livre, de células bacterianas, por exemplo, antes da inoculação com células de *Bordetella*.

[0041] Assim, em um aspecto, a invenção fornece um meio de crescimento condicionado produzido por um processo, particularmente um processo asséptico, compreendendo:

a) fornecer um meio de crescimento estéril;

b) manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura entre cerca de 28 ºC e cerca de 35 ºC durante cerca de 20 a 35 horas; e

c) agitar e/ou arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1}.

[0042] Particularmente, na etapa c), o meio de crescimento estéril é agitado e/ou aerado continuamente durante a etapa b). Em algumas modalidades, na etapa c), o meio de crescimento estéril é agitado continuamente durante a etapa b). Em outras modalidades, na etapa c), o meio de crescimento estéril é aerado continuamente durante a etapa b). Em algumas modalidades, na etapa c), o meio de crescimento estéril é agitado e aerado continuamente durante a etapa b).

Processo de fermentação da Bordetella

[0043] Em um aspecto, a invenção fornece um processo para o cultivo de uma espécie de *Bordetella* compreendendo: inocular um

meio de crescimento condicionado produzido como descrito nesta invenção, com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*; e manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam o aumento da biomassa e/ou a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*. Particularmente, o meio de crescimento condicionado é estéril antes da inoculação com a pelo menos uma célula de *Bordetella*.

[0044] Em outro aspecto da invenção, é fornecido um processo para a produção de uma proteína de *Bordetella* que compreende:

a) inocular um meio de crescimento condicionado produzido conforme descrito nesta invenção com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*;

b) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e

c) isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

[0045] De preferência, o processo de produção de uma proteína de *Bordetella* compreende:

a) inocular um meio de crescimento condicionado estéril produzido como descrito nesta invenção com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*;

b) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e

c) isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

[0046] Em um outro aspecto da invenção, é fornecida uma proteína de *Bordetella* isolada produzida por um processo que compreende:

a) inocular um meio de crescimento condicionado produzido conforme descrito nesta invenção com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*;

b) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e

c) isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

[0047] De preferência, a proteína de *Bordetella* isolada é produzida por um processo que compreende:

a) inocular um meio de crescimento condicionado estéril produzido como aqui descrito com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*;

b) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e

c) isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

[0048] Em algumas modalidades, a espécie *Bordetella* é *Bordetella pertussis* ou *Bordetella parapertussis*. Em uma modalidade, a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é selecionada do grupo que consiste em toxina pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN; também conhecida como 69K) e adenilato ciclase (AC). Em uma modalidade preferida, a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é a toxina pertussis, por exemplo, uma toxina pertussis geneticamente desintoxicada (PTg). Em algumas modalidades, a toxina pertussis é uma toxina pertussis geneticamente desintoxicada na qual dois resíduos catalíticos da subunidade S1 (Arg9 e Glu129) são submetidos a mutação para Lys9 e Gly129 (referidos como o mutante PT-9K/129G).

[0049] A biomassa pode ser quantificada mediante a determinação da densidade óptica (OD), por exemplo, em 650 nm (também referida como OD650). Em uma modalidade, a densidade das bactérias atinge pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60 ou pelo menos 70 unidades OD medidas em 650 nm no final da fermentação. A densidade óptica

também pode ser expressa em unidades de absorção (A.U.). O final da fermentação é definido como o momento na cultura em que o oxigênio dissolvido (pO_2) atinge o mínimo e começa a ascender.

[0050] Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição imunogênica compreendendo uma proteína de *Bordetella* isolada produzida por um processo da invenção. As composições imunogênicas da invenção podem compreender ainda um ou mais excipientes, adjuvantes e/ou antígenos adicionais farmaceuticamente aceitáveis.

[0051] O meio de crescimento condicionado preparado de acordo com os processos da invenção fornece certas vantagens na fermentação de culturas de *Bordetella*. Por exemplo, os processos da invenção podem resultar em pelo menos uma proteína de *Bordetella* sendo produzida com um rendimento que é pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25% ou 30% maior do que o rendimento produzido a partir do mesmo processo realizado com meio de crescimento não condicionado. Em uma modalidade específica, o rendimento de PT é aumentado em pelo menos 10%, e o rendimento de hemaglutinina filamentosa é inalterado ou maior do que o rendimento produzido a partir do mesmo processo realizado com meio de crescimento não condicionado. O meio de crescimento não condicionado utilizado para comparação é o meio de crescimento que não foi submetido a tratamento ou condicionamento de acordo com o processo da invenção, por exemplo, meio de crescimento recentemente preparado. Uma pessoa versada na técnica irá observar que o meio de crescimento condicionado e não condicionado utilizado para comparação será do mesmo tipo, isto é, permitindo uma comparação igual para igual.

[0052] Em outra modalidade, o tempo de fermentação, definido como o tempo a partir da inoculação até o ponto em que o nível de pO_2 atinge um mínimo e começa a ascender, é pelo menos 10% mais curto que o tempo de fermentação para o mesmo processo realizado

com o meio de crescimento não condicionado.

[0053] Em outra modalidade, o processo de fermentação de *Bordetella* da invenção produz uma biomassa no final da fermentação que é pelo menos 10% maior do que a biomassa produzida pelo mesmo processo realizado com o meio de crescimento não condicionado.

[0054] Em outra modalidade, o processo de fermentação de *Bordetella* da invenção compreende ainda a etapa de purificação de uma ou mais proteínas de *Bordetella* da cultura de *Bordetella*.

[0055] Em uma modalidade específica, a invenção fornece um processo asséptico para a produção de um meio de crescimento condicionado compreendendo: fornecer um meio de crescimento Stainer and Scholte modificado estéril; manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura entre cerca de 30 a 32 ºC durante cerca de 31 a 33 horas; e agitar e/ou arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) ao redor de 90 h^{-1}, fornecendo assim o meio de crescimento condicionado. Mais particularmente, um processo asséptico para a produção de um meio de crescimento condicionado que compreende: fornecer um meio de crescimento Stainer and Scholte modificado estéril; manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura entre cerca de 30 a 32 ºC durante cerca de 31 a 33 horas; e agitar e arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) ao redor de 90 h^{-1}, fornecendo assim o meio de crescimento condicionado.

[0056] Em uma modalidade específica, a invenção fornece um processo asséptico para a produção de um meio de crescimento condicionado que compreende: fornecer um meio de crescimento Stainer and Scholte modificado estéril compreendendo ao redor de 1 g/L de dimetil-β-ciclodextrina, ao redor de 10 g/L de hidrolisado de caseína ácida, ao redor de 40 mg/L de L-cisteína em vez de L-cistina, ao redor

de 11,84 g/L de Na-L-Glutamato; ao redor de 150 mg/L de glutationa e ao redor de 400 mg/L de ácido ascórbico; manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura ao redor de 31 ºC durante cerca de 32 horas; e agitar e/ou arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) ao redor de 90 h^{-1}, fornecendo assim o meio de crescimento condicionado. Mais particularmente, um processo asséptico para a produção de um meio de crescimento condicionado compreendendo: fornecer um meio de crescimento Stainer and Scholte modificado estéril compreendendo ao redor de 1 g/L de dimetil-β-ciclodextrina, ao redor de 10 g/L de hidrolisado de caseína ácida, ao redor de 40 mg/L de L-cisteína em vez de L-cistina, ao redor de 11,84 g/L de Na-L-Glutamato; ao redor de 150 mg/L de glutationa e ao redor de 400 mg/L de ácido ascórbico; manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura ao redor de 31 ºC durante cerca de 32 horas; e agitar e arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) ao redor de 90 h^{-1}, fornecendo assim o meio de crescimento condicionado.

Modalidades Particulares

[0057] Modalidade 1. Um processo para a produção de um meio de crescimento condicionado compreendendo: (i) fornecer um meio de crescimento; (ii) manter o meio de crescimento em uma temperatura entre cerca de 28 e cerca de 35 ºC durante cerca de 20 a 35 horas; e (iii) opcionalmente agitar e/ou arejar o meio de crescimento para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1}, fornecendo assim o meio de crescimento condicionado.

[0058] Modalidade 2. O processo da modalidade 1, em que a etapa b) é realizada em uma temperatura entre cerca de 29 ºC e cerca de 33 ºC, cerca de 30 ºC e cerca de 32 ºC ou ao redor de 31 ºC.

[0059] Modalidade 3. O processo das modalidades 1 a 2, em que a etapa b) é realizada durante cerca de 25 a 35 horas, cerca de 30 a 35 horas ou cerca de 32 horas.

[0060] Modalidade 4. O processo das modalidades de 1 a 3, em que a etapa c) compreende a agitar meio de crescimento continuamente em toda a duração da etapa b).

[0061] Modalidade 5. O processo da modalidade 4, em que a agitação está a uma velocidade de agitação que produz um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}.

[0062] Modalidade 6. O processo das modalidades de 1 a 5, em que a etapa c) compreende arejar o meio de crescimento continuamente em toda a duração da etapa b).

[0063] Modalidade 7. O processo da modalidade 6, em que o arejamento é a uma taxa de vazão que produz um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}.

[0064] Modalidade 8. O processo das modalidades 1 a 7, em que a etapa c) compreende agitar e arejar o meio de crescimento continuamente em toda a duração da etapa b).

[0065] Modalidade 9. O processo da modalidade 8, em que a agitação e aeração estão em uma velocidade de agitação e taxa de vazão que produzem um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}.

[0066] Modalidade 10. O processo das modalidades de 1 a 9, em que o processo é realizado em uma escala de pelo menos 10 L, pelo menos 100 L ou pelo menos 1000 L de meio de crescimento.

[0067] Modalidade 11. Um meio de crescimento condicionado produzido pelo processo das modalidades de 1 a 10.

[0068] Modalidade 12. Um processo para o cultivo de uma espécie de *Bordetella* compreendendo: (i) inocular o meio de crescimento condicionado da modalidade 11 com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*; e (ii) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam o aumento da biomassa e/ou a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*.

[0069] Modalidade 13. Um processo para a produção de uma proteína de *Bordetella* compreendendo: (i) inocular o meio de crescimento condicionado da modalidade 11 com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*; (ii) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e (iii) isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

[0070] Modalidade 14. O processo das modalidades 12 a 13, em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é selecionada do grupo que consiste em toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina e adenilato ciclase.

[0071] Modalidade 15. O processo das modalidades de 12 a 14, em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é produzida com um rendimento que é pelo menos 10% mais elevado do que o rendimento produzido a partir do mesmo processo realizado com meio de crescimento não condicionado.

[0072] Modalidade 16. O processo das modalidades de 12 a 15, em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é a toxina pertussis, por exemplo, uma toxina pertussis geneticamente desintoxicada.

[0073] Modalidade 17. O processo das modalidades 12 a 16, em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é uma toxina pertussis geneticamente desintoxicada na qual dois resíduos catalíticos da subunidade S1 (Arg9 e Glu129) são submetidos a mutação para Lys9 e Gly129.

[0074] Modalidade 18. O processo da modalidade 16, em que o rendimento de hemaglutinina filamentosa é inalterado ou mais elevado do que o rendimento produzido a partir do mesmo processo realizado com o meio de crescimento não condicionado.

[0075] Modalidade 19. O processo das modalidades de 12 a 18, em que o tempo de fermentação é pelo menos 10% mais curto do que o tempo de fermentação para o mesmo processo realizado com o meio de crescimento não condicionado.

[0076] Modalidade 20. O processo das modalidades de 12 a 19, em que a cultura de *Bordetella* possui uma biomassa no final da fermentação que é pelo menos 10% maior do que a biomassa produzida pelo mesmo processo realizado com o meio de crescimento não condicionado.

[0077] Modalidade 21. O processo das modalidades de 12 a 20, em que o processo ainda compreende a etapa de purificação de uma ou mais proteínas de *Bordetella* da cultura de *Bordetella*.

[0078] Modalidade 22. O processo das modalidades de 1 a 10, em que o meio de crescimento é estéril.

[0079] Modalidade 23. Uma proteína de *Bordetella* isolada produzida pelo processo das modalidades de 12 a 22.

[0080] Modalidade 24. Uma composição imunogênica compreendendo a proteína de *Bordetella* isolada da modalidade 23.

[0081] Modalidade 25. Um processo asséptico para a produção de um meio de crescimento condicionado compreendendo: (i) fornecer um meio de crescimento estéril; (ii) manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura entre cerca de 28 e cerca de 35 ^{o}C durante cerca de 20 a 35 horas; e (iii) agitar e/ou arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1}, fornecendo assim o meio de crescimento condicionado.

[0082] Modalidade 26. O processo asséptico da modalidade 25, em que a etapa b) é realizada em uma temperatura entre cerca de 29 ºC e cerca de 33 ºC, cerca de 30 ºC e cerca de 32 ºC ou ao redor de 31 ºC.

[0083] Modalidade 27. O processo asséptico da modalidade 25 ou 26, em que a etapa b) é realizado durante cerca de 25 a 35 horas, cerca de 30 a 35 horas ou ao redor de 32 horas.

[0084] Modalidade 28. O processo asséptico das modalidades 25, 26 ou 27, em que a etapa c) compreende a agitação do meio de crescimento estéril continuamente em toda a duração da etapa b).

[0085] Modalidade 29. O processo asséptico da modalidade 28, em que a agitação está em uma velocidade de agitação que produz um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}.

[0086] Modalidade 30. O processo asséptico das modalidades de 25 a 29, em que a etapa c) compreende aerar o meio de crescimento estéril continuamente em toda a duração da etapa b).

[0087] Modalidade 31. O processo asséptico da modalidade 30, em que o arejamento está em uma taxa de vazão que produz um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}.

[0088] Modalidade 32. O processo asséptico das modalidades 25 a 31, em que a etapa c) compreende agitar e aerar o meio de crescimento estéril continuamente em toda a duração da etapa b).

[0089] Modalidade 33. O processo asséptico da modalidade 32, em que a agitação e aeração estão em uma velocidade de agitação e taxa de vazão que produzem um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}.

[0090] Modalidade 34. O processo asséptico das modalidades de

25 a 33, em que o processo é realizado em uma escala de pelo menos 10 L, pelo menos 100 L ou pelo menos 1000 L de meio de crescimento estéril.

[0091] Modalidade 35. Um meio de crescimento condicionado produzido pelo processo asséptico das modalidades de 25 a 34.

[0092] Modalidade 36. Um processo para o cultivo de uma espécie de *Bordetella* compreendendo: (i) inocular o meio de crescimento condicionado da modalidade 35 com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*; e (ii) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam o aumento da biomassa e/ou a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*.

[0093] Modalidade 37. Um processo para a produção de uma proteína de *Bordetella* compreendendo: (i) inocular o meio de crescimento condicionado da modalidade 35 com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*; (ii) manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e (iii) isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

[0094] Modalidade 38. O processo da modalidade 36 ou 37, em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é selecionada do grupo que consiste em toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina e adenilato ciclase.

[0095] Modalidade 39. O processo das modalidades 36, 37 ou 38, em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é produzida com um rendimento que é pelo menos 10% mais elevado do que o rendimento produzido a partir do mesmo processo realizado com meio de crescimento não condicionado.

[0096] Modalidade 40. O processo das modalidades de 36 a 39, em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é a toxina pertussis, por exemplo, uma toxina pertussis geneticamente desintoxicada.

[0097] Modalidade 41. O processo das modalidades de 36 a 40, em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é uma toxina pertussis geneticamente desintoxicada na qual dois resíduos catalíticos da subunidade S1 (Arg9 e Glu129) são submetidos a mutação para Lys9 e Gly129.

[0098] Modalidade 42. O processo das modalidades 40 ou 41, em que o rendimento de hemaglutinina filamentosa é inalterado ou mais elevado do que o rendimento produzido a partir do mesmo processo realizado com meio de crescimento não condicionado.

[0099] Modalidade 43. O processo das modalidades de 36 a 42, em que o tempo de fermentação é pelo menos 10% mais curto do que o tempo de fermentação para o mesmo processo realizado com o meio de crescimento não condicionado.

[00100] Modalidade 44. O processo das modalidades de 36 a 43, em que a cultura de *Bordetella* possui uma biomassa no final da fermentação que é pelo menos 10% mais elevada do que a biomassa produzida pelo mesmo processo realizado com o meio de crescimento não condicionado.

[00101] Modalidade 45. O processo das modalidades de 36 a 44, em que o processo ainda compreende a etapa de purificação de uma ou mais proteínas de *Bordetella* da cultura de *Bordetella*.

[00102] Modalidade 46. O processo de acordo com qualquer modalidade precedente em que o meio de crescimento é meio Stainer Scholte modificado (MSS), opcionalmente compreendendo niacina.

[00103] Modalidade 47. O processo da modalidade 46, em que o meio de crescimento é meio de Stainer and Scholte modificado compreendendo cerca de 1 g/L de dimetil-β-ciclodextrina e cerca de 10 g/L de hidrolisado de caseína ácida.

[00104] Modalidade 48. O processo da modalidade 46 ou 47, em que o meio de crescimento é meio de Stainer and Scholte modificado

compreendendo ao redor de 40 mg/L de L-cisteína em vez de L-cistina; ao redor de 11,84 g/L de Na-L-Glutamato; ao redor de 150 mg/L de glutationa; e/ou ao redor de 400 mg/L de ácido ascórbico (por exemplo, ao redor de 400 mg/L).

[00105] Modalidade 49. Um processo asséptico para a produção de um meio de crescimento condicionado estéril compreendendo: (a) fornecer um meio de crescimento estéril; (b) manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura entre cerca de 29 ^{o}C e cerca de 33 ^{o}C, cerca de 30 ^{o}C e cerca de 32 ^{o}C ou ao redor de 31 ^{o}C durante cerca de 25 a 35 horas, cerca de 30 a 35 horas ou ao redor de 32 horas; e (c) agitar e/ou arejar o meio de crescimento estéril continuamente em toda a duração da etapa (b) para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}, fornecendo assim o meio de crescimento condicionado estéril; em que o meio de crescimento é meio Stainer Scholte modificado (MSS), opcionalmente compreendendo niacina.

Geral

[00106] A não ser que de outra maneira mencionada, todos os termos técnicos e científicos utilizados nesta invenção possuem o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual esta invenção pertence. Os termos singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem referentes plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Da mesma forma, a palavra "ou" pretende incluir "e", a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[00107] Adicionalmente, as limitações numéricas dadas em relação às concentrações ou níveis de uma substância, tais como concentrações de componentes da solução ou relações das mesmas, e condições de reação tais como temperaturas, pressões e tempos de ciclo,

se destinam a ser aproximadas. O termo "cerca de" aqui utilizado se destina a significar a quantidade ± 10%. A menos que o contexto exija o contrário, a palavra "entre" quando utilizada na expressão de uma faixa de valores (por exemplo, "entre X e Y" ou "entre cerca de X e cerca de Y") destina-se a incluir os pontos finais da faixa (isto é, incluindo X e Y).

[00108] O termo "compreende" significa "inclui". Assim, a menos que o contexto exija o contrário, a palavra "compreende" e variações tais como "compreende" e "compreendendo" serão entendidas de implicar a inclusão de um composto ou composição declarada (por exemplo, ácido nucleico, polipeptídeo, antígeno) ou etapa, ou grupo de compostos ou etapas, mas não com a exclusão de quaisquer outros compostos, composição, etapas ou grupos dos mesmos. O termo "consistindo em" significa "incluindo e limitado a". O termo "consistindo essencialmente em" significa que a composição ou método pode incluir ingredientes e/ou etapas adicionais, mas apenas se os ingredientes e/ou etapas adicionais não alteram materialmente as características básicas e novas da composição ou método reivindicado. A abreviação, "e.g." é derivada do latim exempli gratia e é aqui utilizada para indicar um exemplo não limitativo. Assim, a abreviação "e.g." é sinônimo do termo "por exemplo".

[00109] A invenção será ainda descrita com referência aos seguintes exemplos e figuras não limitativos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Demonstração do efeito de condicionamento do meio em escala de laboratório

[00110] Observações preliminares indicaram que a variabilidade do rendimento em um processo de fermentação de *Bordetella* em escala comercial pode ser devido a diferenças no condicionamento do meio de crescimento antes da inoculação. Para explorar as fontes desta va-

riabilidade, o efeito do condicionamento do meio de crescimento antes da inoculação foi examinado em um processo de modelo em escala de laboratório.

Modelo em Escala de Laboratório

[00111] Um modelo em escala de laboratório foi desenvolvido para reproduzir as três etapas do processo comercial: 1) um pré-sistema de cultura; 2) condicionamento do meio; e 3) fermentação. A etapa do sistema de pré-cultura se refere às etapas de pré-cultura utilizadas para acumular biomassa suficiente para a inoculação da etapa de fermentação. Uma vez que o condicionamento do meio é uma etapa do processo asséptico que ocorre na ausência de bactérias, o condicionamento do meio é realizado independentemente da etapa do sistema de pré-cultura, por exemplo, antes, depois ou em paralelo. Na pré-cultura, uma primeira pré-cultura de frasco de agitação contendo 30 ml de meio fresco (MSS; derivado do meio de Stainer and Scholte. J. Gen. Microbial. 63:211-220 (1971) pela adição de dimetil-β-ciclodextrina 1 g/L e caseína hidrolisada ácida 10 g/L, a substituição de L-cistina 40 mg/L por L-cisteína 40 mg/L, e o uso de concentrações mais elevadas de Na-L-Glutamato (11,84 g/L), glutationa reduzida (150 mg/L) e ácido ascórbico (400 mg/L)) foi inoculada com 10^9 CFUs de *B. pertussis* e incubada a 35 ºC, agitando em 150 rpm, durante 24 h. A primeira pré-cultura foi utilizada para inocular uma segunda pré-cultura de frasco de agitação contendo 1000 ml de meio fresco (MSS). A segunda pré-cultura foi incubada a 35 ºC, agitando em 150 rpm, durante 24 h. Alíquotas do sistema de pré-cultura foram então utilizadas para inocular o meio de crescimento condicionado para fermentação, conforme descrito abaixo.

[00112] O condicionamento do meio foi realizado em paralelo ao sistema de pré-cultura. 1 L de meio de crescimento estéril (mesmo tipo como utilizado para a pré-cultura) foi transferido assepticamente em

um biorreator de 1 L (plataforma BioBlock (biorreator 4 x 1 L), Eppendorf) e mantido durante 40 horas a 35 ºC, taxa de fluxo de ar de 20 L ar pulverizado por hora, velocidade de agitação de 430 rpm (kLa de 60 h^{-1}). Como um controle, o meio de crescimento não condicionado foi mantido a 4 ºC sem processamento adicional. A preparação de meio condicionado e não condicionado foi realizada quatro vezes (Prep 1, Prep 2, Prep 3, Prep 4) utilizando os mesmos procedimentos.

[00113] A etapa de fermentação foi realizada em pequena escala através da inoculação do meio condicionado e não condicionado com o inóculo de *Bordetella* do sistema de pré-cultura e incubação das culturas sob condições padrão (35 ºC, kLa de pelo menos 90h^{-1}) em recipientes de fermentação de pequena escala (< 1 L).

Medidas de desempenho de fermentação

[00114] A avaliação do desempenho da fermentação, conforme indicado pela biomassa, rendimento PT e tempo de fermentação, foi repetida pelo menos 3 vezes por preparação. Medições em linha de biomassa, pressão de oxigênio dissolvido (pO_2) e pH foram registradas ao longo da fermentação. O início da fermentação foi definido como o momento em que o sistema de pré-cultura de *Bordetella* foi adicionado ao tanque de fermentação. O final da fermentação foi definido como o momento em que o oxigênio dissolvido (pO_2) atinge um mínimo e começa a ascender de volta para 100%. O ponto de inflexão em pO_2 indica exaustão da fonte de carbono na cultura e transição das células da fase de crescimento para a fase estacionária. O tempo de fermentação é, portanto, a quantidade de tempo entre o início e o final da fermentação.

[00115] No final da fermentação, os sobrenadantes foram recuperados por centrifugação (14000 g, 10 min RT), filtrados (malha de filtro de 0,22 um) e armazenados a -20 ºC para posterior análise. Os níveis de toxina pertussis (PT) no final da fermentação foram avaliados por

ELISA utilizando métodos padrão.

Resultados

[00116] Os resultados estão resumidos na Tabela 1 como variação percentual média em relação ao meio não condicionado [condicionado/não condicionado - 1 (%)]. Para todas as quatro repetições (Preps 1 a 4), os níveis de toxina pertussis no final da fermentação aumentaram pelo menos 10% no meio condicionado em comparação com o meio não condicionado. Para três das preparações (Preps 2 a 3), houve um aumento correspondente na biomassa de final de fermentação em meio condicionado versus meio não condicionado. Finalmente, uma tendência para o tempo de fermentação diminuído foi observada quando as culturas foram cultivadas em meio condicionado em comparação com o meio não condicionado.

Tabela 1

	Biomassa	PT (ELISA)	Tempo de Fermentação
Prep 1	- 7,0%	+13,2%	-7,2%
Prep 2	+52,3%	+15,2%	-4,9%
Prep 3	+27,8%	+22,6%	-12,3%
Prep 4	+44,9%	+33,0%	-5,7%

[00117] A cinética de crescimento da Prep 2 é apresentada na FIG. 1 como um exemplo representativo das quatro preparações. O crescimento de células de *Bordetella* (biomassa) em meio condicionado (linha preta sólida) e meio não condicionado (linha cinza sólida) foi semelhante para as primeiras 15 a 20 horas de cultura. Depois disso, a taxa de crescimento celular foi maior em meio condicionado do que em meio não condicionado. O oxigênio dissolvido caiu conforme a biomassa aumentou, com uma diminuição mais rápida observada na fermentação do meio condicionado. No final da fermentação, indicada pelo rápido aumento do oxigênio dissolvido, a biomassa foi significativamente maior na condição de fermentação do meio condicionado em comparação com a condição de fermentação não condicionada.

[00118] Os resultados do estudo inicial em pequena escala indicam que o condicionamento anterior do meio possui um efeito positivo no crescimento das células de *Bordetella* e na produção de PT. Em particular, aumentos significativos na biomassa de final de fermentação e no teor de PT foram observados para fermentações realizadas em meio condicionado. Uma tendência para tempos de fermentação mais curtos em meio condicionado também foi observada. Os resultados do modelo em escala laboratorial confirmam as observações feitas na escala comercial, indicando que o efeito do condicionamento é independente da escala de fermentação. Nenhum efeito significativo do condicionamento do meio foi observado no pH do meio durante o crescimento celular (dados não mostrados).

[00119] Sem estar limitado pela teoria subjacente, o efeito de condicionamento do meio observado pode estar relacionado a modificações bioquímicas, tais como a oxidação de um ou mais componentes do meio, que ocorrem durante o processo de condicionamento do meio, que melhoram o crescimento celular e a produtividade dos fatores de virulência durante a etapa de fermentação.

Exemplo 2: Identificação dos parâmetros de processo que afetam o condicionamento do meio

[00120] Para definir melhor os parâmetros de condicionamento que levam a um melhor desempenho da fermentação de *Bordetella*, um estudo do planejamento experimental (DoE) foi realizado.

Métodos

[00121] O impacto de três parâmetros do processo de condicionamento no desempenho da fermentação subsequente foi avaliado em um projeto de composto central com 3 níveis (min / central / max) por parâmetro conforme mostrado na Tabela 2. Os parâmetros do processo foram temperatura de condicionamento, duração do condicionamento e o coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigê-

nio (kLa), que é um fator de taxa de vazão de aeração e velocidade de agitação.

Tabela 2: Parâmetros do Processo de Condicionamento do Meio

Parâmetro	Min	Central	Max
Temperatura (°C)	28	35	40
kLa (h^{-1})	10	50	90
Duração (horas)	3	23	43

[00122] O DoE foi realizado em 60 operações executadas ao longo de 6 semanas (ver a Tabela 3). Cada semana, 3 x 1 L de biorreatores de condicionamento foram carregados com 1 L de meio de crescimento estéril recentemente preparado como descrito no Exemplo 1 e condicionado a 3 pares diferentes de kLa-temperatura. Durante o condicionamento, cada biorreator de condicionamento foi amostrado em três momentos diferentes (3 h, 23 h e 43 h) para examinar o efeito da duração do condicionamento. Amostras de meio tomadas em 3 e 23 h foram imediatamente armazenadas a 4 °C para estabilizar a amostra. Após a última amostra ser retirada, as 9 amostras de meio dos 3 biorreatores foram transferidas para recipientes de fermentação em pequena escala (< 1 L) e inoculadas com o sistema de pré-cultura de *Bordetella* preparado conforme descrito no Exemplo 1, para avaliação do crescimento e produção de antígeno.

[00123] Os indicadores de desempenho de fermentação foram avaliados através de medição do teor de PT e FHA (ELISA), o teor de biomassa (curva de crescimento e densidade óptica final) e o tempo de fermentação (medido conforme descrito no Exemplo 1).

Resultados

[00124] Os resultados são mostrados na Tabela 3 e FIG 2. Os indicadores de desempenho de fermentação foram influenciados de forma diferente através das mudanças nos parâmetros do processo de condicionamento. Quanto mais longa for a duração do condicionamento médio, tanto melhor será o teor resultante de biomassa e PT. O teor

de FHA não foi afetado pelo aumento da duração do condicionamento. A temperatura de condicionamento afetou a produção de PT, mas não o desempenho de crescimento (biomassa). Finalmente, as variações em kLa impactaram a biomassa, mas não a produção de PT.

[00125] Os resultados do DoE preveem um espaço estrutural para valores de parâmetro de condicionamento associados com PT aumentado (pelo menos 10%) em comparação com meio não condicionado (FIG. 2A-D). O modelo também prevê que os parâmetros ideais de condicionamento para rendimento de PT e produção de biomassa são de 34,6 h de condicionamento em uma temperatura de 31,2 ºC e kLa em torno de $90h^{-1}$.

Tabela 3: Resultados do Planejamento Experimental

		Parâmetros de Condicionamento			**Medidas do Desempenho de Fermentação**			
Operação	**Semana**	**Temperatura (°C)**	**kLa (h^{-1})**	**Duração (h)**	**Tempo de fermentação (h)**	**Biomassa (A.U.)**	**PT (µg/mL)**	**FHA (µg/mL)**
1	1	28	10	3	38,31	249	5,59	174,11
2	1	28	10	23	38,93	271	6,14	176,32
3	1	28	10	43	37,25	273,6	5,95	149,25
4	1	35	50	3	37,57	274,4	5,70	169,94
5	1	35	50	23	36,35	268,4	5,65	132,98
6	1	35	50	43	36,23	284,6	5,24	129,07
7	1	28	90	3	38,26	256,6	3,69	161,10
8	1	28	90	23	38,09	276,4	6,62	200,57
9	1	28	90	43	39,12	288,9	7,00	153,92
10	1	NC	NC	NC	36,92	270,1	5,12	197,32
11	2	40	10	3	39,26	288,7	6,46	206,68
12	2	40	10	23	38,95	319,1	8,69	219,92
13	2	40	10	43	40,51	306,4	7,46	226,15
14	2	35	50	3	40,24	291	7,92	162,08

		Parâmetros de Condicionamento			Medidas do Desempenho de Fermentação			
Operação	**Semana**	**Temperatura (°C)**	**kLa (h^{-1})**	**Duração (h)**	**Tempo de fermentação (h)**	**Biomassa (A.U.)**	**PT (µg/mL)**	**FHA (µg/mL)**
15	2	35	50	23	40,40	324,9	9,52	196,83
16	2	35	50	43	41,74	334,1	9,72	228,20
17	2	40	90	3	40,63	294,6	7,44	202,25
18	2	40	90	23	41,21	308,2	8,32	204,75
19	2	40	90	43	40,74	331,5	9,56	221,69
20	2	NC	NC	NC	40,24	289,4	6,89	205,41
21	3	35	10	3	37,61	277,8	7,20	159,27
22	3	35	10	23	37,79	296,1	7,77	190,82
23	3	35	10	43	36,60	301,5	8,91	150,98
24	3	28	50	3	38,65	283,2	7,47	202,18
25	3	28	50	23	36,86	295,2	8,49	194,52
26	3	28	50	43	36,06	296,6	7,51	203,41
27	3	35	50	3	39,00	295,8	8,07	176,65
28	3	35	50	23	36,27	295	8,55	207,20
29	3	35	50	43	36,71	309,1	8,42	181,30
30	3	NC	NC	NC	37,77	282,1	6,31	234,33
31	4	35	50	3	38,00	286,4	6,14	196,78
32	4	35	50	23	36,89	307	7,04	195,48
33	4	35	50	43	36,56	302,3	7,06	207,69
34	4	40	50	3	37,59	282	5,60	204,34
35	4	40	50	23	36,89	293,6	5,51	260,48
36	4	40	50	43	36,38	302,8	5,43	216,23
37	4	35	90	3	37,73	291,8	6,20	204,82
38	4	35	90	23	38,09	313,2	6,98	230,79
39	4	35	90	43	37,85	309,5	7,88	177,61
40	4	NC	NC	NC	39,89	275,1	5,48	NT
41	5	28	10	3	35,32	280,4	5,48	161,56
42	5	28	10	23	35,06	292,3	6,43	169,85

		Parâmetros de Condicionamento			Medidas do Desempenho de Fermentação			
Operação	**Semana**	**Temperatura (°C)**	**kLa (h^{-1})**	**Duração (h)**	**Tempo de fermentação (h)**	**Biomassa (A.U.)**	**PT (µg/mL)**	**FHA (µg/mL)**
43	5	28	10	43	34,86	291,7	6,61	168,32
44	5	35	50	3	35,16	281,3	5,73	193,18
45	5	35	50	23	34,33	290,9	6,36	151,63
46	5	35	50	43	34,52	288,4	4,88	227,00
47	5	28	90	3	36,03	278,8	5,90	198,90
48	5	28	90	23	34,67	297,4	5,29	204,31
49	5	28	90	43	34,68	291,4	6,82	232,72
50	5	NC	NC	NC	36,06	281,4	4,26	155,67
51	6	40	10	3	37,54	284,2	4,93	177,32
52	6	40	10	23	36,86	293,4	5,91	207,68
53	6	40	10	43	39,01	292,1	4,95	202,01
54	6	35	50	3	37,74	277,4	5,94	197,46
55	6	35	50	23	36,92	293,9	5,93	171,34
56	6	35	50	43	36,60	295,3	6,48	188,03
57	6	40	90	3	38,17	282	5,28	145,18
58	6	40	90	23	38,27	295,5	5,37	152,10
59	6	40	90	43	37,78	298,8	5,69	182,37
60	6	NC	NC	NC	37,84	285,2	5,57	189,28

NC: Não condicionado

NT: Não testado

Exemplo 3: Validação dos parâmetros de condicionamento na escala de biorreator de 1 litro

[00126] Para validar o espaço estrutural de condicionamento do meio para um aumento de rendimento de PT em 10% identificado no Exemplo 2, os processos de condicionamento e fermentação do meio foram realizados em escala de biorreator de 1 L, utilizando parâmetros de condicionamento dentro do espaço estrutural previsto.

Métodos

[00127] Uma plataforma de 4 x 1L-biorreatores (BioBlock, Eppendorf) foi utilizada para o condicionamento do meio antes da inoculação. A plataforma permite o condicionamento de 4 preparações de meios em paralelo e avaliar consecutivamente seus desempenhos de fermentação. Para a etapa de condicionamento, 1 L de meio de crescimento estéril (ver Exemplos 1 e 2) foi transferido assepticamente para cada biorreator e submetido aos parâmetros de processo descritos no projeto experimental (abaixo). Se o projeto experimental exigisse um meio não condicionado, um dos quatro biorreatores era deixado vazio durante a etapa de condicionamento para permitir a transferência do meio não condicionado posteriormente (veja abaixo).

[00128] Quando a duração predefinida do condicionamento de meio foi alcançada, o condicionamento foi interrompido. Para certas operações, um litro (1 L) de meio não condicionado (preparado como nos Exemplos 1 e 2) foi transferido assepticamente para um dos quatro biorreatores. As seguintes condições foram utilizadas para calibrar o nível de oxigênio dissolvido em 100% (DO) em cada biorreator: temperatura (35 ^{o}C), pressão atmosférica, taxa de vazão de ar (2 L de ar pulverizado por minuto) e velocidade de agitação (300 rpm ou rotações por minuto). 300 µl de um agente antiespumante (Simethicone 15%) foram adicionados assepticamente em cada biorreator.

[00129] A inoculação foi alcançada pela adição de 150 ml de inóculo de *Bordetella* pertussis (preparado em paralelo à etapa de condicionamento conforme descrito nos Exemplos 1 e 2). Durante a fermentação, a temperatura (35 ^{o}C) foi mantida em um nível constante. O controle da formação de espuma durante a fermentação foi executado pela adição de antiespumante (Simethicone 1,5%). O nível de oxigênio dissolvido foi estabelecido em 35% para compensar a pressão de carga aplicada na fermentação em grande escala e regulada pelo aumen-

to da agitação quando o DO caiu abaixo de 35%. A velocidade mínima de agitação foi fixada em 300 rpm; a velocidade máxima de agitação foi fixada em 1100 rpm. O pH foi regulado em 7,2 mediante a adição de ácido acético a 50% (p/v ou peso/volume).

[00130] No final da fermentação (definida como no Exemplo 1), o rendimento de biomassa foi determinado pela medição da densidade óptica e quantidade total de ácido acético adicionado através da regulação de pH (este como um método ortogonal para avaliar o teor de biomassa). A produção de toxina pertussis (PT) no sobrenadante da cultura foi determinada por ELISA utilizando métodos padrão.

Projeto Experimental

[00131] No Exemplo 2, foi calculado um espaço estrutural que resulta em pelo menos 10% de aumento no rendimento de PT. Neste experimento, comparou-se o desempenho da fermentação (tempo de fermentação, biomassa, rendimento de PT e FHA) do meio condicionado sob 3 conjuntos diferentes de parâmetros de processo (Processos 2 a 4 na Tabela 4) dentro do espaço estrutural de PT calculado, versus meio não condicionado (Processo 1 na Tabela 4). Os processos 2 e 3 testaram os parâmetros operacionais ideais para o rendimento de PT (32 h a 31 ^{o}C) em valores kLa de 90 h^{-1} ou 60 h^{-1}, respectivamente. O processo 4 testou os parâmetros de operação em uma temperatura de condicionamento de 35 ^{o}C e kLa de 60 h^{-1}. O experimento foi executado uma vez.

Tabela 4

Processo	Duração (horas)	Temperatura (°C)	kLa (h^{-1})
1	32	4	0
2	32	31	90
3	32	31	60
4	32	35	60

Resultados

[00132] Como ilustrado na FIG. 3, as fermentações realizadas em

meio condicionado (Processos 2, 3 e 4) produziram um teor de PT que foi mais do que 10% maior que as fermentações realizadas em meio não condicionado (painel direito). O teor de biomassa não foi significativamente afetado pela temperatura ou kLa na escala do biorreator de 1 L (painel esquerdo). Estes resultados validam o espaço estrutural para um aumento de rendimento de PT em 10%, identificado no estudo de planejamento experimental (Exemplo 2).

Exemplo 4: Efeito da duração do condicionamento na escala do biorreator de 1 litro

[00133] Para explorar o efeito da duração do condicionamento em uma faixa de tempo mais ampla, o Exemplo 3 foi repetido com uma temperatura de condicionamento de 31 ºC, um valor kLa de 90 h^{-1} e durações de condicionamento de < 3 h, 32 h ou 56 h (Tabela 5). O experimento foi executado em duplicata.

Tabela 5

Processo	Duração (horas)	Temperatura (°C)	kLa (h^{-1})
5	32	4	0
6	<3	31	90
7	32	31	90
8	56	31	90

Resultados

[00134] Como mostrado na FIG. 4, o condicionamento do meio durante 32 h e 56 h resultou em um aumento ≥ 10% no teor de PT em comparação com o meio não condicionado (painel superior). A biomassa também aumentou em 32 h e 56 h (painel inferior). O efeito do aumento da duração do condicionamento no teor de PT e biomassa atingiu um patamar por volta de 32 h.

Exemplo 5: Validação dos parâmetros de condicionamento ideais na escala de biorreator de 20 L

[00135] Os parâmetros de condicionamento ideais do meio também foram validados em fermentações de *Bordetella* realizadas em escala

de biorreator de 20 L.

Métodos

[00136] Um fermentador de 20 L (Biolafitte™) foi utilizado para o condicionamento do meio antes da inoculação. 10L de meio de crescimento estéril, preparado como no Exemplo 1, foram transferidos assepticamente para o biorreator de 20 L e submetidos aos parâmetros do processo de condicionamento resumidos na Tabela 6.

Tabela 6

Semana	**Operação**	**Taxa de Vazão da Aeração (L/min)**	**Velocidade de agitação (rpm)**	**Temperatura (°C)**	**Duração (h)**	**kLa (h^{-1})**
1	1	0	0	4	32	0
	2	14,6	450	31	32	90
2	3	**1,46**	450	31	32	≈ 10
	4	14,6	450	31	32	90
3	5	14,6	**50**	31	32	≈ 10
	6	14,6	450	31	32	90
4	7	14,6	450	**23**	32	90
	8	14,6	450	31	32	90
5	9	14,6	450	31	**3**	90
	10	14,6	450	31	32	90

[00137] O sistema de pré-cultura foi preparado conforme descrito no Exemplo 1, exceto que a primeira e a segunda pré-culturas foram preparadas em duplicata (2 x 30 ml da primeira pré-cultura; 2 x 1000 ml da segunda pré-cultura). Após crescimento a 35 ºC (+/- 1 ºC) e 150 rpm durante 24 h (+/- 1h), os dois frascos de agitação descartáveis da segunda pré-cultura foram combinados. A pré-cultura combinada foi utilizada para inocular um fermentador assim que a segunda pré-cultura foi interrompida.

[00138] Assim que a duração predefinida da etapa de condicionamento foi alcançada, o condicionamento foi interrompido e as seguintes condições foram utilizadas para calibrar o nível de oxigênio dissol-

vido a 100% (DO): temperatura (35 °C), pressão de carga (0,4 bar), taxa de vazão de ar (14,6 L de ar pulverizado por minuto) e velocidade de agitação (50 rpm ou rotações por minuto) antes da inoculação. 3 ml de um agente antiespumante (Simethicone 15%) são adicionados assepticamente em cada biorreator.

[00139] A inoculação foi conseguida pela adição de 1,5 L da pré-cultura combinada. Durante a fermentação, a temperatura (35 °C) e a pressão de carga (0,4 bar) foram mantidas em um nível constante. O controle da formação de espuma durante a fermentação foi executado pela adição de antiespumante (Simethicone 1,5%). O nível de oxigênio dissolvido foi estabelecido em 25% e regulado através do aumento da agitação quando o DO caiu abaixo de 25%. A velocidade mínima de agitação foi fixada em 50 rpm; a velocidade máxima de agitação foi fixada em 1000 rpm. O pH foi regulado em 7,2 pela adição de ácido acético a 50% (p/v ou peso/volume).

Projeto experimental

[00140] O experimento foi projetado para comparar o desempenho da fermentação do meio condicionado sob parâmetros de processo ideais (31 °C, 32 h, kLa de 90 h^{-1}) com o meio condicionado sob parâmetros de processo diferentes em apenas um parâmetro do ideal.

[00141] Na semana 1, o efeito dos parâmetros ideais (Operação 2) versus meio não condicionado (Operação 1) foi verificado. Nas semanas 2 e 3, o efeito do baixo condicionamento kLa (Operação 3 - baixa aeração e Operação 5 - baixa velocidade de agitação) foi comparado com as condições operacionais ideais (Operações 4 e 6). Nas semanas 4 e 5, o efeito da baixa temperatura (Operação 7: 23 °C) e baixa duração (Execução 9: 3h) foram comparados, respectivamente, com os parâmetros operacionais ideais (Operações 8 e 10).

Resultados

[00142] Conforme ilustrado na FIG. 5 e Tabela 7, a fermentação

realizada em meio condicionado com parâmetros de processo ideais fornece um rendimento de PT maior do que 10% quando comparado a:

- um meio não condicionado (semana 1)

- um meio condicionado com baixo kLa (≈10 h^{-1}), resultante de uma baixa taxa de vazão de aeração (semana 2)

- um meio condicionado com baixo kLa (≈10 h^{-1}) resultante de uma baixa velocidade de agitação (semana 3)

- um meio condicionado com uma temperatura baixa (23 ^{o}C) (semana 4)

- um meio condicionado com curta duração (3 h) (semana 5)

[00143] Esses dados confirmam os parâmetros operacionais ideais de condicionamento do meio para rendimento de PT em escala de fermentação de 20 L. Nenhum impacto negativo foi observado no rendimento de biomassa, rendimento de FHA e tempo de fermentação. Surpreendentemente, enquanto os estudos em pequena escala descritos nos Exemplos 1 a 4 não encontraram nenhum efeito de kLa baixo no rendimento de PT, um efeito negativo de kLa baixo foi observado na escala de fermentação de 20 L. Assim, duração, temperatura e kLa parecem ser fatores importantes para produzir o efeito de condicionamento em escala de fermentação de 20 L.

Tabela 7: Desempenhos de fermentação em escala de 20 L

		Desempenho de fermentação (% de alteração do meio não condicionado)			
Semana	**Parâmetros de processo**	**Biomass (OD)**	**Tempo de fermentação (h)**	**PT (µg/mL)**	**FHA (µg/mL)**
Semana 1	NC	0%	0%	0%	0%
	Ideais	9%	1%	16%	23%
Semana	Baixo kLa (aeração)	13%	-14%	6%	21%

		Desempenho de fermentação (% de alteração do meio não condicionado)			
Semana	**Parâmetros de processo**	**Biomass (OD)**	**Tempo de fermentação (h)**	**PT (µg/mL)**	**FHA (µg/mL)**
2	Ideais	14%	-14%	21%	23%
Semana 3	Baixo kLa (agitação)	25%	0%	4%	-10%
	Ideais	18%	-6%	18%	10%
Semana 4	Baixa Temp	19%	-3%	-5%	12%
	Ideais	18%	-8%	17%	12%
Semana 5	Baixa duração	19%	6%	0%	10%
	Ideais	26%	-3%	10%	-1%

NC: meio de crescimento não condicionado

Exemplo 6: Validação de parâmetros de condicionamento ideais em grande escala

[00144] Os parâmetros de condicionamento de meio foram executados em grande escala e validados em fermentações de *Bordetella* realizadas em tanques de fermentação em pequena escala (< 1 L).

Métodos

[00145] Um fermentador de 800 L e um tanque de preparação de meio de 2400 L foram utilizados para o condicionamento do meio em grande escala antes da inoculação. O meio de crescimento estéril, preparado como no Exemplo 1, foi transferido assepticamente para dentro do fermentador (800 L) ou do tanque de preparação de meio (2400 L) e submetido aos seguintes parâmetros do processo de condicionamento do meio (Tabela 7). Devido às diferenças entre os recipientes, tais como o modelo do pulverizador de aeração e o sistema de agitação, os valores de Kla alcançados no tanque de preparação do meio foram mais baixos do que aqueles obtidos no fermentador.

Tabela 7

Operação	Amostra No.	Taxa de Vazão de Aeração (L/min)	Velocidade de agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Duração (h)
1 (fermentador de 800 L)	1*	0	0	4	0
	2	150	210	35	32
2 (tanque de preparação do meio)	3*	0	0	4	0
	4	150	80	35	20
	5	150	80	35	32

* Meio de crescimento não condicionado (NC) - Controle

[00146] Cinco amostras do meio condicionado estéril foram coletadas em diferentes momentos em sacos de amostragem Novaseptum e imediatamente armazenadas a 4 °C.

[00147] Cada uma das cinco amostras foi transferida para um recipiente de fermentação em pequena escala (< 1 L) e inoculada com um sistema de pré-cultura de *Bordetella* preparado conforme descrito no Exemplo 1, para avaliação do crescimento e produção de antígeno.

[00148] Os indicadores de desempenho de fermentação foram avaliados através da medição do teor de PT e FHA (ELISA), do teor de biomassa (curva de crescimento e densidade óptica final) e do tempo de fermentação (medido conforme descrito no Exemplo 1).

Resultados

[00149] Conforme ilustrado na FIG. 6, o efeito do condicionamento do meio sobre o desempenho do crescimento durante as etapas de fermentação subsequentes foi comparável independentemente do tipo de recipiente utilizado para executar a etapa de condicionamento. No entanto, em cada caso, houve um efeito positivo demonstrável na fermentação utilizando meio pré-condicionado (FIG. 7(A) e (B)).

[00150] Em comparação com o meio não condicionado (controle), o crescimento bacteriano foi mais rápido, o que significa que os tempos

gerais de fermentação podem ser reduzidos em cerca de 8% em média. Utilizando meio condicionado, a biomassa final alcançada foi maior do que aquela dos controles (em torno de 9% maior no início da fase estacionária). Curiosamente, os desempenhos de crescimento do meio condicionado ao longo de 20 horas e 32 horas foram comparáveis (FIG. 8).

[00151] A fermentação realizada em meio condicionado melhorou o rendimento tanto da PT quanto da FHA. Especificamente, em relação ao controle, a produtividade de PT aumentou 7% após 20 horas de condicionamento do meio e 15% após 32 horas de condicionamento do meio. Da mesma forma, em comparação com o controle, a produtividade de FHA aumentou em 9% após 20 horas de condicionamento do meio e em 15% após 32 horas de condicionamento do meio.

Tabela 8: Resultados resumidos dos desempenhos de crescimento e produtividades de antígenos. O tempo de fermentação e a biomassa no início da fase estacionária foram definidos diretamente a partir das curvas de crescimento.

Amostra No.	**Tempo de fermentação (h)**	**Biomassa (A.U[a])**	**Biomassa (OD[b])**	**PT (µg/ml)**	**FHA (µg/ml)**	**Produtividade de PT (µg/ml*h)**	**Produtividade de FHA (µg/ml*h)**
1	35,2	21,9	4,26	4,16	190	0,118	5,4
2	32,5	23,6	3,64	5,02	191	0,154	5,9
3	34,1	22,2	3,6	4,86	182	0,143	5,3
4	31,6	24,3	3,86	4,81	183	0,152	5,8
5	31,6	24,3	3,80	5,19	193	0,164	6,1

a - Valor no início da fase estacionária, definido a partir da curva de crescimento médio;

b - Leitura de OD em amostras armazenadas 2 dias a 4 ^{o}C após o final da fermentação

[00152] Esses dados confirmam os efeitos positivos do uso de uma etapa de condicionamento de meio livre de células em grande escala

(até 2400 L) antes do uso do meio condicionado para fermentação bacteriana.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de um meio de crescimento condicionado, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. fornecer um meio de crescimento estéril;

b. manter o meio de crescimento estéril em uma temperatura entre cerca de 28 e cerca de 35 ºC durante cerca de 20 a 35 horas; e

c. agitar e/ou arejar o meio de crescimento estéril para produzir um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 10 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1},

fornecendo assim o meio de crescimento condicionado.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa b) é realizada em uma temperatura entre cerca de 29 ºC e cerca de 33 ºC, cerca de 30 ºC e cerca de 32 ºC ou ao redor de 31 ºC; e/ou em que a etapa b) é realizada durante cerca de 25 a 35 horas, cerca de 30 a 35 horas ou ao redor de 32 horas.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que na etapa c) o meio de crescimento estéril é agitado continuamente em toda a duração da etapa b), opcionalmente em que a agitação está em uma velocidade de agitação que produz um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}; e/ou em que na etapa c) o meio de crescimento estéril é aerado continuamente em toda a duração da etapa b), opcionalmente em que a aeração está em uma taxa de vazão que produz um coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}; e/ou em que a etapa c) compreende agitar e arejar o meio de crescimento estéril continuamente em toda a duração da etapa b), opcionalmente em que a agitação e a aeração estão em uma velocidade de agitação e taxa de vazão que produz um coeficien-

te de transferência de massa volumétrica de oxigênio (kLa) de cerca de 60 h^{-1} a cerca de 130 h^{-1} ou ao redor de 90 h^{-1}.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o processo é realizado em uma escala de pelo menos 10 L, pelo menos 100 L, pelo menos 800 L ou pelo menos 1000 L de meio de crescimento estéril.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o meio de crescimento é meio Stainer Scholte modificado (MSS), opcionalmente compreendendo niacina.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o meio de crescimento é meio de Stainer and Scholte modificado compreendendo cerca de 1 g/L de dimetil-β-ciclodextrina e cerca de 10 g/L de hidrolisado de caseína ácida; e/ou em que o meio de crescimento é meio de Stainer and Scholte modificado compreendendo ao redor de 40 mg/L de L-cisteína em vez de L-cistina; ao redor de 11,84 g/L de Na-L-Glutamato; ao redor de 150 mg/L de glutationa; e/ou ao redor de 400 mg/L de ácido ascórbico (por exemplo, ao redor de 400 mg/L).

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o processo é um processo asséptico.

8. Meio de crescimento condicionado estéril, caracterizado pelo fato de que é produzido pelo processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. Processo para o cultivo de uma espécie de *Bordetella*, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. inocular o meio de crescimento condicionado estéril, como definido na reivindicação 8 com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*; e

b. manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam o aumento da biomassa e/ou da produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*.

10. Processo para a produção de uma proteína de *Bordetella*, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. inocular o meio de crescimento condicionado estéril, como definido na reivindicação 8 com pelo menos uma célula de *Bordetella* para produzir uma cultura de *Bordetella*;

b. manter a cultura de *Bordetella* sob condições que permitam a produção de pelo menos uma proteína de *Bordetella*; e

c. isolar a referida pelo menos uma proteína de *Bordetella* da cultura.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é selecionada do grupo que consiste em toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina e adenilato ciclase; e/ou em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é produzida com um rendimento que é pelo menos 10% maior do que o rendimento produzido a partir do mesmo processo realizado com meio de crescimento não condicionado.

12. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é a toxina pertussis, por exemplo, uma toxina pertussis geneticamente desintoxicada, opcionalmente em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é uma toxina pertussis geneticamente desintoxicada na qual dois resíduos catalíticos da subunidade S1 (Arg9 e Glu129) são submetidos a mutação para Lys9 e Gly129; e/ou em que a pelo menos uma proteína de *Bordetella* é a hemaglutinina filamentosa ou ainda compreende a hemaglutinina filamentosa, opcionalmente em que o rendimento de hemaglutinina filamentosa é inalterado ou

maior do que o rendimento produzido a partir do mesmo processo realizado com o meio de crescimento não condicionado.

13. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, caracterizado pelo fato de que o tempo de fermentação é pelo menos 10% mais curto do que o tempo de fermentação para o mesmo processo realizado com o meio de crescimento não condicionado; e/ou em que a cultura de *Bordetella* possui uma biomassa no final da fermentação que é pelo menos 10% maior do que a biomassa produzida pelo mesmo processo realizado com o meio de crescimento não condicionado.

14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 13, caracterizado pelo fato de que o processo ainda compreende a etapa de purificação de uma ou mais proteínas de *Bordetella* da cultura de *Bordetella*.

15. Proteína de *Bordetella* isolada, caracterizada pelo fato de que é produzida pelo processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 9 a 14.

16. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína de *Bordetella* isolada, como definida na reivindicação 15.

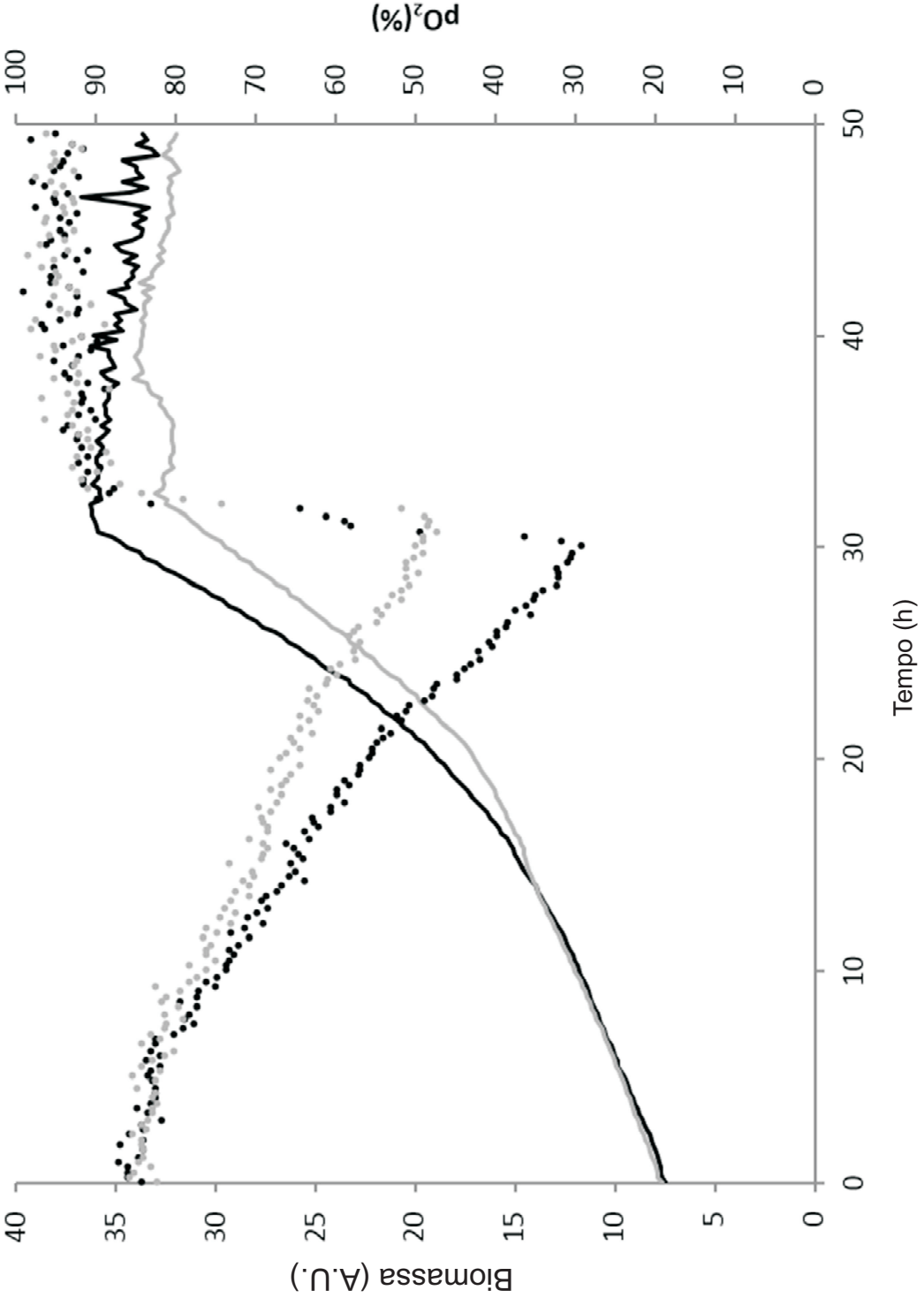

Biomassa (A.U.)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
pO2(%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Tempo (h)
0
10
20
30
40
50

FIG. 1

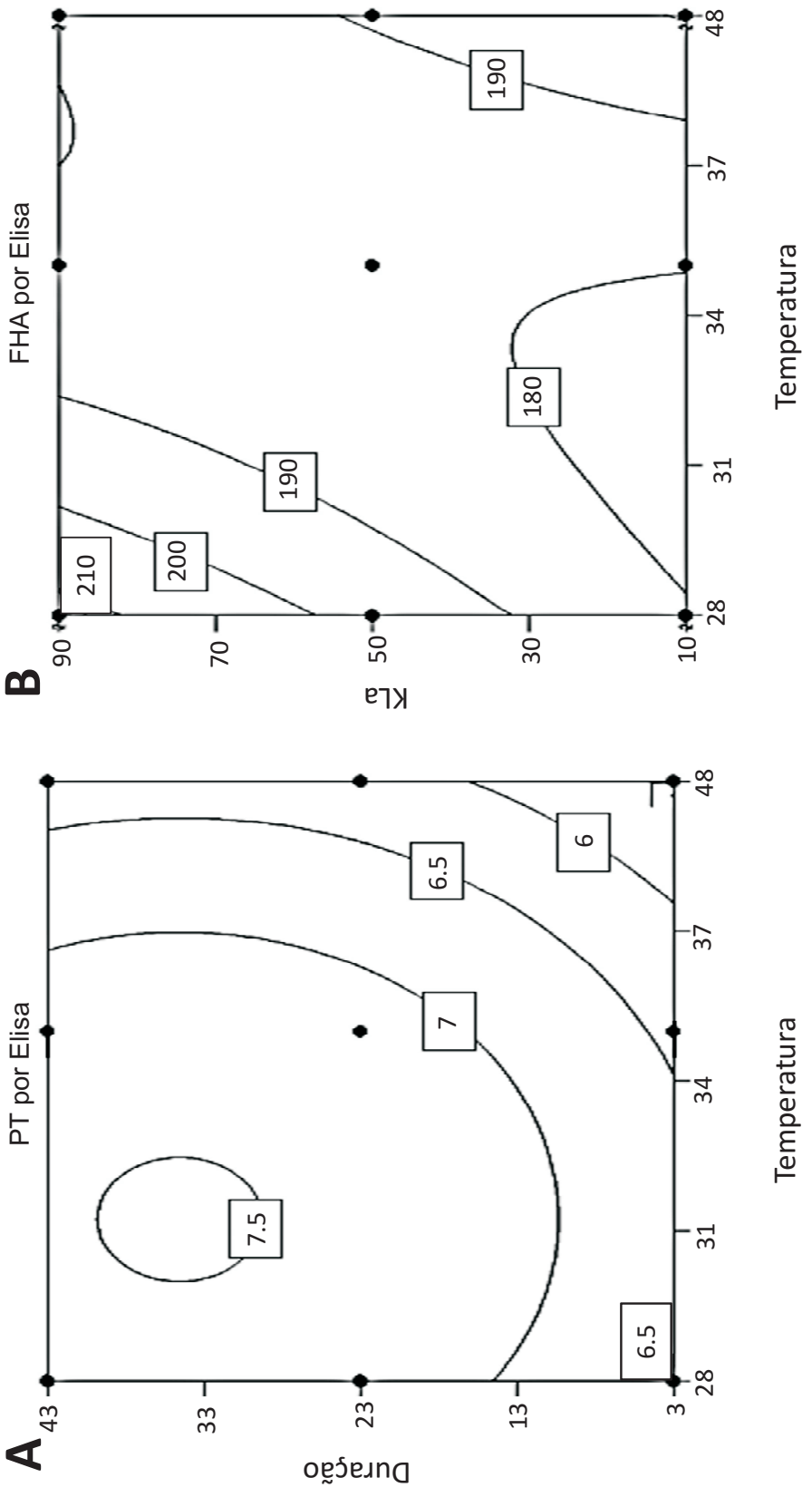

A
PT por Elisa
Duração
Temperatura
43
33
23
13
3
28
31
34
37
48
7.5
7
6.5
6
6.5
B
FHA por Elisa
kLa
Temperatura
90
70
50
30
10
28
31
34
37
48
210
200
190
190
180

FIG. 2

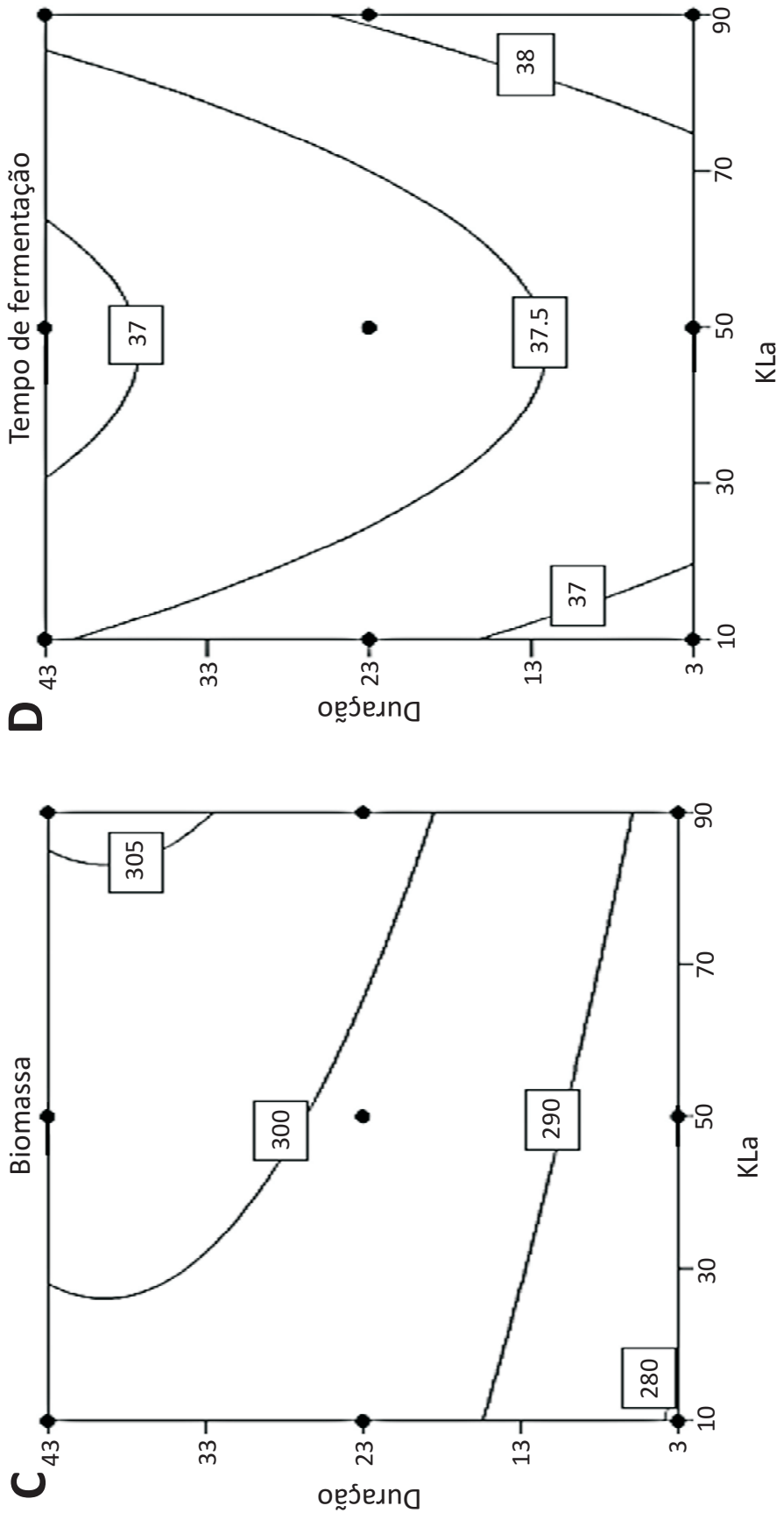

C
Biomassa
Duração
KLa
305
300
290
280
43
33
23
13
3
10
30
50
70
90
D
Tempo de fermentação
Duração
KLa
38
37.5
37
37
43
33
23
13
3
10
30
50
70
90

FIG. 2 (cont.)

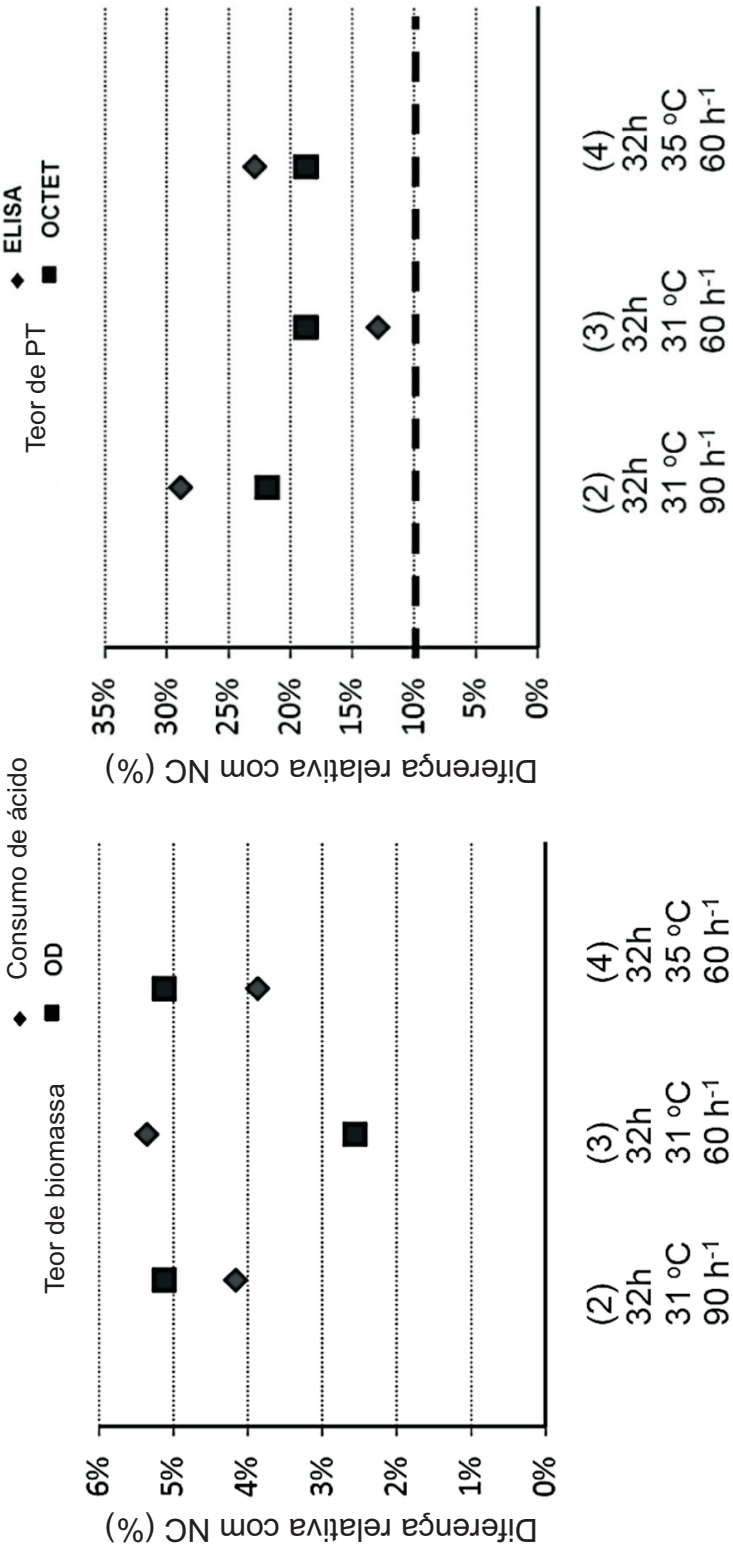

Teor de biomassa
Consumo de ácido
OD
Diferença relativa com NC (%)
6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
(2) 32h 31 °C 90 h-1
(3) 32h 31 °C 60 h-1
(4) 32h 35 °C 60 h-1
Teor de PT
ELISA
OCTET
Diferença relativa com NC (%)
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
(2) 32h 31 °C 90 h-1
(3) 32h 31 °C 60 h-1
(4) 32h 35 °C 60 h-1

FIG. 3

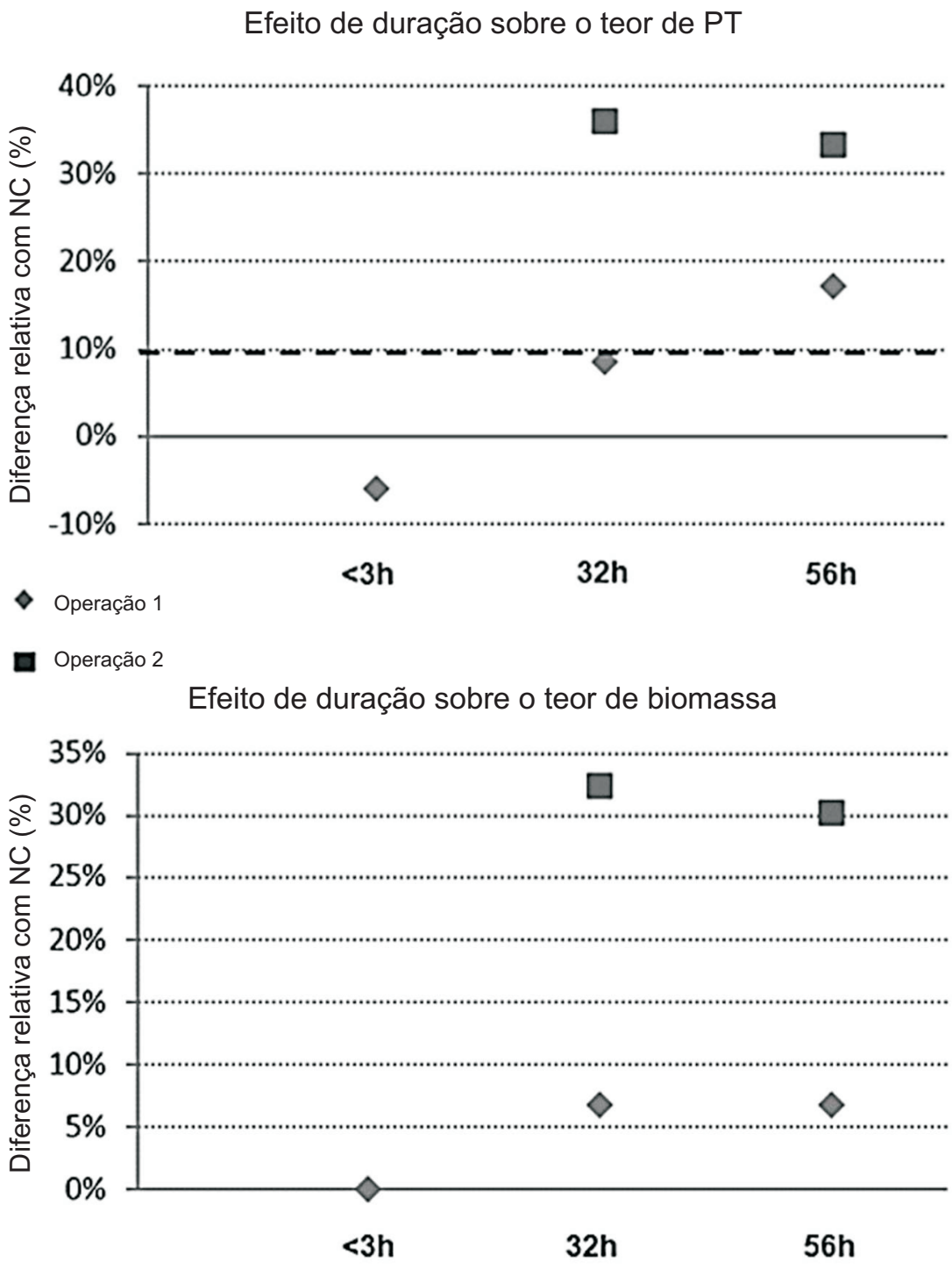

Efeito de duração sobre o teor de PT
Diferença relativa com NC (%)
40%
30%
20%
10%
0%
-10%
<3h
32h
56h
Operação 1
Operação 2
Efeito de duração sobre o teor de biomassa
Diferença relativa com NC (%)
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
<3h
32h
56h

FIG. 4

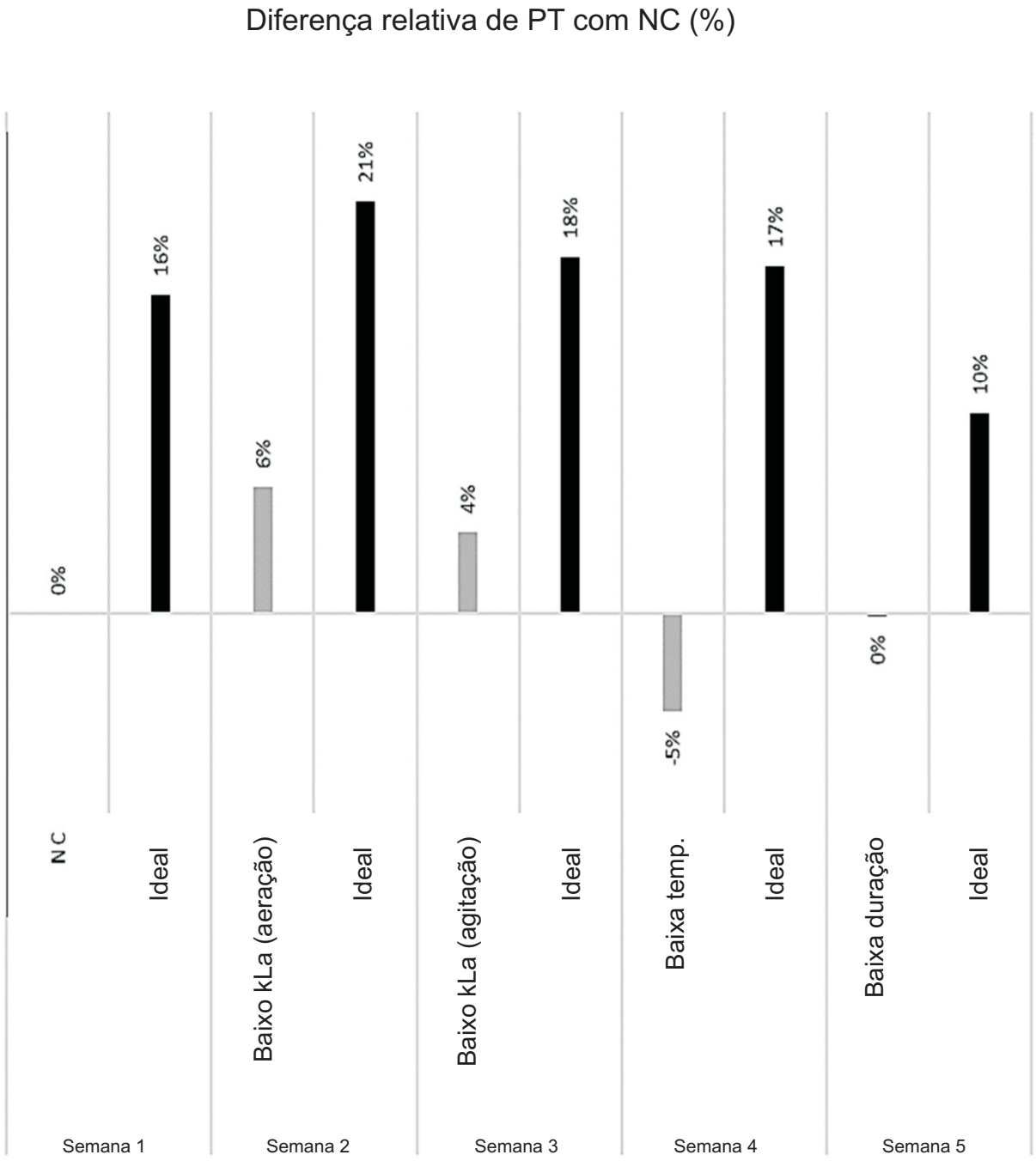

Diferença relativa de PT com NC (%)
0%
16%
6%
21%
4%
18%
-5%
17%
0%
10%
NC
Ideal
Baixo kLa (aeração)
Ideal
Baixo kLa (agitação)
Ideal
Baixa temp.
Ideal
Baixa duração
Ideal
Semana 1
Semana 2
Semana 3
Semana 4
Semana 5

FIG. 5

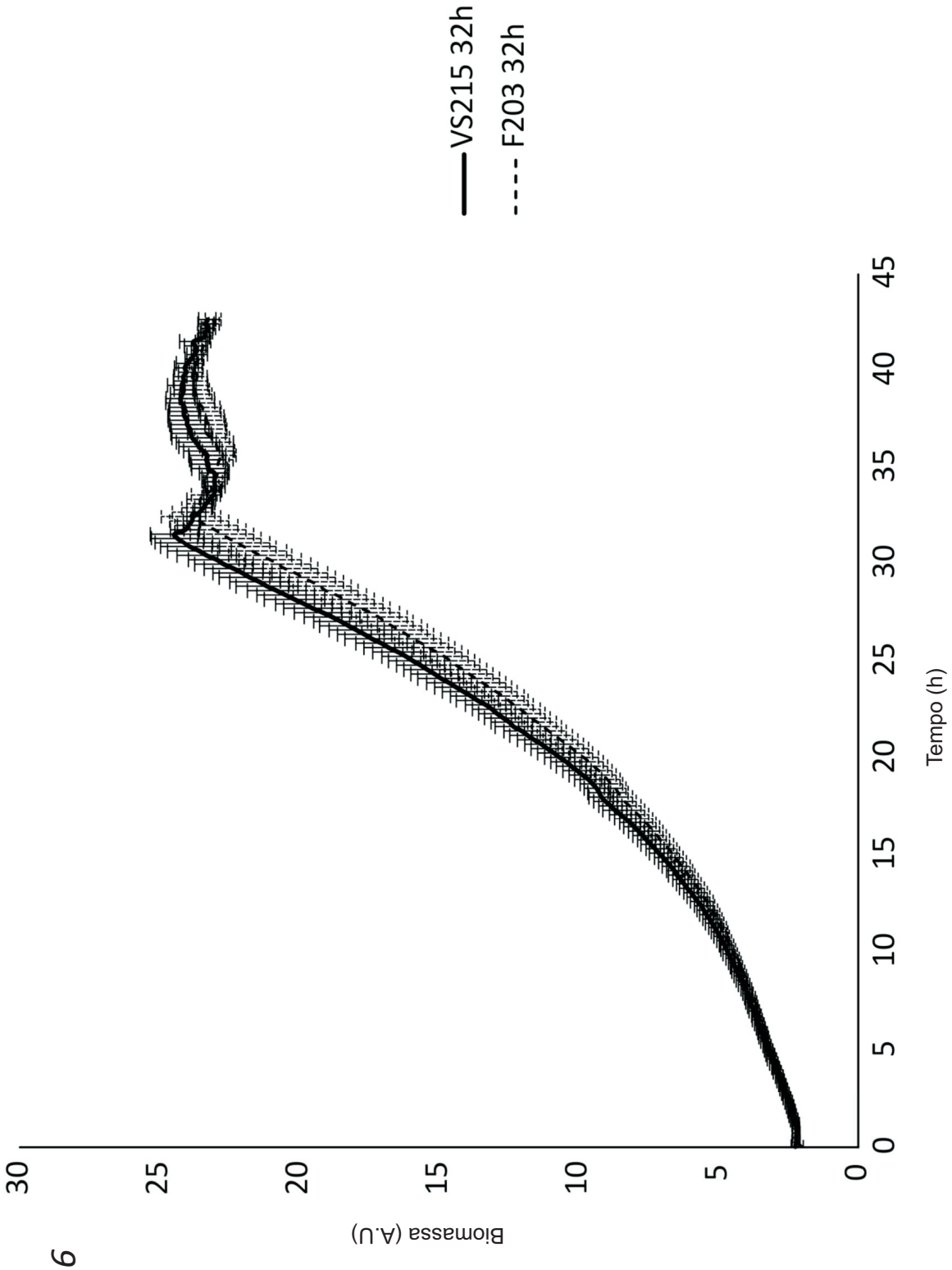
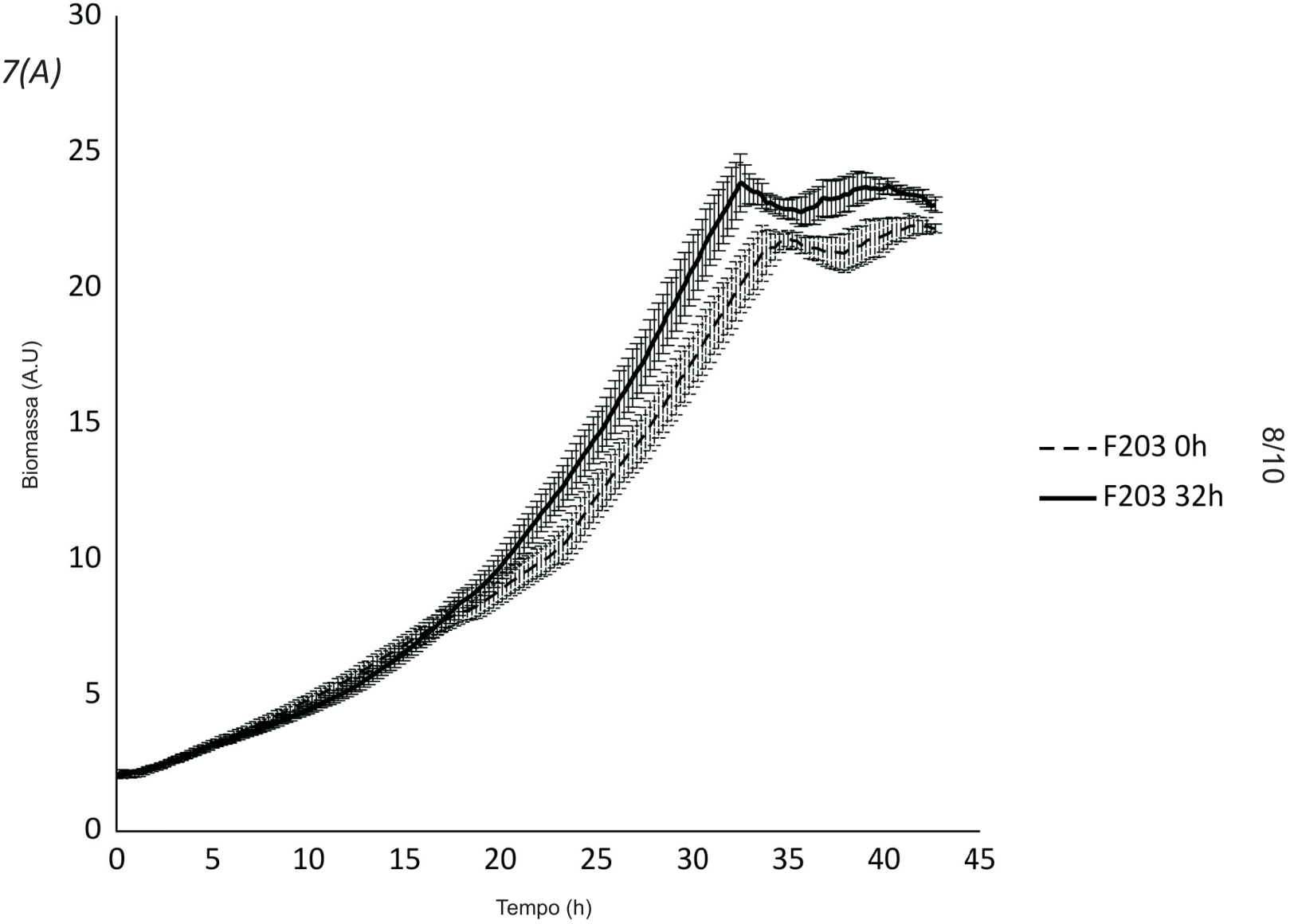


FIG. 6

Petição 870210073965, de 12/08/2021, pág. 69/78

FIG. 7(A)



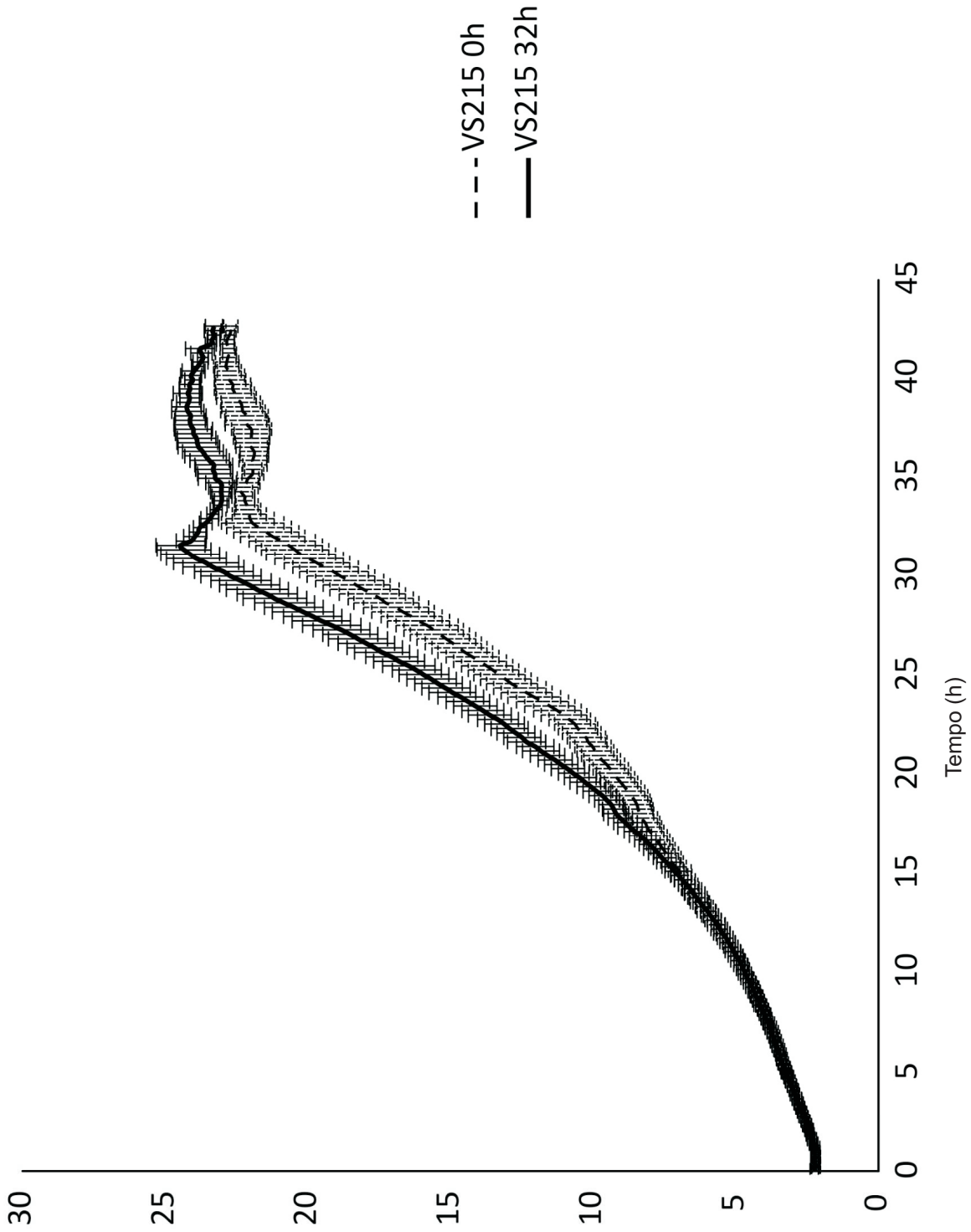


FIG. 7(B)

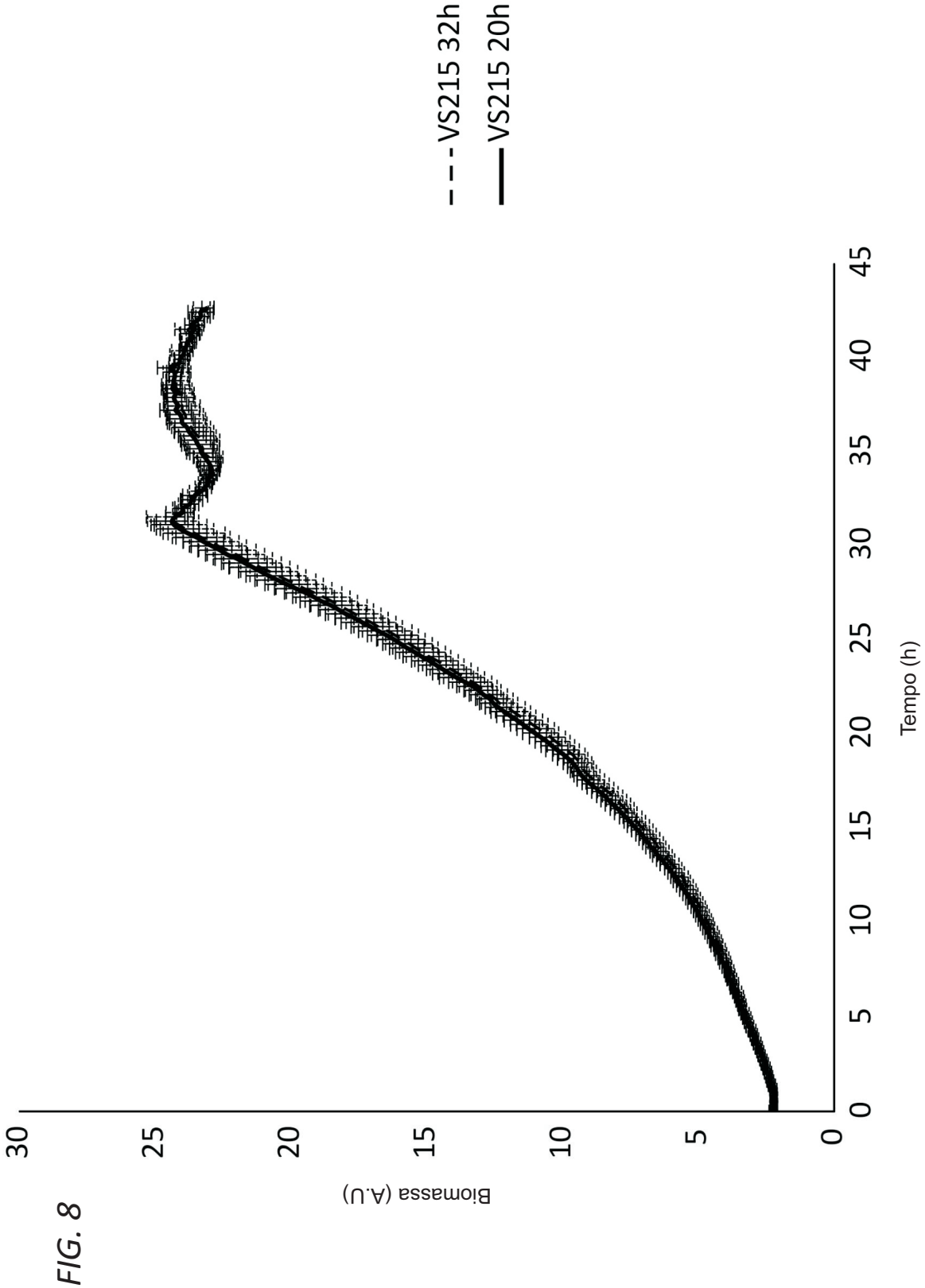

VS215 32h
VS215 20h
Biomassa (A.U)
Tempo (h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45

FIG. 8

RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO DE FERMENTAÇÃO".**

A presente invenção refere-se a processos para a fermentação e produção do fator de virulência de *Bordetella*, especialmente produção de PT, para fabricação em grande escala. Mais particularmente, a invenção refere-se a processos incluindo uma etapa de condicionamento do meio realizada antes da inoculação.