

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2018118035, 10.11.2016

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

17.11.2015 US 62/256,347;

26.10.2016 US 62/413,051

(43) Дата публикации заявки: 18.12.2019 Бюл. № 35

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 18.06.2018

(86) Заявка РСТ:

IB 2016/056780 (10.11.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2017/085602 (26.05.2017)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спаская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

**ПФАЙЗЕР ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**ДЕСАИ Сунил Гурурао (US),****ХЭНСОН Майкл Аллен (US),****КИНРОСС Джонатан Патрик (US),****ЛАСКО Дэниэл Р. (US),****ЛОМБЕРК Скотт Эллис (US),****ЛОТВИН Джейсон Арнольд (US),****ПАТЕЛ-БРАУН Суджата Каушибхай (US),****СУНЬ Вэйцян (US),****ТОМАСЕЛЛО Питер Энтони (US)**(54) **СРЕДЫ И СПОСОБЫ ФЕРМЕНТАЦИИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПОЛИСАХАРИДОВ В  
БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ**

## (57) Формула изобретения

1. Полисахарид-продуцирующая бактериальная среда для культивирования клеток, содержащая растительный гидролизат, экстракт дрожжей и источник углерода.

2. Среда по п. 1, где растительный гидролизат представляет собой соевый гидролизат

3. Среда по п.2, где соевый гидролизат выбран из группы, состоящей из HYPER 1510 (Kerry Group Services Ltd.), HYPER 4601 (Kerry Group Services Ltd.), HYPER 5603 (Kerry Group Services Ltd.), HY-SOY (Kerry Group Services Ltd.), AMI-SOY (Kerry Group Services Ltd.), N-Z-SOY (Kerry Group Services Ltd.), N-Z-SOY BL4 (Kerry Group Services Ltd.), N-Z-SOY BL7 (Kerry Group Services Ltd.), SHEFTONE D (Kerry Group Services Ltd.), SE50M, SE50MK, соевого пептона, сойтона BACTO (Difco Laboratories Inc.), NUTRISOY 2207 (ADM), NUTRISOY (ADM), NUTRISOY flour (ADM), и жмыха соевых бобов.

4. Среда по п.3, где соевый гидролизат представляет собой HYPER 1510 (Kerry Group Services Ltd.).

5. Среда по любому из пп.1-4, где концентрация растительного гидролизата составляет приблизительно от 5 г/л и приблизительно до 75 г/л.

6. Среда по п.5, где концентрация растительного гидролизата составляет приблизительно от 10 г/л и приблизительно до 50 г/л.

7. Среда по п.6, где концентрация растительного гидролизата составляет

приблизительно 28 г/л.

8. Среда по любому из пп.1-7, где экстракт дрожжей представляет собой дрожжевой аутолизат, ультрафильтрованный экстракт дрожжей или синтетический экстракт дрожжей.

9. Среда по п.8, где экстракт дрожжей представляет собой ультрафильтрованный экстракт дрожжей.

10. Среда по п.9, где ультрафильтрованный экстракт дрожжей представляет собой AMBERFERM 5902 (Sensient Technologies Corp.), BD DIFCO (BD Biosciences), HYPER YE (Kerry Group Services Ltd.), ULTRAPEP YE (Kerry Group Services Ltd.), HY-YEST 412 (Kerry Group Services Ltd.), HY-YEST 441 (Kerry Group Services Ltd.), HY-YEST 444 (Kerry Group Services Ltd.), HY-YEST 455 (Kerry Group Services Ltd.) или HY-YEST 504 (Kerry Group Services Ltd.).

11. Среда по любому из пп.1-10, где концентрация экстракта дрожжей составляет приблизительно от 1 г/л до приблизительно 50 г/л.

12. Среда по п.11, где концентрация экстракта дрожжей составляет приблизительно от 5 г/л до приблизительно 25 г/л.

13. Среда по п.12, где концентрация экстракта дрожжей составляет приблизительно 10 г/л.

14. Среда по любому из пп.1-13, где источник углерода выбран из группы, состоящей из глюкозы, декстрозы, манниты, лактозы, сахарозы, фруктозы, галактозы, рафинозы, ксилозы и маннозы.

15. Среда по п.14, где источник углерода представляет собой глюкозу.

16. Среда по любому из пп. 1-15, где концентрация источника углерода составляет приблизительно от 25 г/л до приблизительно 100 г/л.

17. Среда по п.16, где концентрация источника углерода составляет приблизительно от 50 г/л до приблизительно 90 г/л.

18. Среда по п.17, где концентрация источника углерода составляет приблизительно 80 г/л.

19. Среда по любому из пп. 1-18, где среда содержит соевый гидролизат, ультрафильтрованный экстракт дрожжей и глюкозу.

20. Среда по любому из пп. 1-19, где среда дополнительно содержит фосфат-содержащий ингредиент.

21. Среда по п. 20, где фосфат-содержащий ингредиент представляет собой  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  или  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

22. Среда по любому из пп. 1-21, где среда дополнительно содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту, витамин, нуклеозид или неорганическую соль.

23. Полисахарид-продуцирующая бактериальная среда для культивирования клеток с общей концентрацией аминокислот больше чем приблизительно 50 мМ.

24. Среда по п. 23, где среда содержит общую концентрацию глицина приблизительно от 1,5 мМ и приблизительно до 60,0 мМ.

25. Среда по п.24, где общая концентрация глицина составляет приблизительно от 5,0 мМ и приблизительно до 15,0 мМ.

26. Среда по п.25, где общая концентрация глицина составляет приблизительно 7,5 мМ.

27. Среда по любому из пп. 23-26, где среда содержит общую концентрацию аргинина приблизительно от 1,0 мМ и приблизительно до 30,0 мМ.

28. Среда по п. 27, где общая концентрация аргинина составляет приблизительно от 1,0 мМ и приблизительно до 20,0 мМ.

29. Среда по п. 28, где общая концентрация аргинина составляет приблизительно 4,0 мМ.

30. Среда по любому из пп. 23-29, где среда содержит общую концентрацию цистеина приблизительно от 0,1 мМ и приблизительно до 5,0 мМ.

31. Среда по п.30, где общая концентрация цистеина составляет приблизительно от 0,1 мМ и приблизительно до 3,5 мМ.

32. Среда по п.31, где общая концентрация цистеина составляет приблизительно 0,4 мМ.

33. Среда по любому из пп. 23-32, где среда содержит общую концентрацию серина приблизительно от 5,0 мМ и приблизительно до 75,0 мМ.

34. Среда по п.33, где общая концентрация серина составляет приблизительно от 5,0 мМ и приблизительно до 15,0 мМ.

35. Среда по п.34, где общая концентрация серина составляет приблизительно 7,5 мМ, или приблизительно до 10 мМ.

36. Среда по любому из пп. 23-35, где среда содержит общую концентрацию глутамина приблизительно от 1,0 мМ и приблизительно до 30,0 мМ.

37. Среда по п.36, где общая концентрация глутамина составляет приблизительно от 1,0 мМ и приблизительно до 20,0 мМ.

38. Среда по п.37, где общая концентрация глутамина составляет приблизительно 4,0 мМ.

39. Среда по любому из пп. 23-38, где среда содержит общую концентрацию тирозина приблизительно от 0,1 мМ и приблизительно до 5,0 мМ.

40. Среда по п.39, где общая концентрация тирозина составляет приблизительно от 1,0 мМ и приблизительно до 3,5 мМ.

41. Среда по п.40, где общая концентрация тирозина составляет приблизительно 2,9 мМ или приблизительно до 3,0 мМ.

42. Среда по любому из пп. 23-41, где среда содержит общую концентрацию аспарагина приблизительно от 5,0 мМ и приблизительно до 50,0 мМ.

43. Среда по п.42, где общая концентрация аспарагина составляет приблизительно от 10,0 мМ и приблизительно до 30,0 мМ.

44. Среда по п.43, где общая концентрация аспарагина составляет приблизительно 20,0 мМ.

45. Среда по любому из пп. 23-41, где среда не содержит аспарагин.

46. Среда по любому из пп. 23-45, где среда дополнительно содержит калиевую соль.

47. Среда по п.46, где калиевая соль представляет собой хлорид калия или сульфат калия.

48. Среда по п.46 или п.47, где общая концентрация калиевой соли составляет приблизительно от 0,1 г/л и приблизительно до 25 г/л.

49. Среда по п. 48, общая концентрация калиевой соли составляет приблизительно от 0,2 г/л и приблизительно до 1,25 г/л.

50. Среда по п.49, где общая концентрация калиевой соли приблизительно 0,9 г/л.

51. Среда по любому из пп. 23-50, где среда дополнительно содержит источник углерода.

52. Среда по п. 51, где источники углерода выбраны из группы, состоящей из глюкозы, декстрозы, маннита, лактозы, сахарозы, фруктозы, галактозы, рафинозы, ксилозы и маннозы.

53. Среда по п.52, где источник углерода представляет собой глюкозу.

54. Среда по любому из пп. 51-53, где среда содержит общую концентрацию источника углерода приблизительно от 25 г/л и приблизительно до 100 г/л.

55. Среда по п.54, где общая концентрация источника углерода составляет приблизительно от 25 г/л и приблизительно до 80 г/л.

56. Среда по п.55, где общая концентрация источника углерода составляет

приблизительно 50 г/л.

57. Среда по любому из пп. 23-56, где среда дополнительно содержит бикарбонат натрия.

58. Среда по п.57, где среда содержит концентрацию бикарбоната натрия приблизительно от 0,1 г/л и приблизительно до 20 г/л.

59. Среда по п.58, где концентрация бикарбоната натрия составляет приблизительно от 0,5 г/л и приблизительно до 1,0 г/л.

60. Среда по п.59, где концентрация бикарбоната натрия составляет приблизительно 0,84 г/л.

61. Среда по любому из пп. 23-60, где среда дополнительно содержит экстракт дрожжей.

62. Среда по п.61, где экстракт дрожжей выбран из группы, состоящей из дрожжевого аутолизата, ультрафильтрованного экстракта дрожжей или синтетического экстракта дрожжей.

63. Среда по п.62, где экстракт дрожжей представляет собой ультрафильтрованный экстракт дрожжей.

64. Среда по п.63, где ультрафильтрованный экстракт дрожжей представляет собой AMBERFERM 5902 (Sensient Technologies Corp.), BD DIFCO (BD Biosciences), HYPER YE (Kerry Group Services Ltd.), ULTRAPEP YE (Kerry Group Services Ltd.), HY-YEST 412 (Kerry Group Services Ltd.), HY-YEST 441 (Kerry Group Services Ltd.), HY-YEST 444 (Kerry Group Services Ltd.), HY-YEST 455 (Kerry Group Services Ltd.), или HY-YEST 504 (Kerry Group Services Ltd.).

65. Среда по любому из пп. 61-64, где концентрация экстракта дрожжей составляет приблизительно от 1 г/л до приблизительно 50 г/л.

66. Среда по п.65, где концентрация экстракта дрожжей составляет приблизительно от 5 г/л до приблизительно 25 г/л.

67. Среда по п.66, где концентрация экстракта дрожжей составляет приблизительно 10 г/л.

68. Среда по любому из пп.23-67, где среда содержит, по меньшей мере, приблизительно 50 мМ аминокислот, калиевую соль, источник углерода, и необязательно, экстракт дрожжей.

69. Среда по п.68, где среда содержит, по меньшей мере, приблизительно 50 мМ аминокислот, приблизительно от 5,0 мМ и приблизительно до 15,0 мМ глицина, приблизительно от 0,2 г/л и приблизительно до 1,25 г/л калиевой соли, приблизительно от 25 г/л и приблизительно до 80 г/л источника углерода, и приблизительно от 5 г/л до приблизительно 25 г/л экстракта дрожжей.

70. Среда по п.69, где среда содержит, по меньшей мере, приблизительно 60 мМ аминокислот, приблизительно 7,5 мМ глицина, приблизительно 0,9 г/л хлорида калия, 50 г/л глюкозы, и приблизительно до 10 г/л ультрафильтрованного экстракта дрожжей.

71. Способ культивирования бактерий, производящих полисахариды, включающий а) добавление среды по любому из пп. 1-70 в биореактор, б) засев среды бактериями, производящими полисахариды, и с) культивирование бактерий путем ферментации, где указанное культивирование включает добавление питательного вещества с постоянной скоростью к среде.

72. Способ культивирования по п.71, где питательное вещество представляет собой источник углерода.

73. Способ культивирования по п.72, где источник углерода представляет собой глюкозу.

74. Способ культивирования по любому из пп. 71-73, где культивированные бактерии имеют плотность клеток, по меньшей мере, 9,0.

75. Способ культивирования по любому из пп. 71-74, где культивированные бактерии имеют концентрацию полисахарида, по меньшей мере, приблизительно 250 мг/л.
76. Способ культивирования по любому из пп. 71-75, где бактерии, производящие полисахариды, выбраны из группы, состоящей из *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*.
77. Способ культивирования бактерий, производящих полисахариды, включающий а) добавление среды по любому из пп. 1-70 в биореактор, б) засев среды бактериями, производящими полисахариды, и с) культивирование бактерий путем перфузии, где культивирование включает (i) удаление использованной среды из культуры, (ii) добавление свежей среды, и (iii) сохранение бактерий.
78. Способ культивирования по п.77, где скорость перфузии составляет приблизительно от 0,07 VVN до приблизительно 2,00 VVN.
79. Способ культивирования по п.78, где скорость перфузии составляет приблизительно от 0,67 VVN до приблизительно 1,33 VVN.
80. Способ культивирования по п.79, где скорость перфузии составляет приблизительно 1,20 VVN.
81. Способ культивирования по п.77, где скорость перфузии варьирует.
82. Способ культивирования по п.81, где перфузия начинается с первой скоростью, и скорость повышается до второй скорости.
83. Способ культивирования по п.81, где перфузия начинается с первой скоростью, и скорость снижается до второй скорости.
84. Способ культивирования по любому из пп. 77-83, где длительность перфузии составляет приблизительно от 1 часа и приблизительно до 15 часов.
85. Способ культивирования по п.84, где длительность перфузии составляет приблизительно от 1 часа и приблизительно до 10 часов.
86. Способ культивирования по п.85, где длительность перфузии составляет приблизительно 7 часов.
87. Способ культивирования по любому из пп. 77-86, где рост клеток культивированных бактерий, по меньшей мере, в два раза больше, чем рост клеток в системе с периодической ферментацией.
88. Способ культивирования по любому из п.77-87, где культивированные бактерии достигают плотности клеток, по меньшей мере, 20,0.
89. Способ культивирования по любому из пп.77-88, где культивированные бактерии достигают концентрации полисахарида, по меньшей мере, приблизительно 600 мг/л.
90. Способ культивирования по любому из пп. 77-89, где, бактерии, производящие полисахариды, выбраны из группы, состоящей из *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*.