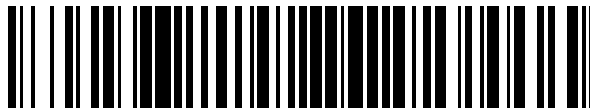


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 535**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2018 PCT/IN2018/050235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2018 WO18193475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2018 E 18773868 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2022 EP 3612553**

54 Título: **Método mejorado para la producción de alto nivel de CRM**

30 Prioridad:

**22.04.2017 IN 201741014335**

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

**26.10.2022**

73 Titular/es:

**BIOLOGICAL E LIMITED (100.0%)  
18/1 & 3 Azamabad  
Telangana, Hyderabad 500020, IN**

72 Inventor/es:

**MASILAMANI, BALAMURALI;  
SRIRAMAN, RAJAN;  
DIXIT, MANDAR SHIRISH;  
CHAKKA, DEVIPRASANNA;  
SUREDDI, SATYAM NAIDU;  
MATUR, RAMESH VENKAT;  
MANTENA, NARENDER DEV y  
DATLA, MAHIMA**

74 Agente/Representante:

**BERTRÁN VALLS, Silvia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 926 535 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método mejorado para la producción de alto nivel de CRM

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub> con alto rendimiento usando una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub>.

10

**Antecedentes de la invención**

CRM<sub>197</sub> es una forma genéticamente detoxificada de la toxina diftérica. Una sola mutación en la posición 52, que sustituye la glicina por ácido glutámico, provoca la pérdida de la actividad ADP-ribosiltransferasa de la toxina nativa. Se ha esclarecido la base estructural de CRM<sub>197</sub> para la falta de toxicidad y se usa ampliamente como proteína portadora para vacunas conjugadas. CRM<sub>197</sub>, al igual que la toxina diftérica, es una sola cadena polipeptídica de 535 aminoácidos (58,4 KD) que consiste en dos subunidades (unidas por puentes disulfuro).

15

CRM<sub>197</sub> se usa como proteína portadora en varias vacunas conjugadas aprobadas, como el conjugado de *Haemophilus influenza* tipo b comercializado con el nombre comercial Hibtiter TM, el conjugado de polisacárido neumocócico de 13 valencias comercializado con el nombre comercial PREVNAR 13® y similares.

20

Ruth M. Drew *et al.*, Bacteriol. noviembre de 1951; 62 (5): 549-59; divulgaron un medio definido químicamente adecuado para la producción de toxina diftérica de alto título y resumió los requisitos de aminoácidos de *Corynebacterium diphtheriae*, cepa de Toronto de Park-Williams n.º 8. Los medios contienen aminoácidos que reemplazan eficazmente el componente derivado de animales, es decir, hidrolizado de caseína. Los aminoácidos incluyen ácido glutámico, cistina, prolina, triptófano, leucina, valina, metionina y glicina.

25

Rappuoli *et al.*; Applied and Environmental Microbiology 1983 vol. 46(3):560-564 han divulgado que los lisógenos dobles no dispuestos en tándem eran estables y capaces de proporcionar altos rendimientos de CRM<sub>197</sub>, hasta tres veces superiores que los monolisógenos.

30

R Fass. *et al.*, Applied Microbiology and Biotechnology; abril de 1995, volumen 43(1): 83-88; divulgaron un enfoque de crecimiento de alta densidad para producir toxina diftérica mutada a partir de dos cepas de *Corynebacterium diphtheriae*: C7 (β) (tox-201, tox-9) y C7 (β)(tox-107). El procedimiento implicó el uso de un medio de crecimiento sin retirada de hierro modificado que proporcionó un crecimiento rápido y de alta densidad de las bacterias y que, cuando se asoció con el agotamiento simultáneo de glucosa y hierro, potenció la producción de toxinas. Se suministró aire enriquecido con oxígeno para permitir que las bacterias crecieran hasta una densidad celular que daba una absorbancia de 70 a 600 nm (15-20 g/l de peso seco). La concentración máxima de toxina en el sobrenadante de cultivo fue de 150 mg/l.

35

40

Parag P. Nagarkar *et al.*, Journal of Applied Microbiology 2002, 92, 215-220; divulgaron el patrón de utilización de aminoácidos durante el crecimiento de *Corynebacterium diphtheriae* y mostraron que solo cuatro de los nueve aminoácidos sometidos a prueba, concretamente cistina, histidina, aspartato y metionina, eran críticos para el crecimiento y la producción de toxinas por parte de *Corynebacterium diphtheriae*.

45

La patente europea n.º 1 849 860 B1 divulgó el uso de material proteico de origen no animal, tales como proteínas de soja, semillas de algodón, patatas, etc., como medio constituyente para el cultivo de bacterias patógenas.

50

La patente estadounidense n.º 6.962.803 B2 divulgó un método de purificación de la toxina diftérica mediante la fermentación de una cepa de microorganismo capaz de producir la toxina diftérica, comprendiendo dicho método añadir glucosa a un cultivo en crecimiento, mediante lo cual la adición de glucosa mantiene el crecimiento del microorganismo eficaz para soportar la producción de toxina diftérica. Además, divulgó que además de una fuente de carbono, existen otros requisitos nutricionales mínimos para el crecimiento que incluyen oligoelementos metálicos, fosfato, una fuente de nitrógeno, generalmente casaminoácidos y extracto de levadura.

55

La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2011/0097359 A1 divulgó un medio para poner en cultivo una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* para producir un nivel de toxina diftérica o un análogo de la misma, en el que el medio está sustancialmente libre de productos derivados de animales y comprende: agua; una fuente de hidratos de carbono; una fuente de nitrógeno; y varios aminoácidos libres en una concentración inicial en la que la concentración inicial de cada aminoácido libre no limita el nivel de producción de la toxina diftérica o el análogo de la misma. Divulgó adicionalmente que la fuente de hidratos de carbono está libre de glucosa.

60

El documento WO 2006/100108 A1 divulgó un procedimiento de fermentación que comprendía una etapa de hacer crecer una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* en un medio dentro del fermentador en condiciones de agitación suficientes para mantener un cultivo homogéneo y aireación limitada, de manera que la pO<sub>2</sub> dentro del cultivo caiga a

65

menos del 4% durante la mayor parte de la etapa de fermentación. Se divulgó adicionalmente que el pH dentro del fermentador se mantuvo entre 7,0 y 7,8 por el grado de aireación sin requerir la adición de ácido o base.

5 El procedimiento de CRM<sub>197</sub> generalmente es sensible a pequeños cambios en los componentes del procedimiento, así como en los parámetros del procedimiento. La producción de CRM<sub>197</sub> por parte de *Corynebacterium diphtheriae* se pone en práctica en todo el mundo, aunque con un éxito limitado para la realización comercial. Ninguna de las referencias anteriores divulgó un método de producción de CRM<sub>197</sub> con altos rendimientos tales como > 150 mg/l usando una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería. Los inventores de la presente invención han desarrollado un modelo de flujo metabólico para la producción de alto rendimiento de CRM<sub>197</sub> usando una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería.

### Objetivo de la invención

15 El principal objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la producción de alto nivel de CRM<sub>197</sub>.

Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la producción de alto nivel de CRM<sub>197</sub> que sea rentable y pueda usarse para fabricar vacunas conjugadas.

### 20 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub> con alto rendimiento usando una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub>, en el que el método comprende hacer crecer la cepa en un medio de fermentación que comprende uno o más aminoácidos y está libre de componentes derivados de animales.

La presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos y complementar el medio con nutrientes.

La presente invención también proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos y complementar el medio con nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico.

### Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1- Construcción de un plásmido designado como pBE33

Figura 2- El diagrama de flujo del modelo de balance de flujo metabólico.

### Descripción detallada de la invención

45 La presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub> con alto rendimiento usando una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub>, en el que el método comprende hacer crecer la cepa en un medio de fermentación que comprende más de 10 aminoácidos y está libre de componentes derivados de animales.

50 La cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería (C7Ep) de la presente invención se refiere a *Corynebacterium diphtheriae* que tiene múltiples copias situadas de manera episómica del gen de CRM<sub>197</sub> reguladas por el mismo mecanismo que el gen de CRM<sub>197</sub> huésped y el contexto genético de dicha cepa es lisógeno simple.

55 Los aminoácidos usados en la presente invención se seleccionan de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales y cada aminoácido se usa en una cantidad de aproximadamente 0,05 a 2 g/l.

60 Se ha estudiado el efecto de los aminoácidos, las vitaminas y las condiciones del procedimiento para la producción de CRM<sub>197</sub>. Se ha encontrado que determinados aminoácidos han mostrado un efecto negativo sobre el crecimiento de bacterias. Sin embargo, se encuentra que la producción de CRM<sub>197</sub> aumenta si se usan más de 10 aminoácidos en una concentración óptima. La concentración de aminoácidos se optimiza usando el diseño de experimentos de Plackett Burman.

65 Los diseños de Plackett Burman son diseños experimentales para investigar la dependencia de alguna cantidad medida en un número de variables independientes (factores), de tal manera que se minimice la varianza de las

estimaciones de estas dependencias usando un número limitado de experimentos. El resultado mostró que aminoácidos tales como ácido aspártico, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, valina y a una temperatura de 35 a 36°C tienen un impacto positivo en la síntesis de CRM<sub>197</sub> y que aminoácidos tales como alanina, isoleucina y a temperatura de 35 a 36°C tienen efecto negativo en la síntesis de CRM<sub>197</sub>. Se llevaron a cabo varios niveles de diseño de experimentos a diferentes concentraciones para lograr una producción de alto nivel de CRM<sub>197</sub>. El uso de tirosina y asparagina dio como resultado una disminución en el rendimiento total de CRM<sub>197</sub> y por tanto estos aminoácidos no forman parte de la invención.

En una realización preferida de la presente invención, el medio de fermentación contiene una combinación de fenilalanina, arginina y uno o más de otros aminoácidos, en el que la cantidad de fenilalanina y arginina usada es aproximadamente menor de aproximadamente 1 g/l.

En una realización más preferida de la presente invención, el medio de fermentación comprende una combinación de fenilalanina, arginina y uno o más de otros aminoácidos, en el que la cantidad de fenilalanina es de aproximadamente 0,25 a 0,75g/l y la de arginina es de aproximadamente 0,1 a 0,5 g/l.

La presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub> usando una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub>, en el que el método comprende hacer crecer la cepa en un medio de fermentación que comprende más de 10 aminoácidos, complementar el medio con vitaminas en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 20 mg por litro, en el que el medio está libre de componentes derivados de animales.

En otra realización de la presente invención, se añaden aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y similares como nutrientes al medio de fermentación durante el cultivo.

Diversos nutrientes usados en la presente invención como aportes complementarios incluyen vitaminas seleccionadas de ácido nicotínico, tiamina, ácido pantoténico, biotina, riboflavina, ácido fólico; ácido pimélico; fosfato, una fuente de nitrógeno y oligoelementos metálicos y similares y cada vitamina se usa en una cantidad en el intervalo de desde aproximadamente 0,05 hasta 20 mg por litro.

El medio de fermentación usado en la presente invención es un medio sin retirada de hierro y completamente libre de componentes derivados de animales. Además, el medio también está desprovisto de medios de Loeffler basados en carne tradicionales y medios YC bajos en hierro, sin retirada de hierro, basados en casaminoácidos. Los componentes del medio de fermentación de la presente invención comprenden extracto de levadura, peptona vegetal, dihidrógenofosfato de potasio (KH<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), triptófano, glucosa, solución salina YC traza.

En otra realización de la presente invención, la composición del medio para el cultivo de una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> comprende medio de fermentación de base que comprende extracto de levadura, peptona vegetal, dihidrógenofosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), triptófano, glucosa, solución salina YC traza; uno o más aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y similares.

Los oligoelementos metálicos adecuados incluyen potasio, magnesio, calcio, cloruro, colina, cobre, manganeso, sulfato, cinc y similares.

La presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub> usando una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub>, en el que el método comprende complementar el medio de fermentación con nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico.

El modelo de flujo metabólico se refiere a la red completa de transferencia de calor, transferencia de masa, tasa de transferencia de oxígeno (OTR), tasa de captación de oxígeno (OUR) y cinética de transferencia de iones en la que la OTR se mantiene mediante agitación, contrapresión y bombeo de oxígeno puro. Este modelo se representa en la figura 2.

#### Desarrollo del modelo de flujo metabólico.

Este modelo se crea partiendo de la base de la interpretación de datos en línea de acumulaciones de iones de hidrógeno en el procedimiento como variable principal, seguido por el oxígeno disuelto, la conversión de oxígeno en CO<sub>2</sub> junto con el calor liberado en el procedimiento. Por ejemplo, el modelo funciona en las condiciones de limitación de la fuente de carbono. La fuente de carbono es pulsada y la respuesta se evalúa en el procedimiento. La acción correctora se emprendió sobre la generación de iones de hidrógeno basándose en la respuesta. Entonces se optimizó la alimentación para obtener un pH y un oxígeno disuelto (OD) constantes y una tasa de transferencia de calor (por ejemplo, pH de 7,4; OD residual > 2 a 20; tasa de transferencia de calor HTR).

En una realización de la presente invención, el método comprende complementar el medio con glucosa durante todo el procedimiento de fermentación.

La presente invención no implica el uso de maltosa como fuente de carbono y una etapa de retirada de hierro.

CRM<sub>197</sub> producida según la presente invención puede usarse para fabricar vacunas conjugadas tales como conjugadas neumocócicas, conjugadas contra la fiebre tifoidea, conjugadas contra Hib y similares.

Aún en otra realización, la presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos y complementar el medio con nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico, en el que los aminoácidos se seleccionan de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales.

Aún en otra realización, la presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos, en el que cada aminoácido se usa en una cantidad de aproximadamente 0,05 a 2 g/l.

Aún en otra realización, la presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos y complementar el medio con nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico, en el que cada aminoácido se usa en una cantidad de aproximadamente 0,05 a 2 g/l.

Aún en otra realización, la presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende medios de base, más de 10 aminoácidos y complementar el medio con nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico, en el que cada aminoácido se usa en una cantidad de aproximadamente 0,05 a 2 g/l.

Aún en otra realización, la presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos y complementar el medio con nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico, en el que los aminoácidos se seleccionan de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales, en el que cada aminoácido se usa en una cantidad de aproximadamente 0,05 a 2 g/l.

Aún en otra realización, la presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos, en el que los aminoácidos se seleccionan de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales, en el que cada aminoácido se usa en una cantidad de aproximadamente 0,05 a 2 g/l.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende

i) poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende medios de base y más de 10 aminoácidos seleccionados de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales y

ii) complementar el medio con glucosa y nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico.

Aún en otra realización, durante el procedimiento de fermentación, la temperatura se mantiene en el intervalo de desde 30 hasta 40°C y el pH se mantiene a de 7,0 a 8,0, preferiblemente de 7,4 a 7,6 usando ácido ortofosfórico al 20%, hidróxido de amonio al 12,5%. El procedimiento de fermentación se lleva a cabo durante un periodo de 15 a 24 horas, preferiblemente de 16 a 20 horas.

En una realización, la presente invención proporciona una composición y un procedimiento de fermentación que están desprovistos de tirosina y asparagina. En una realización, el procedimiento de la presente invención está desprovisto de medios YC bajos en hierro, sin retirada de hierro, basados en casaminoácidos, maltosa como fuente de carbono y una etapa de retirada de hierro.

La presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y contiene una combinación de fenilalanina, arginina en una cantidad de aproximadamente menor de 1 g/l y uno o más de otros aminoácidos.

En una realización, la presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos y complementar el medio con nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico, en el que el rendimiento de CRM<sub>197</sub> obtenido es mayor de 150 mg/l.

En una realización, la presente invención permite obtener una vacuna conjugada que comprende conjugar polisacáridos de *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, meningococos, *Haemophilus influenzae* con CRM<sub>197</sub> preparada según la presente invención.

La presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub> con alto rendimiento usando una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub>, en el que el método comprende hacer crecer la cepa en medios libres de componentes derivados de animales que comprenden más de 10 aminoácidos y complementar el medio con nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico.

En una realización, la presente invención proporciona un método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub> con rendimientos tales como 150 mg/l, 200 mg/l, 300 mg/l, 500 mg/l, 1 g/l, 1,5 g/l, 2 g/l, 2,5 g/l, 3 g/l, 3,5 g/l, 4 g/l, 4,5 g/l y 5 g/l.

En una realización, la presente invención proporciona una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería C7 ( $\beta$  197) en la que puede transferirse el plásmido pBE33 mediante electroporación.

La CRM<sub>197</sub> producida según la presente invención se ha cuantificado con el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de inmunocaptura (IC-ELISA).

Desarrollo de la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un plásmido de vector de expresión.

En *Corynebacterium diphtheriae* C7 ( $\beta$ -197) ATCC 53821, el gen que codifica para CRM<sub>197</sub> existe como copia única y la proteína CRM mutante<sub>197</sub> se secreta en los medios de cultivo bajo regulación de hierro. El rendimiento de CRM<sub>197</sub> se triplica en la cepa C7 de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene dos copias del corinefago-beta (ATCC 39255). Esto sugiere que el número de copias del gen está relacionado con una mayor productividad. Para hacer que la producción de CRM<sub>197</sub> a partir de *Corynebacterium diphtheriae* sea comercialmente viable se desea aumentar el nivel de expresión. Integrar un mayor número de copias en el genoma bacteriano supone un desafío técnico. Los integrantes de fago de copias múltiples son genéticamente inestables y pierden las copias adicionales del gen de CRM. Los presentes inventores intentaron mejorar los niveles de expresión de CRM<sub>197</sub> aumentando las copias del gen de CRM<sub>197</sub> suministrado en plásmidos que tienen un marcador de selección con antibióticos, junto con los elementos reguladores nativos de CRM<sub>197</sub>. Por consiguiente, los inventores han desarrollado una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> y han evaluado la estabilidad de la cepa. La cepa modificada tenía niveles más altos de expresión de CRM<sub>197</sub> en comparación con cepas de *Corynebacterium* no modificadas.

La presente invención se ilustra más específicamente con referencia a los ejemplos facilitados a continuación. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no está limitada por un ejemplo en modo alguno, sino que incluye variaciones del mismo dentro de los parámetros descritos en el presente documento, tal como conocerán los expertos en la técnica.

#### Ejemplo 1

##### Mejora de la expresión de CRM<sub>197</sub> mediante copia episómica de CRM<sub>197</sub>:

Se preparó un vector que puede replicarse de manera estable en *Corynebacterium diphtheriae* C7 ( $\beta$  197). Se llevó a cabo el aislamiento del plásmido nativo a partir de *Corynebacterium diphtheriae* C7 usando un protocolo de aislamiento de plásmidos grandes tal como se describe en T. C. Currier *et al.*, Anal Biochem. 1976; 76(2): 431441. Usando la preparación de ADN de plásmido nativo, se amplificó el origen de replicación (oriR) de 1,87 Kb. Simultáneamente, se

amplificó la secuencia de kanR de 1,033 Kb usando ADN molde de pUC4-KIXX y se realizó unión de extremos romos a oriR para generar pBE30. Además, se amplificó una secuencia génica de 2,13 Kb de CRM<sub>197</sub> que comprendía la región promotora pTox (Boyd *et al.*, 1988), cru y la secuencia terminadora predicha a partir del ADN genómico de *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197) y se clonó en el sitio de restricción SpeI único diseñado en pBE30. La mutación GAG en este amplicón se verificó mediante un ensayo de PCR específico de alelo (Pushnova *et al.*, Analytical Biochemistry. 1998; 260: 24 a 29) y secuenciación de ADN. El plásmido así obtenido se denominó pBE33 (figura 1).

El plásmido pBE33 se transfirió mediante electroporación siguiendo los procedimientos optimizados para *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β197). Las colonias transformadas de *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197) (pBE33) se confirmaron mediante PCR de colonias específicas y aislamiento de plásmido y digestión de restricción. La expresión de CRM<sub>197</sub> en las colonias se analizó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western. Se cuantificó la CRM<sub>197</sub> en los medios mediante ELISA y HPLC y se presentaron como concentración de CRM<sub>197</sub> expresada por litro de los medios de cultivo.

## Ejemplo 2

### Producción de CRM<sub>197</sub> con cepa C7Ep de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería en medio de base libre de componentes derivados de animales.

Para este procedimiento se usó la cepa C7Ep de *Corynebacterium diphtheriae*. Se siguió un cultivo en dos etapas para la preparación del inóculo en un matraz con agitación. Los medios para el cultivo en el matraz con agitación comprenden extracto de levadura (YE) 10 g/l, peptona vegetal 15 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 g/l, triptófano 50 mg/l, glucosa 4,0 g/l, ácido nicotínico 0,8 mg/l, ácido pimélico 0,08 mg/l, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 25 mg/l, ZnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 12,5 mg/l, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 6,25 mg/l, cistina 0,5 g/l, kanamicina 25 mg/l, glucosa 4,0 g/l.

A un medio de fermentador de 20 l, se le añadió un inóculo al 5% para iniciar el procedimiento. El medio para el cultivo del fermentador comprende YE 15 g/l, peptona vegetal 30 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3g/l, triptófano 50 mg/l, ácido nicotínico 0,8 mg/l, ácido pimélico 0,08 mg/l, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 25 mg/l, ZnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 12,5 mg/l, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 6,25 mg/l, cistina 0,5 g/l, kanamicina 25 mg/l, glucosa 4,0 g/l.

Se agitó el cultivo a 300 RPM en todo el lote. La temperatura se mantuvo a 35°C y el pH se mantuvo a 7,4 usando ácido ortofosfórico al 20% ácido y NaOH 5 N. El cultivo se aireó usando 1,0 wm de aire. El cultivo se enriqueció con oxígeno para mantener el nivel de oxígeno disuelto (OD) al 20%. Después de las primeras horas, los niveles de OD siguen cayendo por debajo del 20% cuando se alcanza el límite de enriquecimiento de O<sub>2</sub>. El nivel de OD para el resto del lote se mantiene cercano a cero con un aumento hacia las últimas horas. Cuando la glucosa residual en el caldo cae por debajo de 0,5 g/l, se alimenta glucosa al 40% con 2 g/l/h. El lote se recogió después de 14 horas de cultivo cuando las densidades celulares alcanzaron aproximadamente 90 unidades de DO a 600 nm. La espuma en el reactor se controló con antiespumante orgánico al 30%. La producción de CRM<sub>197</sub> se alcanzó a un título de 60 a 65 mg/l de caldo de fermentación.

Una fermentación realizada en condiciones similares usando CRM<sub>197</sub> de la cepa C7 de *Corynebacterium diphtheriae* produjo aproximadamente de 35 a 40 mg/l de CRM<sub>197</sub> que es menor que la cepa modificada por ingeniería. Esto muestra la influencia de las copias extra del gen hacia una producción aumentada de CRM<sub>197</sub>.

## Ejemplo 3:

### Producción de CRM<sub>197</sub> con la cepa C7Ep de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería en medios de base libres de componentes derivados de animales siguiendo el modelo de balance de flujo metabólico.

Para este procedimiento se usó la cepa C7Ep de *Corynebacterium diphtheriae*. Se siguió un cultivo de dos etapas para la preparación del inóculo en un matraz con agitación. Los medios para el cultivo en el matraz con agitación comprenden YE 10 g/l, peptona vegetal 15 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 g/l, triptófano 50 mg/l, glucosa 4,0 g/l, ácido nicotínico 0,8 mg/l, ácido pimélico 0,08 mg/l, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 25 mg/l, ZnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 12,5 mg/l, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 6,25 mg/l, cistina 0,5 g/l, kanamicina 25 mg/l, glucosa 4,0 g/l.

A un medio de fermentador de 20 l, se le añadió un inóculo al 5% para iniciar el procedimiento. El medio para el cultivo del fermentador comprende YE 15 g/l, peptona vegetal 30 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 g/l, triptófano 50 mg/l, ácido nicotínico 0,8 mg/l, ácido pimélico 0,08 mg/l, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 25 mg/l, ZnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 12,5 mg/l, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 6,25 mg/l, cistina 0,5 g/l, kanamicina 25 mg/l, glucosa 4,0 g/l.

Se agitó el cultivo a 300 RPM en todo el lote. La temperatura se mantuvo a 35°C y el pH se mantuvo a 7,4 usando ácido ortofosfórico al 20% e hidróxido de amonio al 12,5%. El cultivo se aireó usando 1,0 wm de aire. El cultivo se enriqueció con oxígeno para mantener el nivel de OD al 20%. Se introdujo un modelo que sigue la tasa metabólica de conversión en un momento dado, este modelo toma la entrada del parámetro en línea de OD residual en correspondencia con los cambios con respecto al pH, el CO<sub>2</sub> y la generación de calor. En fase logarítmica, los niveles de OD siguen cayendo por debajo del 20% pese a que se ha alcanzado el límite de enriquecimiento de O<sub>2</sub>. El nivel de

OD para el resto del lote se mantiene cercano a cero con un aumento hacia las últimas horas. Cuando la glucosa residual en el caldo cae por debajo de 0,5 g/l, se alimenta glucosa al 40% para justificar el modelo de flujo metabólico. El lote se recogió después de 14 h de cultivo cuando las densidades celulares alcanzaron aproximadamente 90 unidades de DO a 600 nm. La espuma en el reactor se controló con antiespumante orgánico al 30%. La producción de CRM<sub>197</sub> se alcanzó a un título 150 mg/l de caldo de fermentación.

#### Ejemplo 4:

#### Producción de CRM<sub>197</sub> según la presente invención

Se siguió un cultivo de tres etapas para la preparación del inóculo. Las dos primeras etapas se realizaron en los matraces con agitación. El medio para el cultivo en matraz con agitación comprende YE 10 g/l, peptona vegetal 15 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 g/l, triptófano 50 mg/l, glucosa 4,0 g/l, solución salina YC traza 2 ml/l, aporte complementario de cistina 1 ml/l, kanamicina 25 mg/l, glucosa 4,0 g/l.

La composición del medio de base para el fermentador de siembra fue YE 15 g/l, peptona vegetal 30 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 g/l, triptófano 50 mg/l, ácido nicotínico 0,8 mg/l, ácido pimélico 0,08 mg/l, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 25 mg/l, ZnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 12,5 mg/l, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 6,25 mg/l, cistina 0,5 g/l, kanamicina 25 mg/l, glucosa 4,0 g/l

A continuación se facilita la composición del medio de fermentador (tabla I) y los componentes que se han diseñado siguiendo el diseño de Plackett Burmann.

Tabla I

Muestra n.º	Componentes de los medios	Cantidad	Unidades	Muestra n.º	Componentes de los medios	Cantidad	Unidades
1	Alanina	0,1	g/l	18	Valina	1	g/l
2	Arginina	0,1	g/l	19	Potasio	2	g/l
3	Ácido aspártico	0,5	g/l	20	Magnesio	1	g/l
4	Cisteína	0,5	g/l	21	Tiamina	0,1	mg/l
5	Ácido glutámico	1	g/l	22	Biotina	4	mg/l
6	Glutamina	0,1	g/l	23	Calcio	2	mg/l
7	Glicina	0,5	g/l	24	Cloruro	0,5	mg/l
8	Histidina	1	g/l	25	Colina	0,1	mg/l
9	Isoleucina	1	g/l	26	Cobre	10	mg/l
10	Leucina	0,5	g/l	27	Ácido fólico	1,6	mg/l
11	Lisina	0,1	g/l	28	Manganeso	1	mg/l
12	Metionina	1	g/l	29	Ácido nicotínico	100	mg/l
13	Fenilalanina	0,5	g/l	30	Ácido pantoténico	50	mg/l
14	Prolina	0,1	g/l	31	Ácido pimélico	20	mg/l
15	Serina	0,1	g/l	32	Riboflavina	50	mg/l
16	Treonina	0,1	g/l	33	Sulfato	20	mg/l
17	Triptófano	0,1	g/l	34	Cinc	7	mg/l

A un fermentador de 20 l con los componentes anteriores con el medio de base (YE 15 g/l, peptona vegetal 30 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 g/l, triptófano 50 mg/l, ácido nicotínico 0,8 mg/l, ácido pimélico 0,08 mg/l, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 25 mg/l, ZnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 12,5 mg/l, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 6,25 mg/l, cistina 0,5 g/l, kanamicina 25 mg/l, glucosa 4,0 g/l.), se añadió un inóculo al 5% del fermentador de siembra para iniciar el procedimiento. La temperatura se mantuvo a 35°C y el pH se mantuvo a de 7,4 a 7,6 usando ácido ortofosfórico al 20%, hidróxido de amonio al 12,5% y un modelo basado en flujo metabólico (figura 2), modulación de alimentación de glucosa y OTR. El cultivo se aireó usando 1,0 w/m de aire. El cultivo se enriqueció con oxígeno para mantener el nivel de OD al 20%. En la fase logarítmica, los niveles de OD siguen cayendo por debajo del 20% a pesar de que se haya alcanzado el enriquecimiento de O<sub>2</sub>. El nivel de OD para el resto del lote se mantiene próximo a cero con aumento hacia las últimas horas. Cuando la glucosa residual en el caldo cae por debajo de 0,5 g/l, se facilita alimentación con disolución de glucosa al 40% a 4,5 g/l/h. Se suministró de manera intermitente aporte complementario de vitaminas y oligoelementos a los siguientes niveles; ácido nicotínico 6,425 mg/l, ácido pimélico 0,465 mg/l, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 25 mg/l, ZnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 12,5 mg/l, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 6,25 g/l, tiamina 0,08 mg/l, ácido pantoténico 0,25 mg/l, biotina 0,006 mg/l, riboflavina 0,3 mg/l, ácido fólico 0,06 mg/l. El lote se recogió después de 18 h de cultivo cuando las densidades celulares alcanzaron aproximadamente 132 unidades de OD a 600nm. La espuma en el reactor se controló con antiespumante orgánico al 30%. La producción de CRM<sub>197</sub> alcanzó un título de 450 to 500 mg/l de caldo de fermentación.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub> con alto rendimiento usando una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub>, en el que el método comprende hacer crecer la cepa en un medio de fermentación sin retirada de hierro que comprende más de 10 aminoácidos distintos de tirosina y asparagina y que está libre de componentes derivados de animales, en el que no se usa maltosa como fuente de carbono.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende complementar el medio con nutrientes.
3. Método según la reivindicación 2, en el que complementar con nutrientes se basa en el modelo de flujo metabólico.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, en el que los aminoácidos se seleccionan de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que cada aminoácido se usa en una cantidad de 0,05 a 2 g/l.
6. Método según la reivindicación 1, en el que el medio de fermentación contiene una combinación de fenilalanina, arginina y otros aminoácidos en el que la cantidad de fenilalanina y arginina es menor de 1 g/l.
- 25 7. Método según la reivindicación 2, en el que los nutrientes se seleccionan de vitaminas tales como ácido nicotínico, tiamina, ácido pantoténico, biotina, riboflavina, ácido fólico; ácido pimélico; fosfato, una fuente de nitrógeno y oligoelementos metálicos.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de fermentación está completamente libre de componentes derivados de animales.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de fermentación comprende medios de fermentación de base que comprenden extracto de levadura, peptona vegetal, dihidrógenofosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), triptófano, glucosa, solución salina YC traza.
- 35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende complementar el medio con glucosa durante todo el procedimiento de fermentación.
- 40 11. Método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, en el que el método comprende:
  - 45 i) poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación sin retirada de hierro que está libre de componentes derivados de animales y comprende medios de base y más de 10 aminoácidos seleccionados de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales y
  - ii) complementar el medio con glucosa y nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico, en el que no se usa maltosa como fuente de carbono.
- 50 12. Método mejorado para la producción de CRM<sub>197</sub>, método que comprende poner en cultivo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* modificada por ingeniería que tiene un número de copias aumentado del gen de CRM<sub>197</sub> en un medio de fermentación sin retirada de hierro que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos distintos de tirosina y asparagina y complementar el medio con nutrientes basándose en el modelo de flujo metabólico, en el que cada aminoácido se usa en una cantidad de 0,05 a 2 g/l, en el que no se usa maltosa como fuente de carbono.
- 55 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fermentación se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 y 40°C y a un pH en el intervalo de 7,0 a 8,0. preferiblemente de 7,4 a 7,6
- 60 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el rendimiento de CRM<sub>197</sub> obtenido es mayor de 150 mg/l, 200 mg/l, 300 mg/l, 500 mg/l.
15. Método para fabricar una vacuna conjugada que comprende conjugar polisacáridos de *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* con CRM<sub>197</sub> preparado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

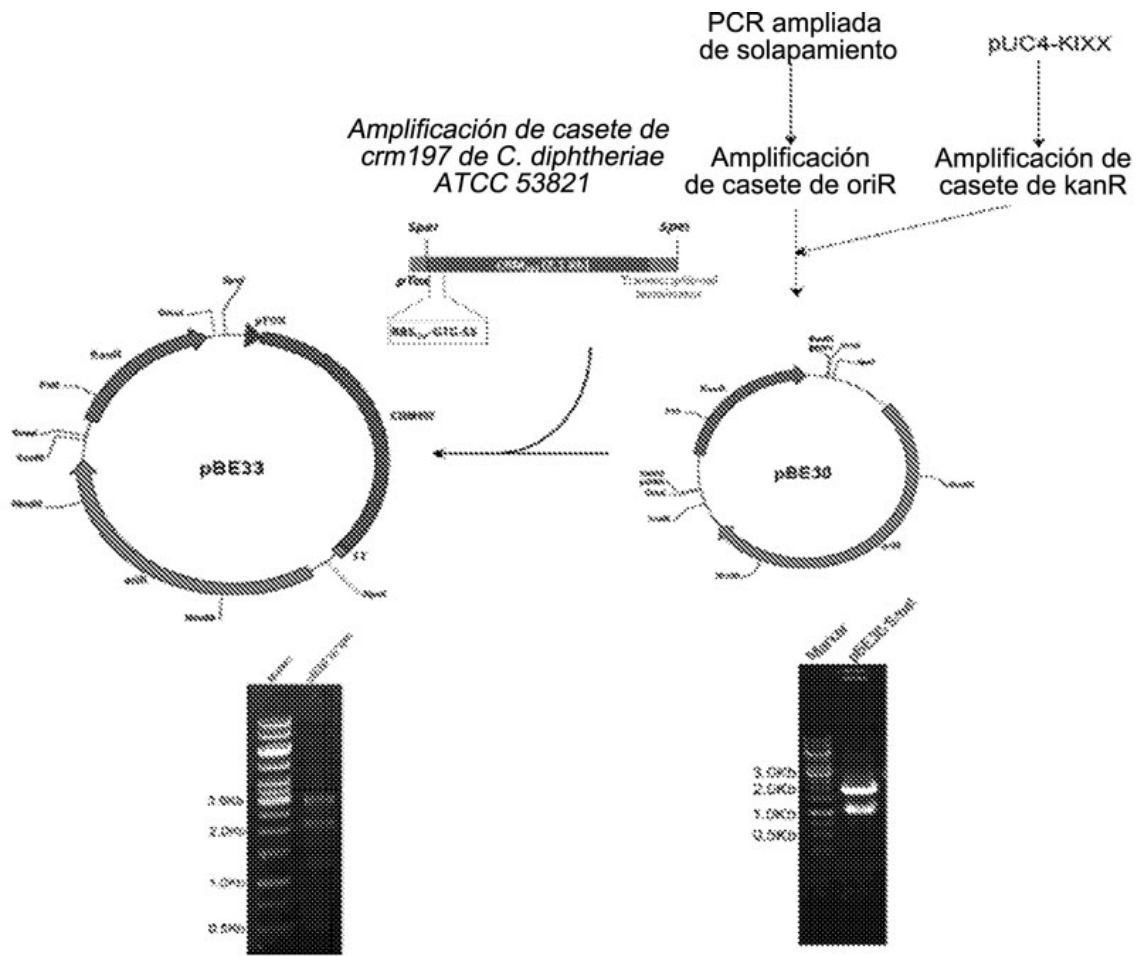


FIGURA 1

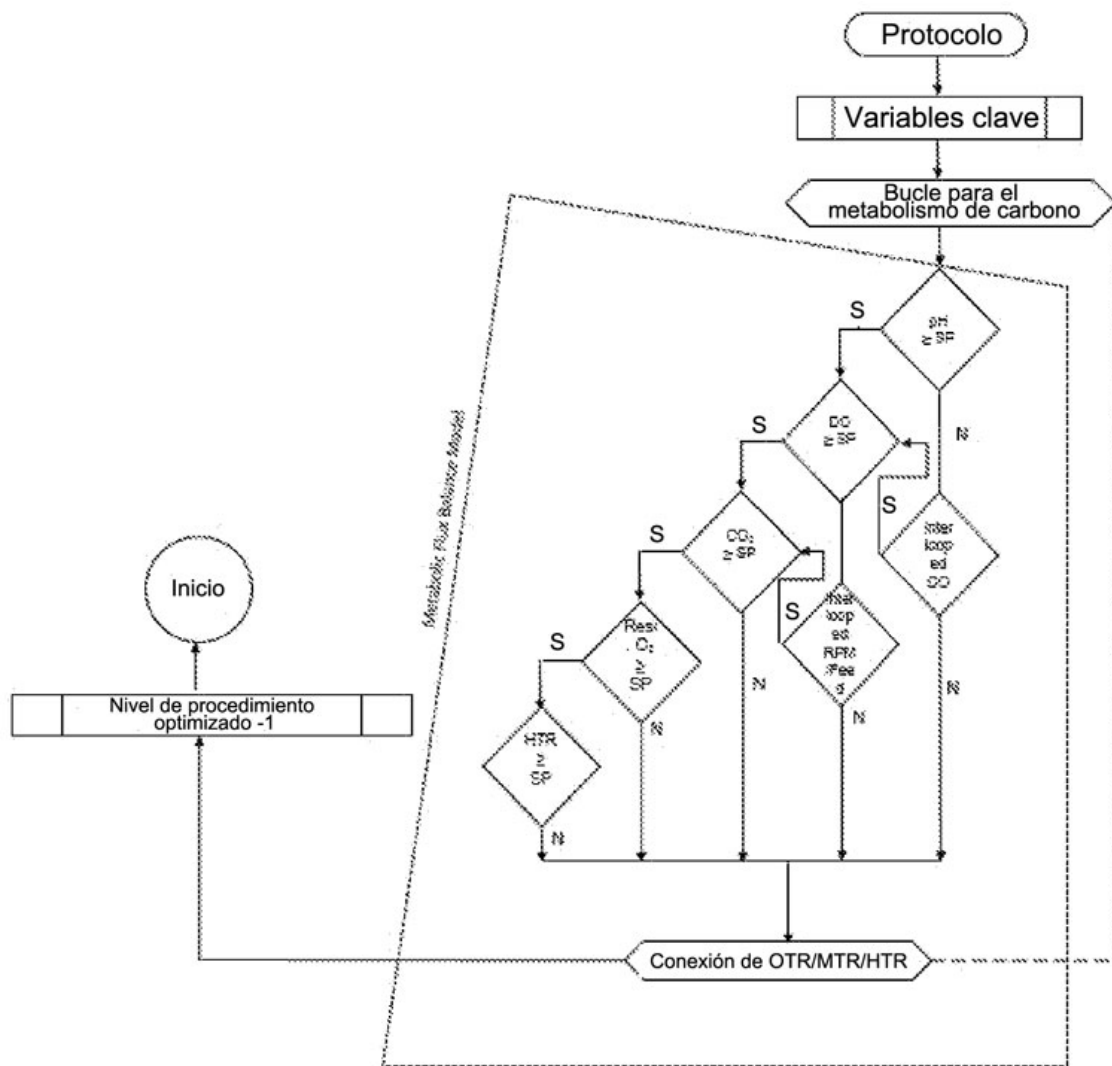


FIGURA 2