

UN MÉTODO MEJORADO PARA LA PRODUCCIÓN DE NIVEL ALTO DE CRM

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método
5 mejorado para la producción de CRM₁₉₇ con alto rendimiento
utilizando la cepa de *Corynebacterium diphtheriae*
modificada genéticamente que tiene número de copias
incrementado del gen CRM₁₉₇.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 CRM₁₉₇ es una forma genéticamente destoxificada de
la toxina diftérica. Una mutación individual en la posición
52, sustituyendo la glicina con ácido glutámico, causa la
pérdida de actividad de ADP-ribosiltransferasa de la toxina
nativa. Se han elucidado las bases estructurales para la
15 ausencia de toxicidad de CRM₁₉₇ y es ampliamente utilizada
como una proteína portadora para vacunas de conjugado.
CRM₁₉₇, al igual que la toxina diftérica, es una cadena
polipeptídica individual de 535 aminoácidos (58.4 KD) que
consta de dos subunidades (ligadas mediante puentes de
20 disulfuro).

CRM₁₉₇ se utiliza como una proteína portadora en
un número de vacunas de conjugado aprobadas tales como el
conjugado de *Haemophilus influenza* tipo b vendido bajo el
nombre comercial Hibtiter TM, el conjugado de polisacárido
25 neumocócico 13-valente vendido bajo el nombre comercial

PREVNAR 13® y similares.

Ruth M. Drew et al., *Bacteriol.* 1951 Nov; 62 (5): 549-59; describen medios químicamente definidos apropiados para la producción de títulos altos de toxina diftérica y presentan en forma resumida los requerimientos de aminoácido de *Corynebacterium diphtheriae*, cepa Toronto de Park-Williams no. 8. Los medios contienen aminoácidos que reemplazan de manera efectiva el componente derivado de animales, es decir, el hidrolizado de caseína. Los aminoácidos incluyen ácido glutámico, cistina, prolina, triptófano, leucina, valina, metionina, y glicina.

Rappuoli et al.; *Applied and Environmental Microbiology* 1983 Vol. 46(3):560-564 han descrito que los lisógenos dobles de tipo no tándem son estables y capaces de dar altos rendimientos de CRM₁₉₇, hasta tres veces más altos que los monolisógenos.

R Fass, et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*; abril 1995, Volumen 43(1): 83-88; describen una estrategia 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 implica el uso de medios de crecimiento no desferrados, modificados, que proveen crecimiento rápido y de alta densidad de las bacterias, y los cuales, cuando se asocian con el agotamiento simultáneo

de glucosa y hierro, incrementan la producción de toxina. Se suministra aire rico en oxígeno para permitir que las bacterias crezcan hasta una densidad celular que dé una absorbancia de 70 a 600 nm (15-20 g/L en peso seco). La
5 concentración máxima de toxina en el sobrenadante del cultivo es 150 mg/l.

Parag P.Nagarkar et al., *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92, 215-220; describen el patrón de utilización de aminoácido durante el crecimiento de
10 *Corynebacterium diphtheriae* y muestra que solamente cuatro de los nueve aminoácidos analizados, específicamente cistina, histidina, aspartato y metionina, son críticos para el crecimiento y producción de toxina por parte de *Corynebacterium diphtheriae*.

15 La patente europea No. 1 849 860 B1 describe el uso de material proteínico de origen no animal, tal como las proteínas de soya, semillas de algodón, papas, etc., como un constituyente de los medios para el cultivo de bacterias patógenas.

20 La patente E.U.A. No. 6,962,803 B2 describe un método para purificar toxina diftérica por medio de fermentar una cepa de microorganismo capaz de producir toxina diftérica, dicho método comprende agregar glucosa a un cultivo en crecimiento con lo cual la adición de glucosa
25 mantiene el crecimiento del microorganismo efectivo para

apoyar la producción de toxina diftérica. Esta también describe que además de una fuente de carbono, hay otros requerimientos nutricionales mínimos para el crecimiento los cuales incluyen metales traza, fosfato, una fuente de nitrógeno, por lo general casaminoácidos y extracto de levadura.

La publicación de solicitud de patente E.U.A. No. 2011/0097359 A1 describe medios para cultivar una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* para producir un nivel de toxina diftérica o un análogo de la misma, en la cual los medios están sustancialmente libres de productos derivados de animales y comprenden: agua; una fuente de carbohidrato; una fuente de nitrógeno; y un número de aminoácidos libres en una concentración inicial en la cual la concentración inicial de cada aminoácido libre no es limitante para el nivel de producción de la toxina diftérica o el análogo de la misma. También describe que la fuente de carbohidrato está libre de glucosa.

El documento WO 2006/100108 A1 describe un procedimiento de fermentación que comprende un paso de cultivar una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* en medios dentro del fermentador bajo condiciones de agitación suficientes para mantener un cultivo homogéneo y aeración limitada de modo tal que la pO₂ dentro del cultivo caiga a menos de 4% para la mayoría del paso de fermentación.

También describe que el pH dentro del fermentador se mantiene entre 7.0 y 7.8 mediante el grado de aeración sin requerir la adición de ácido o base.

El proceso de CRM₁₉₇ por lo general es sensible a
5 cambios pequeños en los componentes del proceso, así como en los parámetros del proceso. La producción de CRM₁₉₇ a partir de *Corynebacterium diphtheriae* se ejerce a través de todo el mundo, aunque con éxito limitado para la realización comercial. Ninguna de las referencias
10 anteriores describe el método para producir CRM₁₉₇ con altos rendimientos tales como >150 mg/l utilizando la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae*. Los inventores de la presente invención han desarrollado un modelo de flujo metabólico para la producción con alto rendimiento de CRM₁₉₇
15 utilizando la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae*.

Objetivo de la invención

El objetivo principal de la presente invención es proveer un proceso mejorado para la producción de nivel elevado de CRM₁₉₇.

20 Incluso otro objetivo de la presente invención es proveer un proceso mejorado para la producción de nivel elevado de CRM₁₉₇ el cual es efectivo en cuanto a costos y se puede utilizar para fabricar vacunas de conjugado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 La presente invención provee un método mejorado

para la producción de CRM₁₉₇ con alto rendimiento utilizando la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇, en el cual el método comprende cultivar la cepa en medios de fermentación que comprenden uno o más aminoácidos y están
5 libres de componentes derivados de animales.

La presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ cuyo método comprende cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene
10 el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇ en medios de fermentación que están libres de componentes derivados de animales y comprenden más de 10 aminoácidos y suplementar los medios con nutrientes.

La presente invención también provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ cuyo método comprende cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇ en medios de fermentación que están libres de componentes derivados de animales y comprenden más de 10 aminoácidos y
15 suplementar los medios con nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico.
20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 - Construcción de un plásmido designado como pBE33

25 Figura 2 - Diagrama de flujo del modelo de

balance de flujo metabólico

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ con alto rendimiento utilizando la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇, en el cual el método comprende cultivar la cepa en medios de fermentación que comprenden más de 10 aminoácidos y está libre de componentes derivados de animales.

La cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* (C7Ep) de la presente invención se refiere a *Corynebacterium diphtheriae* que tiene copias múltiples episómicamente colocadas del gen CRM₁₉₇ reguladas por el mismo mecanismo que el del gen CRM₁₉₇ hospedero y el fondo genético de dichas cepas es de lisógeno individual.

Los aminoácidos utilizados en la presente invención se seleccionan a partir 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 utiliza en una cantidad de aproximadamente 0.05 a 2 g/l.

Se ha estudiado el efecto de los aminoácidos, vitaminas y las condiciones de proceso para la producción de CRM₁₉₇. Se ha encontrado que algunos aminoácidos han

mostrado efecto negativo sobre el crecimiento de las bacterias. Sin embargo, se encontró que la producción de CRM₁₉₇ se incrementa si se utilizan más de 10 aminoácidos en una concentración óptima. La concentración de aminoácidos se optimiza utilizando el diseño de experimentos de Plackett Burman.

Los diseños de Plackett Burman son diseños experimentales para investigar la dependencia de alguna cantidad medida sobre un número de variables independientes (factores), de tal manera que se reduzca al mínimo la varianza de las estimaciones de estas dependencias utilizando un número limitado de experimentos. El resultado muestra que aminoácidos tales como ácido aspártico, glutamina, glicina isoleucina leucina, valina y a una temperatura de 35 a 36 °C tienen impacto positivo sobre la síntesis de CRM₁₉₇ y que aminoácidos tales como alanina y a temperatura de 35 a 36 °C tienen efecto negativo en la síntesis de CRM₁₉₇. Se realizan varios niveles de diseño de experimentos a concentraciones diferentes para lograr un nivel elevado de producción de CRM₁₉₇. El uso de tirosina y asparagina da como resultado un decremento en el rendimiento total de CRM₁₉₇ y por lo tanto estos aminoácidos no son parte de la invención.

En una modalidad preferida de la presente invención, los medios de fermentación contienen combinación

de fenilalanina, arginina y uno o más de otros aminoácidos en la cual la cantidad de fenilalanina y arginina utilizada es aproximadamente menos de aproximadamente 1 g/L.

En una modalidad más preferida de la presente invención, los medios de fermentación comprenden combinación de fenilalanina, arginina y uno o más de otros aminoácidos en los cuales la cantidad de fenilalanina es aproximadamente 0.25 a 0.75 g/l y de arginina es aproximadamente 0.1 a 0.5 g/l.

La presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ utilizando la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇, en el cual el método comprende cultivar la cepa en medios de fermentación que comprenden más de 10 aminoácidos, suplementar los medios con vitaminas en el intervalo de aproximadamente 0.05 a 20 mg por litro, en el cual los medios están libres de componentes derivados de animales.

En otra modalidad de la presente invención, los aminoácidos, vitaminas, elementos traza y similares se agregan como nutrientes a los medios de fermentación durante el cultivo.

Los diversos nutrientes utilizados en la presente invención como suplementos incluyen vitaminas que se seleccionan a partir de ácido nicotínico, tiamina, ácido

pantoténico, biotina, riboflavina, ácido fólico; ácido pimélico; fosfato, una fuente de nitrógeno y metales traza y similares y cada vitamina se utiliza en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.05 a 20 mg por litro.

5 Los medios de fermentación utilizados en la presente invención son no desferrados y completamente libres de componentes derivados de animales. Además, los medios también carecen de medios de Loeffler basados en carne tradicionales y medios YC bajos en hierro,
10 desferrados basados en casaminoácido. Los componentes de los medios de fermentación de la presente invención comprenden extracto de levadura, peptona vegetal, fosfato mono-potásico (KH_2PO_4), triptófano, glucosa, solución de sales traza YC.

15 En otra modalidad de la presente invención, la composición de los medios para el cultivo de la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM_{197} comprende medios de fermentación base que comprenden extracto de levadura,
20 peptona vegetal, fosfato mono-potásico (KH_2PO_4), triptófano, glucosa, solución de sales traza YC; uno o más aminoácidos, vitaminas, elementos traza y similares.

 Los metales traza apropiados incluyen potasio, magnesio, calcio, cloruro, colina, cobre, manganeso,
25 sulfato, zinc y similares.

La presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ utilizando la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇, en el cual el método comprende
5 suplementar los medios de fermentación con nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico.

El modelo de flujo metabólico se refiere a la red completa de transferencia de calor, transferencia de masa, velocidad de transferencia de oxígeno (OTR por sus siglas
10 en inglés), velocidad de consumo de oxígeno (OUR por sus siglas en inglés) y cinética de transferencia de iones en el cual la OTR se mantiene por medio de agitación, contrapresión y bombeo de oxígeno puro. Este modelo se representa en la Figura 2.

15 Desarrollo del modelo de flujo metabólico

Este modelo se crea sobre la base de la interpretación de datos en línea de las acumulaciones de iones hidrógeno en el proceso como una variable primaria lo cual es seguido por el oxígeno disuelto, conversión de
20 oxígeno a CO₂ junto con el calor liberado en el proceso. Por ejemplo, el modelo trabaja en las condiciones de la limitación de fuente de carbono. La fuente de carbono se pulsa y se evalúa la respuesta en el proceso. La acción correctiva se toma sobre la generación de iones hidrógeno
25 tomando como base la respuesta. Después, se optimiza el

material de alimentación para obtener un pH y oxígeno disuelto (DO por sus siglas en inglés) y velocidad de transferencia de calor constantes (Por ejemplo, para pH de 7.4; DO residual de > 2 a 20; velocidad de transferencia de calor HTR por sus siglas en inglés).

En una modalidad de la presente invención, el método comprende suplementar los medios con glucosa durante todo el proceso de fermentación.

La presente invención no implica el uso de maltosa como una fuente de carbono ni el paso de desferrar.

La CRM₁₉₇ producida de conformidad con la presente invención se puede utilizar para fabricar vacunas de conjugado tales como conjugado neumocócico, conjugado tifoide, conjugado de Hib y similares.

Incluso en otra modalidad, la presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ cuyo método comprende cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇ en medios de fermentación que están libres de componentes derivados de animales y comprenden más de 10 aminoácidos y suplementar los medios con nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico, en el cual los aminoácidos se seleccionan a partir de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina,

metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales.

Incluso en otra modalidad, la presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ cuyo
5 método comprende cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇ en medios de fermentación que están libres de componentes derivados de animales y comprenden más de 10 aminoácidos, en el cual cada
10 aminoácido se utiliza en una cantidad de aproximadamente 0.05 a 2 g/l.

Incluso en otra modalidad, la presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ cuyo
método comprende cultivar la cepa diseñada de
15 *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇ en medios de fermentación que están libres de componentes derivados de animales y comprenden más de 10 aminoácidos y suplementar los medios con nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico, en
20 el cual cada aminoácido se utiliza en una cantidad de aproximadamente 0.05 a 2 g/l.

Incluso en otra modalidad, la presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ cuyo
método comprende cultivar la cepa diseñada de
25 *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias

incrementado del gen *CRM₁₉₇* en medios de fermentación que están libres de componentes derivados de animales y comprenden medios base, más de 10 aminoácidos y suplementar los medios con nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico, en el cual cada aminoácido se utiliza en una cantidad de aproximadamente 0.05 a 2 g/l.

Incluso en otra modalidad, la presente invención provee un método mejorado para la producción de *CRM₁₉₇* cuyo método comprende cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen *CRM₁₉₇* en medios de fermentación que están libres de componentes derivados de animales y comprenden más de 10 aminoácidos y suplementar los medios con nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico, en el cual los aminoácidos se seleccionan a partir 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 cual cada aminoácido se utiliza en una cantidad de aproximadamente 0.05 a 2 g/l.

Incluso en otra modalidad, la presente invención provee un método mejorado para la producción de *CRM₁₉₇* cuyo método comprende cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen *CRM₁₉₇* en medios de fermentación que

están libres de componentes derivados de animales y comprenden más de 10 aminoácidos, en el cual los aminoácidos se seleccionan a partir de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, 5 fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales en el cual cada aminoácido se utiliza en una cantidad de aproximadamente 0.05 a 2 g/l.

En una modalidad preferida, la presente invención 10 provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ cuyo método comprende

i) cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇ en medios de fermentación que están libres de 15 componentes derivados de animales y comprenden medios base y más de 10 aminoácidos que se seleccionan a partir de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, 20 treonina, triptófano, valina y sus sales y

ii) suplementar los medios con glucosa y nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico.

Incluso en otra modalidad, durante el proceso de fermentación la temperatura se mantiene en el intervalo de 25 30 a 40 °C y el pH se mantiene en 7.0 a 8.0, de preferencia

7.4 a 7.6 utilizando ácido ortofosfórico al 20%, hidróxido de amonio al 12.5%. El proceso de fermentación se lleva a cabo durante un período de 15 a 24 horas, de preferencia 16 a 20 horas.

5 En una modalidad, la presente invención provee la composición y proceso de fermentación la cual está carente de tirosina y asparagina. En una modalidad, el proceso de la presente invención carece de medios YC bajos en hierro desferrados basados en casaminoácido, maltosa como una
10 fuente de carbono y del paso de desferrar.

 La presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ cuyo método comprende cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇ en medios de
15 fermentación que están libres de componentes derivados de animales y contienen combinación de fenilalanina, arginina en una cantidad de aproximadamente menos de 1 g/L y uno o más de otros aminoácidos.

 En una modalidad, la presente invención provee un
20 método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ cuyo método comprende cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇ en medios de fermentación que están libres de componentes derivados de animales y comprenden más de 10
25 aminoácidos y suplementar los medios con nutrientes basados

en el modelo de flujo metabólico, en el cual el rendimiento de CRM₁₉₇ obtenida es más de 150 mg/L.

En una modalidad, la presente invención permite elaborar una vacuna de conjugado la cual comprende conjugar
5 polisacáridos provenientes de *Salmonella typhi*,
Streptococcus pneumoniae, *meningococcus*, *Haemophilus influenzae* con CRM₁₉₇ preparada de conformidad con la presente invención.

La presente invención provee un método mejorado
10 para la producción de CRM₁₉₇ con alto rendimiento utilizando la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇, en el cual el método comprende cultivar la cepa en medios libres de componentes derivados de animales que comprenden más de 10
15 aminoácidos y suplementar los medios con nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico.

En una modalidad, la presente invención provee un método mejorado para la producción de CRM₁₉₇ con rendimientos tales como 150 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 500
20 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 modalidad, la presente invención provee una cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197) en la cual el plásmido pBE33 se transfiere mediante
25 electroporación.

La CRM₁₉₇ producida de conformidad con la presente invención se cuantifica con la prueba de inmuno-sorbente ligado a enzima con inmuno-captura (IC-ELISA por sus siglas en inglés).

5 Desarrollo de la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇ en un plásmido de vector de expresión

Corynebacterium diphtheriae C7 (β -197) ATCC 53821, el gen que codifica para CRM₁₉₇ existe como copia
10 individual y la proteína CRM₁₉₇ mutante es secretada en los medios de cultivo bajo regulación de hierro. El rendimiento de CRM₁₉₇ se incrementa tres veces en la cepa *Corynebacterium diphtheriae* C7 que tiene dos copias del corinefago-beta (ATCC 39255). Esto sugiere que el número de
15 copias del gen está vinculado con la productividad incrementada. Con el fin de hacer que la producción de CRM₁₉₇ a partir de *Corynebacterium diphtheriae* sea comercialmente viable se desea incrementar el nivel de expresión. Integrar más números de copia en el genoma
20 bacteriano es técnicamente desafiante. Los integrantes de fago multi-copias son genéticamente inestables y pierden las copias adicionales del gen CRM. Los presentes inventores pretenden mejorar los niveles de expresión de la CRM₁₉₇ incrementando las copias de gen CRM₁₉₇ suministradas
25 en plásmidos que tienen un marcador de selección de

antibiótico, junto con los elementos reguladores nativos de CRM₁₉₇. Por consiguiente, los inventores han desarrollado la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM₁₉₇, evaluado la estabilidad de la cepa. La cepa modificada tiene niveles más altos de expresión de CRM₁₉₇ en comparación con cepas de *Corynebacterium* no modificadas.

La presente invención se ilustra de manera más específica con referencia a los ejemplos dados más adelante. Sin embargo, se debe entender que la presente invención no está limitada de ninguna manera por un ejemplo, sino que incluye variaciones de los mismos dentro de los parámetros descritos en la presente invención, como es sabido por aquellos bien versados en la técnica.

15

EJEMPLO 1

Mejora de la expresión de CRM₁₉₇ mediante copia episómica de CRM₁₉₇

Se prepara un vector que se puede multiplicar de manera estable en *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197). El aislamiento del plásmido nativo proveniente de *Corynebacterium* C7 *diphtheriae* se efectúa utilizando el protocolo de aislamiento de plásmido grande como se describe en T.C Currier et al., *Anal Biochem.* 1976; 76(2): 431441. Utilizando la preparación de ADN de plásmido nativo, se amplifica el origen de replicación (*oriR*) de

25

1.87 Kb. Simultáneamente, se amplifica la secuencia *kanR* de 1.033 Kb utilizando el ADN de plantilla de pUC4-KIXX y el extremo despuntado se liga a *oriR* para generar pBE30. También se amplifica una secuencia del gen *CRM₁₉₇* de 2.13 Kb que comprende la región de promotor *pTox* (Boyd et al., 1988), *cru* y la secuencia de terminador predicha a partir del ADN genómico de *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197) y se clona en el sitio de restricción *SpeI* único diseñado en el pBE30. La mutación GAG en este amplicón se verifica mediante la prueba de PCR específica de alelo (Pushnova et al., *Analytical Biochemistry*. 1998; 260: 24 a 29) y secuenciación de ADN. El plásmido obtenido de esta manera se designa como pBE33 (Figura 1).

El plásmido pBE33 se transfiere mediante electroporación siguiendo los procedimientos optimizados para *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197). Las colonias transformadas de *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197) (pBE33) se confirman mediante PCR de colonia específica y aislamiento de plásmido y digestión de restricción. La expresión de *CRM₁₉₇* en las colonias se analiza mediante SDS-PAGE y análisis Western blot. La *CRM₁₉₇* en los medios se cuantifica mediante ELISA y HPLC y se presentan como concentración de *CRM₁₉₇* expresada por litro de medios de cultivo.

**Producción de CRM₁₉₇ con la cepa diseñada *Corynebacterium*
diphtheriae C7Ep en medios base- libres de componentes
derivados de animales**

Para este proceso se utiliza la cepa
5 *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep. Se sigue un cultivo de
dos pasos por preparación del inóculo en matraz de
agitación. Los medios para cultivo en matraz de agitación
constan de extracto de levadura (YE) 10 g/L, peptona
vegetal 15 g/L, KH_2PO_4 4.3 g/L, triptófano 50 mg/L, glucosa
10 4.0 g/L, ácido nicotínico 0.8 mg/L, ácido pimélico 0.08
mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
6.25 mg/L, cistina 0.5 g/L, kanamicina 25 mg/L, glucosa 4.0
g/L.

A los medios en un fermentador de 20 L, se agrega
15 5% de inóculo para iniciar el proceso. Los medios para el
fermentador constan de YE 15 g/L, peptona vegetal 30 g/L,
 KH_2PO_4 4.3 g/L, triptófano 50 mg/L, ácido nicotínico 0.8
mg/L, ácido pimélico 0.08 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L,
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.25 mg/L, cistina 0.5 g/L,
20 kanamicina 25 mg/L, glucosa 4.0 g/L.

El cultivo se agita a 300 rpm a través de todo el
lote. La temperatura se mantiene a 35 °C y el pH se
mantiene a 7.4 utilizando ácido ortofosfórico al 20% y NaOH
5 N. El cultivo se airea utilizando 1.0 volúmenes de aire
25 por volumen de medio por minuto (vvm por sus siglas en

inglés). El cultivo se enriquece con oxígeno para mantener el nivel de oxígeno disuelto (DO) en 20%. Después de unas cuantas horas, los niveles de DO siguen cayendo por debajo de 20% cuando se alcanza el límite de enriquecimiento de O_2 . El nivel de DO para el resto del lote permanece cercano a cero elevándose hacia las horas finales. Cuando la glucosa residual en el caldo cae por debajo de 0.5 g/L, se administra material de alimentación de glucosa al 40% con 2 g/L/hr. El lote se recolecta después de 14 horas de cultivo cuando las densidades celulares alcanzan aproximadamente 90 unidades de DO 600nm. La espuma en el reactor se controla mediante anti-espumante orgánico al 30%. La logra producción de CRM₁₉₇ hasta un título de 60 a 65 mg/L de caldo de fermentación.

Una fermentación que se corre bajo condiciones similares utilizando la cepa *Corynebacterium diphtheriae* C7 CRM₁₉₇ no diseñada produce aproximadamente 35 a 40 mg/L de CRM₁₉₇ lo cual es menor que el de la cepa diseñada. Esto muestra la influencia de las copias de gen adicionales hacia la producción incrementada de la CRM₁₉₇.

EJEMPLO 3

Producción de CRM₁₉₇ con la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep en medios base libres de componentes derivados de animales siguiendo el modelo de balance de flujo metabólico

Para este proceso se utiliza la cepa *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep. Se sigue un cultivo de dos pasos para preparación del inóculo en matraz de agitación. Los medios para cultivo en matraz de agitación constan de YE 10 g/L, peptona vegetal 15 g/L, KH_2PO_4 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, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.25 mg/L, cistina 0.5 g/L, kanamicina 25 mg/L, glucosa 4.0 g/L.

A los medios de un fermentador de 20 L, se agrega 5% de inóculo para iniciar el proceso. Los medios para el cultivo en fermentador constan de YE 15 g/L, peptona vegetal 30 g/L, KH_2PO_4 4.3 g/L, triptófano 50 mg/L, ácido nicotínico 0.8 mg/L, ácido pimélico 0.08 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.25 mg/L, cistina 0.5 g/L, kanamicina 25 mg/L, glucosa 4.0 g/L.

El cultivo se agita a 300 rpm a través de todo el lote. La temperatura se mantiene a 35 °C y el pH se mantiene a 7.4 utilizando ácido ortofosfórico al 20% e hidróxido de amonio al 12.5%. El cultivo se airea utilizando 1.0 vvm de aire. El cultivo se enriquece con oxígeno para mantener el nivel de DO en 20%. Se introduce un modelo que sigue la velocidad de conversión metabólica en el punto de tiempo dado, este modelo toma la entrada proveniente del parámetro en línea de DO residual en

correspondencia con los cambios con respecto a pH, CO₂, generación de calor. En la fase logarítmica, los niveles de DO siguen cayendo por debajo de 20% a pesar de que se ha llegado al límite de enriquecimiento de O₂. El nivel de DO para el resto del lote sigue cercano a cero elevándose hacia las horas finales. Cuando la glucosa residual en el caldo cae por debajo de 0.5 g/L, se administra material de alimentación de glucosa al 40% con el fin de justificar el modelo de flujo metabólico. El lote se recolecta después de 14 horas de cultivo cuando las densidades celulares llegan aproximadamente a 90 unidades de DO 600nm. La espuma en el reactor se controla mediante anti-espumante orgánico al 30%. Se logra la producción de CRM₁₉₇ a un título de 150 mg/L de caldo de fermentación.

15

EJEMPLO 4

Producción de CRM₁₉₇ de conformidad con la presente invención

Se sigue un cultivo de tres pasos para preparación del inóculo. Los primeros dos pasos se efectúan en los matraces de agitación. Los medios para cultivo en matraz de agitación constan de YE 10 g/L, peptona vegetal 15 g/L, KH₂PO₄ 4.3 g/L, triptófano 50 mg/L, glucosa 4.0 g/L, solución de sales traza YC 2 ml/L, suplemento de cistina 1 ml/L, kanamicina 25 mg/L, glucosa 4.0 g/L.

25

La composición de los medios base para el

fermentador de semilla es YE 15 g/L, peptona vegetal 30 g/L, KH_2PO_4 4.3 g/L, triptófano 50 mg/L, ácido nicotínico 0.8 mg/L, ácido pimélico 0.08 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.25 mg/L, cistina 0.5 g/L, kanamicina 25 mg/L, glucosa 4.0 g/L

A continuación, se da la composición de los medios del fermentador (Tabla I) y los ingredientes que han sido designados siguiendo el diseño Placket Burmann.

TABLA I

10	No. de S.	Componentes de los medios	Cant.	Unidades	No. de S.	Componentes de los medios	Cant.	Unidades
	1	Alanina	0.1	g/L	18	Valina	1	g/L
	2	Arginina	0.1	g/L	19	Potasio	2	g/L
	3	Acido aspártico	0.5	g/L	20	Magnesio	1	g/L
	4	Cisteína	0.5	g/L	21	Tiamina	0.1	mg/L
15	5	Acido 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	Acido fólico	1.6	mg/L
20	11	Lisina	0.1	g/L	28	Manganeso	1	mg/L
	12	Metionina	1	g/L	29	Acido nicotinámico	100	mg/L
	13	Fenilalanina	0.5	g/L	30	Acido pantoténico	50	mg/L
	14	Prolina	0.1	g/L	31	Acido 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
25	17	Triptófano	0.1	g/L	34	Zinc	7	mg/L

A un fermentador de 20 L con los componentes anteriores con los medios base (YE 15 g/L, peptona vegetal 30 g/L, KH_2PO_4 4.3 g/L, triptófano 50 mg/L, ácido nicotínico 0.8 mg/L, ácido pimélico 0.08 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.25 mg/L, cistina 0.5 g/L, kanamicina 25 mg/L, glucosa 4.0 g/L), se agrega inóculo al 5% proveniente del fermentador de semilla para iniciar el proceso. La temperatura se mantiene a 35 °C y el pH se mantiene en 7.4 a 7.6 utilizando ácido ortofosfórico al 20%, hidróxido de amonio al 12.5%, y basado en el modelo de flujo metabólico (Figura 2) la modulación del material de alimentación de glucosa y OTR. El cultivo se airea utilizando 1.0 vvm de aire. El cultivo se enriquece con oxígeno para mantener el nivel de DO en 20%. En la fase logarítmica, los niveles de DO siguen cayendo por debajo de 20% a pesar de que se ha llegado al límite de enriquecimiento de O_2 . El nivel de DO para el resto del lote permanece cercano a cero elevándose hacia las horas finales. Cuando la glucosa residual en el caldo cae por debajo de 0.5 g/L, se administra material de alimentación con solución de glucosa al 40% a 4.5 g/L/hr. De manera intermitente las vitaminas y los elementos traza se suplementan en los siguientes niveles: ácido nicotínico 6.425 mg/L, ácido pimélico 0.465 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.25 mg/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 recolecta después de 18 horas de cultivo cuando las densidades celulares alcanzan aproximadamente 132 unidades de DO 600nm. La espuma en el reactor se controla mediante anti-espumante orgánico al 30%. La producción de CRM₁₉₇ alcanza un título de 450 a 500 mg/L de caldo de fermentación.

EJEMPLO 5

10 **Comparación de los rendimientos de CRM₁₉₇ utilizando Corynebacterium diphtheriae C7 nativa y una cepa diseñada de Corynebacterium diphtheriae C7Ep**

Se efectúa una fermentación utilizando medios básicos libres de animales, mejoras del proceso pre-modelo y medios y procesos de conformidad con la presente invención utilizando C7 de *Corynebacterium diphtheriae* nativa y la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae*.

Se utilizan la cepa C7 lisogénica individual de *Corynebacterium diphtheriae* y la cepa diseñada con copias adicionales episómicamente colocadas del gen CRM₁₉₇ (C7Ep) para optimización del proceso. En medios YC no desferrados típicos que tienen componentes animales, C7 da 22 a 25 mg/L de CRM₁₉₇ mientras que C7Ep da 40 a 45 mg/L. Cuando los medios se modifican remplazando los componentes animales con peptonas vegetales, la cepa C7 da como resultado 40 a

45 mg/L de CRM₁₉₇ y C7Ep da 65 mg/L de CRM₁₉₇. Cuando se modifican las condiciones de proceso cambiando los parámetros, C7Ep produce 120 a 150 mg/L de CRM₁₉₇. Se desarrolla un modelo utilizando entradas provenientes del proceso base. El resultado final del método optimizado que da como resultado 120 mg/l de CRM₁₉₇ a partir de C7 y >500 mg/L de CRM₁₉₇ a partir de C7Ep. Los rendimientos se comparan en la Tabla 2 que se da a continuación:

TABLA II

Comparación del rendimiento de C7 - *Corynebacterium diphtheriae* nativa con el de C7Ep modificada episómicamente a diferente condición de proceso

No. de S.	Organismo	Rendimientos de CRM ₁₉₇ en mg/L, mediante ELISA		
		Medios libres de animal básicos	Mejoras del proceso pre-modelo	Medios y procesos de conformidad con la presente invención
1	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> C7 (nativa)	20-25	35-40	110-120
2	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> C7 Ep (copia adicional del gen incorporada en el episoma)	60-65	120-150	> 500

