



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0041803

(51)¹⁹ C07K 14/34

(13) B

(21) 1-2019-06169

(22) 19/04/2018

(86) PCT/IN2018/050235 19/04/2018

(87) WO/2018/193475 25/10/2018

(30) 201741014335 22/04/2017 IN

(45) 25/11/2024 440

(43) 25/02/2020 383A

(73) BIOLOGICAL E LIMITED (IN)

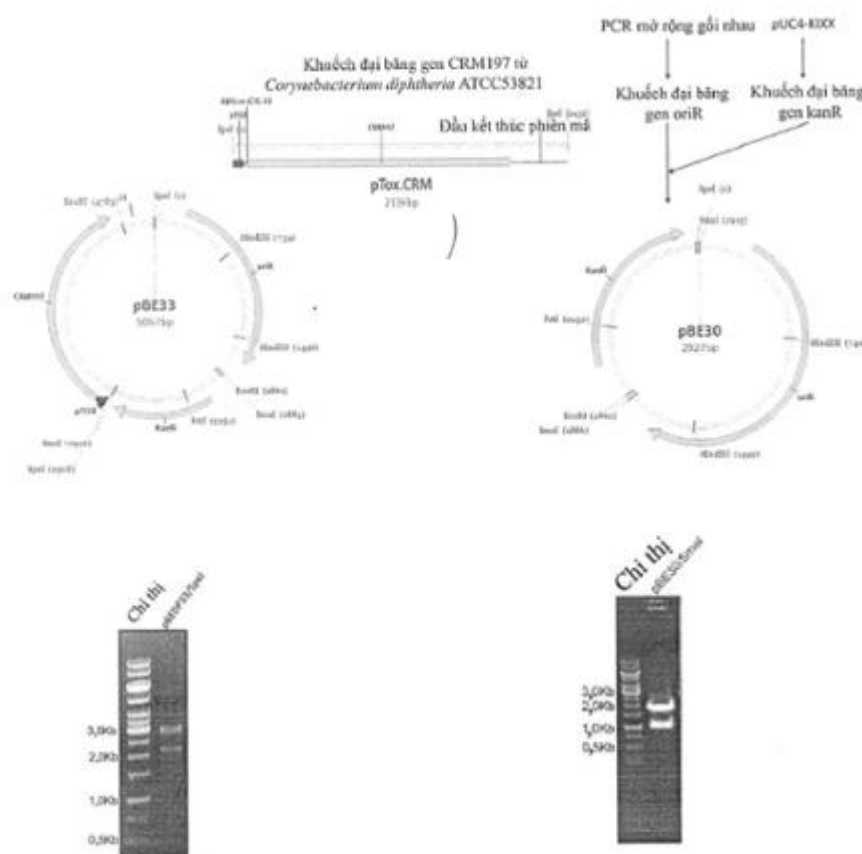
18/1 & 3, Azamabad, Hyderabad, Telangana HYDERABAD 500020, India

(72) Balamurali MASILAMANI (IN); Rajan SRIRAMAN (IN); Mandar Shirish DIXIT (IN); Deviprasanna CHAKKA (IN); Satyam Naidu SUREDDI (IN); Ramesh Venkat MATUR (IN); Narender Dev MANTENA (IN); Mahima DATLA (IN).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CRM197 SẢN LƯỢNG CAO ĐƯỢC CẢI TIẾN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ với sản lượng cao được cải tiến sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi chủng này trong môi trường không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật với một hoặc nhiều axit amin.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ có sản lượng cao được cải tiến sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CRM₁₉₇ là dạng giải độc về mặt di truyền của độc tố bạch hầu. Một đột biến ở vị trí 52, thay thế axit glutamic cho glyxin, dẫn đến mất hoạt tính ADP-ribosyltransferaza của độc tố tự nhiên. Căn cứ về mặt cấu trúc của CRM₁₉₇ đối với việc mất độc tính đã được giải thích và được sử dụng rộng rãi làm protein vận chuyển cho vacxin liên hợp. CRM₁₉₇, như độc tố bạch hầu, là chuỗi polypeptit đơn của 535 axit amin (58,4 KD) bao gồm hai tiểu đơn vị (được liên kết với nhau qua cầu disulfua).

CRM₁₉₇ được sử dụng làm protein vận chuyển ở một số vacxin liên hợp được chấp nhận như liên hợp *Haemophilus influenza* typ b được bán trên thị trường dưới tên thương mại là Hibtiter TM, liên hợp pneumococcal polysaccharit hóa trị 13 được bán trên thị trường dưới tên thương mại PREVNAR 13® và các sản phẩm tương tự.

Ruth M. Drew et al., *Bacteriol. 1951 Nov; 62(5):549-59*; đã bộc lộ môi trường đã được xác định về mặt hóa học thích hợp để sản xuất độc tố có chuẩn độ cao và đã nêu tóm tắt các yêu cầu về axit amin của *Corynebacterium diphtheriae*, chủng Toronto của Park-Williams số 8. Môi trường chứa axit amin thay thế một cách có hiệu quả thành phần có nguồn gốc từ động vật, tức là, casein hydrolysat. Axit amin bao gồm axit glutamic, xystin, prolin, tryptophan, leuxin, valin, methionin và glyxin.

Rappuoli et al; *Applied and Environmental Microbiology* 1983 Vol. 46(3):560-564 đã bộc lộ rằng lysogen kép không tiếp đôi ổn định và có sản lượng CRM₁₉₇ cao, cao hơn gấp ba lần lysogen đơn.

R Fass. et al., *Applied Microbiology and Biotechnology; April 1995, Volume 43(1): 83–88*; đã bộc lộ phương pháp tăng trưởng mật độ cao để sản xuất độc tố bạch hầu được gây đột biến từ hai chủng *Corynebacterium diphtheria*: C7 (β) (tox-201, tox-9) và C7 (β)(tox-107). Phương pháp này bao gồm việc sử dụng môi trường tăng trưởng không được khử ferat mang lại sự tăng trưởng vi khuẩn ở mật độ cao, và khi kết hợp với sự thiếu hụt glucoza và sắt, tăng cường sản xuất độc tố. Không khí giàu oxy được cung

cấp để vi khuẩn có thể tăng trưởng đến mật độ tế bào có bức xạ là 70 ở 600 nm (15–20 g/L khối lượng khô). Nồng độ độc tố lớn ở phần nổi môi trường nuôi cấy là 150 mg/l.

Parag P.Nagarkar et al., *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92, 215-220; đã bộc lộ mô hình sử dụng axit amin trong việc tăng trưởng *Corynebacterium diphtheriae* và đã cho thấy rằng chỉ bốn trong số chín axit amin được thử nghiệm, cụ thể là xystin, histidin, aspartat và methionin là quan trọng cho sự tăng trưởng và sản xuất độc tố bởi *Corynebacterium diphtheria*.

Patent Châu Âu số 1 849 860 B1 bộc lộ việc sử dụng nguyên liệu có protein của nguồn không phải động vật, như protein từ đậu nành, hạt bông, khoai tây, v.v, làm thành phần môi trường để nuôi cấy vi khuẩn gây bệnh.

Patent Mỹ số 6,962,803 B2 bộc lộ phương pháp tinh sạch độc tố bạch hầu bằng cách lên men chủng vi sinh vật có khả năng sản xuất độc tố bạch hầu, phương pháp này bao gồm bước thêm glucoza vào môi trường tăng trưởng, nhờ đó duy trì được sự tăng trưởng vi sinh vật, hỗ trợ hiệu quả cho việc sản xuất độc tố bạch hầu. Tài liệu này còn bộc lộ rằng ngoài nguồn cacbon, còn có các yêu cầu dinh dưỡng tối thiểu khác cho sự tăng trưởng bao gồm kim loại vi lượng, phosphat, nguồn nitơ, thông thường là axit casamin và chiết xuất nấm men.

Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2011/0097359 A1 bộc lộ môi trường nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* để tạo ra hàm lượng độc tố bạch hầu hoặc chất tương tự của nó, trong đó môi trường về cơ bản không chứa sản phẩm có nguồn gốc từ động vật và chứa: nước; nguồn carbohydrat; nguồn nitơ; và một số axit amin tự do trong nồng độ ban đầu, trong đó nồng độ ban đầu của mỗi axit amin tự do không giới hạn mức sản xuất độc tố bạch hầu hoặc chất tương tự của nó. Tài liệu này còn bộc lộ rằng nguồn carbohydrat không chứa glucoza.

WO 2006/100108 A1 bộc lộ quy trình lên men bao gồm bước nuôi chủng *Corynebacterium diphtheriae* trong môi trường trong thiết bị lên men dưới điều kiện khuấy trộn đủ để duy trì môi trường nuôi cấy đồng nhất và hạn chế sục khí để lượng pO₂ trong môi trường nuôi cấy thấp hơn 4% trong toàn bộ bước lên men. Tài liệu này còn bộc lộ rằng pH trong thiết bị lên men được duy trì trong khoảng từ 7,0 đến 7,8 theo mức độ sục khí mà không đòi hỏi phải bổ sung axit hoặc bazơ.

Quy trình CRM₁₉₇ thường nhạy cảm với sự thay đổi nhỏ ở các thành phần của quy trình cũng như các thông số của quy trình. Việc sản xuất CRM₁₉₇ từ

Corynebacterium diphtheriae được thực hiện trên toàn cầu mặc dù có thành công hạn chế đối với việc thực hiện thương mại. Không tài liệu nào trong các tài liệu tham chiếu nêu trên bộc lộ phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ với sản lượng cao như >150 mg/l sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế. Các tác giả sáng chế đã phát triển mô hình dòng chuyển hóa để sản xuất CRM₁₉₇ với sản lượng cao sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục tiêu của sáng chế

Mục tiêu chính của sáng chế là tìm ra quy trình sản xuất CRM₁₉₇ với hàm lượng cao được cải tiến.

Một mục tiêu khác của sáng chế là tìm ra quy trình sản xuất CRM₁₉₇ với hàm lượng cao được cải tiến có hiệu quả kinh tế và có thể được sử dụng để sản xuất vaccin liên hợp.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ với sản lượng cao sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi chủng này trong môi trường lên men chứa một hoặc nhiều axit amin và không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa nhiều hơn 10 loại axit amin và bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa nhiều hơn 10 loại axit amin và bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1- Xây dựng plasmit được thiết kế như pBE33.

Fig. 2- Lưu đồ thể hiện mô hình cân bằng dòng chuyển hóa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ với sản lượng cao được cải tiến sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi chủng này trong môi trường lên men chứa nhiều hơn 10 loại axit amin và không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật.

Chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế (C7Ep) theo sáng chế đề cập đến *Corynebacterium diphtheriae* có nhiều bản sao của gen CRM₁₉₇ ở thể bổ sung được điều hòa bởi cơ chế của gen CRM₁₉₇ vật chủ và nền tảng di truyền của chủng này là lysogen đơn.

Axit amin được sử dụng trong sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm Alanin, Arginin, Axit aspartic, Xystein, Axit glutamic, Glutamin, Glyxin, Histidin, Isoleuxin, Leuxin, Lysin, Methionin, Phenyl alanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Valin và muối của nó và mỗi axit amin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2 g/l.

Ảnh hưởng của axit amin, vitamin và điều kiện quy trình sản xuất CRM₁₉₇ đã được nghiên cứu. Một số axit amin nhất định được phát hiện là thể hiện ảnh hưởng tiêu cực lên sự tăng trưởng của vi khuẩn. Tuy nhiên, việc sản xuất CRM₁₉₇ được phát hiện là được tăng lên nếu sử dụng hơn 10 loại axit amin trong nồng độ tối ưu. Nồng độ axit amin được tối ưu bằng cách sử dụng thiết kế thí nghiệm Plackett Burman.

Thiết kế Plackett Burman là thiết kế thí nghiệm để điều tra sự phụ thuộc của một số đại lượng được xác định vào số lượng các biến cố (yếu tố) độc lập, theo cách làm giảm tối thiểu phương sai của các ước lượng phụ thuộc này sử dụng số lượng giới hạn các thí nghiệm. Kết quả thể hiện các axit amin như Axit aspartic, Glutamin, Glyxin Isoleuxin leuxin, Valin và ở nhiệt độ từ 35 đến 36 °C có tác động tích cực lên việc tổng hợp CRM₁₉₇ và axit amin như Alanin, Isoleuxin, Valin và ở nhiệt độ từ 35 đến 36 °C có tác động tiêu cực lên việc tổng hợp CRM₁₉₇. Một số hàm lượng của thiết kế thí nghiệm được thực hiện ở các nồng độ khác nhau để đạt được việc sản xuất CRM₁₉₇ với hàm lượng cao. Việc sử dụng tyrosin và asparagin làm giảm sản lượng chung của CRM₁₉₇ và do đó các axit amin này không thuộc sáng chế.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, môi trường lên men chứa hỗn hợp của Phenyl alanin, Arginin và một hoặc nhiều axit amin khác trong đó lượng Phenyl

alanin và Arginin được sử dụng là nhỏ hơn 1g/L.

Theo phương án được ưu tiên khác của sáng chế, môi trường lên men chứa hỗn hợp của Phenyl alanin, Arginin và một hoặc nhiều axit amin khác trong đó lượng Phenyl alanin nằm trong khoảng từ 0,25 đến 0,75g/l và Arginin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 g/l.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi chủng này trong môi trường lên men chứa nhiều hơn 10 loại axit amin, bổ sung vào môi trường lượng vitamin nằm trong khoảng từ 0,05 đến 20 mg trên lít, trong đó môi trường này không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật.

Theo một phương án khác của sáng chế, axit amin, vitamin, nguyên tố vi lượng và chất tương tự được thêm vào môi trường lên men như chất dinh dưỡng trong quá trình nuôi cấy.

Các chất dinh dưỡng được sử dụng trong sáng chế làm chất bổ sung bao gồm vitamin được chọn từ nhóm bao gồm Axit nicotinic, Thiamin, Axit pantothenic, Biotin, Riboflavin, Axit folic; Axit pimelic; phosphat, nguồn nitơ và kim loại vi lượng và chất tương tự và mỗi vitamin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 20 mg trên lít.

Môi trường lên men được sử dụng trong sáng chế không được khử ferat và hoàn toàn không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật. Ngoài ra, môi trường cũng không chứa thịt truyền thống trên cơ sở môi trường Loeffler và axit casamin trên cơ sở môi trường YC sắt thấp được khử ferat. Các thành phần của môi trường lên men theo sáng chế bao gồm chiết xuất nấm men, Veg.Pepton, kali-dihydro phosphat (KH₂PO₄), tryptophan, glucoza, dung dịch muối vi lượng YC.

Theo một phương án khác của sáng chế, chế phẩm môi trường để nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng bao gồm môi trường lên men chứa chiết xuất nấm men, Veg.Pepton, kali-dihydro phosphat (KH₂PO₄), tryptophan, glucoza, dung dịch muối vi lượng YC; một hoặc nhiều axit amin, vitamin, nguyên tố vi lượng và chất tương tự.

Các kim loại vi lượng thích hợp bao gồm kali, magie, canxi, clorua, colin, đồng, mangan, sulfat, kẽm và các kim loại tương tự.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến sử dụng chủng

Corynebacterium diphtheriae được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung vào môi trường lên men chất dinh dưỡng trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa.

Mô hình dòng chuyển hóa đề cập đến mạng lưới hoàn thiện của sự truyền nhiệt, truyền chất, tốc độ truyền oxy (Oxygen transfer rate - OTR), tốc độ hấp thụ oxy (Oxygen uptake rate - OUR) và động lực truyền ion, trong đó OTR được duy trì bằng cách sục khí, áp suất ngược và bơm trong oxy tinh khiết. Mô hình này được thể hiện ở Fig. 2.

Phát triển mô hình dòng chuyển hóa

Mô hình này được tạo ra trên cơ sở giải thích dữ liệu trực tuyến của sự tích tụ ion hydro trong quy trình biến dưới dạng đối sơ cấp rồi sau đó chuyển hóa oxy hòa tan, oxy thành CO₂ cùng với sự giải phóng nhiệt trong quy trình. Ví dụ, mô hình làm việc trên điều kiện giới hạn nguồn cacbon. Nguồn cacbon được bơm và đáp ứng được đánh giá trong quy trình. Hoạt động điều chỉnh được thực hiện đối với việc tổng hợp ion hydro trên cơ sở đáp ứng. Sau đó nguồn cung cấp được tối ưu hóa để đạt được pH đều và oxy hòa tan (DO) và tốc độ truyền nhiệt (ví dụ, pH là 7,4; DO dư > từ 2 đến 20; tốc độ truyền nhiệt (Heat transfer rate - HTR).

Theo phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm bước bổ sung glucoza vào môi trường trong cả quá trình lên men.

Sáng chế không bao gồm việc sử dụng maltoza làm nguồn cacbon và bước khử ferat.

CRM₁₉₇ được sản xuất theo sáng chế có vacxin liên hợp như liên hợp pneumococcal, liên hợp typhoít, liên hợp Hib và liên hợp tương tự.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa nhiều hơn 10 loại axit amin và bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa, trong đó axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Alanin, Arginin, Axit aspartic, Xystein, Axit glutamic, Glutamin, Glyxin, Histidin, Isoleuxin, Leuxin, Lysin, Methionin, Phenyl alanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Valin và muối của nó.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium*

diphtheriae được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa nhiều hơn 10 loại axit amin, trong đó mỗi axit amin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2 g/l.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa nhiều hơn 10 loại axit amin và bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa, trong đó mỗi axit amin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2 g/l.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa môi trường bazơ, nhiều hơn 10 loại axit amin và bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa, trong đó mỗi axit amin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2 g/l.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa nhiều hơn 10 loại axit amin và bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa, trong đó axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Alanin, Arginin, Axit aspartic, Xystein, Axit glutamic, Glutamin, Glyxin, Histidin, Isoleuxin, Leuxin, Lysin, Methionin, Phenyl alanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Valin và muối của nó, trong đó mỗi axit amin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2 g/l.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa nhiều hơn 10 loại axit amin, trong đó axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Alanin, Arginin, Axit aspartic, Xystein, Axit glutamic, Glutamin, Glyxin, Histidin, Isoleuxin, Leuxin, Lysin,

Methionin, Phenyl alanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Valin và muối của nó, trong đó mỗi axit amin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2 g/l.

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm các bước

i) nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa môi trường bazơ và nhiều hơn 10 loại axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Alanin, Arginin, Axit aspartic, Xystein, Axit glutamic, Glutamin, Glyxin, Histidin, Isoleuxin, Leuxin, Lysin, Methionin, Phenyl alanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Valin và muối của nó; và

ii) bổ sung glucoza và chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa.

Theo một phương án khác nữa, trong quy trình lên men nhiệt độ được duy trì trong khoảng từ 30 đến 40 °C và pH được duy trì trong khoảng từ 7,0 đến 8,0, tốt hơn là từ 7,4 đến 7,6 sử dụng 20% axit orthophosphoric, 12,5% amoni hydroxit. Quy trình lên men được thực hiện trong khoảng thời gian từ 15 đến 24 giờ, tốt hơn là từ 16 đến 20 giờ.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hỗn hợp lên men và quy trình không có tyrosin và asparagin. Theo một phương án, quy trình theo sáng chế không có axit casamin trên cơ sở môi trường YC sắt thấp được khử ferat, maltoza làm nguồn cacbon và bước khử ferat.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa hỗn hợp của Phenyl alanin, Arginin với lượng nhỏ hơn khoảng 1g/L và một hoặc nhiều axit amin khác.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa nhiều hơn 10 loại axit amin và bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa, trong đó sản lượng của CRM₁₉₇ thu được lớn hơn 150 mg/L.

Theo một phương án, sáng chế có thể sản xuất vacxin liên hợp bao gồm bước liên hợp polysaccarit từ *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *meningococcus*, *Haemophilus influenzae* với CRM₁₉₇ được sản xuất theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ với sản lượng cao được cải tiến sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi chủng này trong môi trường không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật chứa nhiều hơn 10 loại axit amin và bước bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến có sản lượng như 150mg/L, 200mg/L, 300mg/L, 500mg/L, 1g/L, 1,5g/L, 2 g/L, 2,5g/L, 3g/L, 3,5g/L, 4g/l, 4,5g/L và 5g/L.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế C7 (β 197) trong đó plasmit pBE33 được chuyển bằng kỹ thuật xung điện.

CRM₁₉₇ được sản xuất theo sáng chế được định lượng bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym bắt miễn dịch (Immuno-Capture Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay - IC-ELISA).

Phát triển chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trên plasmit vector biểu hiện.

Corynebacterium diphtheriae C7 (β -197) ATCC 53821, gen mã hóa cho CRM₁₉₇ tồn tại ở dạng một bản sao và protein CRM₁₉₇ đột biến được tiết vào dưới sự điều hòa sắt. Sản lượng của CRM₁₉₇ tăng gấp ba lần ở chủng *Corynebacterium diphtheriae* C7 có hai bản sao corynephago-beta (ATCC 39255). Điều này cho thấy rằng số lượng bản sao gen có liên hệ đến việc tăng khả năng sản xuất. Để việc sản xuất CRM₁₉₇ từ *Corynebacterium diphtheriae* có thể tồn tại được trên thị trường, cần phải tăng mức độ biểu hiện. Hợp nhất nhiều bản sao vào hệ gen vi khuẩn là một thách thức về mặt kỹ thuật. Thể phago nhiều bản sao không ổn định về mặt di truyền và bị mất các bản sao khác của gen CRM. Các tác giả sáng chế có mục đích cải thiện mức độ biểu hiện của CRM₁₉₇ bằng cách tăng bản sao gen của CRM₁₉₇ được vận chuyển trên các plasmit có chỉ thị chọn lọc kháng sinh, cùng với các yếu tố điều hòa tự nhiên của CRM₁₉₇. Theo đó, các tác giả đã phát triển chủng *Corynebacterium diphtheriae* có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng, được tăng độ ổn định của chủng. Chủng biến đổi có mức độ biểu hiện của CRM₁₉₇ cao hơn so với chủng *Corynebacterium* không được biến đổi.

Sáng chế được minh họa cụ thể hơn thông qua các ví dụ được nêu dưới đây. Tuy nhiên, nên hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn bởi ví dụ theo bất kỳ cách nào nhưng bao gồm các cải biến của các ví dụ này nằm trong các thông số được mô tả trong bản mô tả này, như được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tăng cường sự biểu của CRM₁₉₇ bởi bản sao thể bổ sung của CRM₁₉₇

Chuẩn bị vector có thể sao chép ổn định trong *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197). Thực hiện phân lập plasmit tự nhiên từ *Corynebacterium C7 diphtheriae* sử dụng quy trình phân lập plasmit như được mô tả ở T.C Currier et al., *Anal Biochem.* 1976; 76(2): 431441. Sử dụng chế phẩm ADN plasmit tự nhiên, khuếch đại 1,87Kb nguồn sao chép (*oriR*). Đồng thời, khuếch đại 1,033Kb trình tự *kanR* sử dụng ADN khuôn pUC4-KIXX và cắt đầu và nối *oriR* để tổng hợp pBE30. Ngoài ra, khuếch đại 2,13 Kb trình tự gen CRM₁₉₇ bao gồm vùng khởi đầu pTox (Boyd et al., 1988), cru và trình tự kết thúc được dự đoán của ADN thuộc hệ gen của *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197) và tách dòng thành vùng giới hạn SpeI duy nhất được thiết kế trong pBE30. GAG đột biến trong bước khuếch đại này được kiểm tra bằng thử nghiệm PCR đặc hiệu alen (Pushnova et al., *Analytical Biochemistry.* 1998; 260: 24 đến 29) và giải trình tự ADN. Do đó plasmit thu được được thiết kế như pBE33 (Fig. 1).

Chuyển plasmit pBE33 bằng xung điện sau khi tối ưu hóa quy trình cho *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197). Xác nhận các dòng *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197) (pBE33) được chuyển bằng kỹ thuật PCR dòng đặc hiệu và phân lập plasmit và phân giải giới hạn. Phân tích sự biểu của CRM₁₉₇ trong các dòng bằng kỹ thuật SDS-PAGE và thâm miễn dịch (Western blotting). Định lượng CRM₁₉₇ trong môi trường bằng kỹ thuật ELISA và HPLC và lượng CRM₁₉₇ được thể hiện ở dạng nồng độ của CRM₁₉₇ được biểu hiện trên lít của môi trường nuôi cấy.

Ví dụ 2: Sản xuất CRM₁₉₇ với chủng *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep được thiết kế ở môi trường bazơ – không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật.

Chủng *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep được sử dụng trong quy trình này. Nuôi cấy hai bước chế phẩm cấy trong bình lắc. Dung dịch cho việc nuôi cấy trong bình lắc bao gồm chiết xuất nấm men (YE) 10 g/L, Veg. Pepton 15g/L, KH₂PO₄ 4,3g/L, Tryptophan 50mg/L, Glucoza 4,0g/L, Axit nicotinic 0,8 mg/L, Axit pimelic 0,08 mg/L,

CuSO₄. 5H₂O 25 mg/L, ZnSO₄. 5H₂O 12,5 mg/L, MnCl₂. 4H₂O 6,25 mg/L, xystin 0,5 g/L, Kanamycin 25 mg/L, Glucoza 4,0 g/L.

Thêm vào 5% chế phẩm cấy vào 20 L môi trường lên men để bắt đầu quy trình. Môi trường để nuôi cấy lên men bao gồm YE 15g/L, Veg.Pepton 30 g/L, KH₂PO₄ 4,3g/L, Tryptophan 50mg/L, axit nicotinic 0,8 mg/L, axit Pimelic 0,08 mg/L, CuSO₄. 5H₂O 25 mg/L, ZnSO₄. 5H₂O 12,5 mg/L, MnCl₂. 4H₂O 6,25 mg/L, xystin 0,5 g/L, Kanamycin 25mg/L, Glucoza 4,0 g/L.

Khuấy mẫu nuôi cấy ở 300 RPM trong cả lô. Nhiệt độ được duy trì ở 35 °C và pH được duy trì ở 7,4 sử dụng 20% axit orthophosphoric và 5 N NaOH. Sục khí mẫu nuôi cấy sử dụng 1,0 vvm không khí. Làm giàu môi trường nuôi cấy với oxy để duy trì hàm lượng oxy hòa tan (DO) đến 20%. Sau một vài giờ đầu tiên, hàm lượng DO được giữ ở mức dưới 20% khi hạn chế làm giàu O₂. Hàm lượng DO trong phần còn lại của lô được giữ ở mức gần không có xu hướng tăng lên các giờ cuối. Khi glucoza dư trong môi trường chứa nước hầm thịt nhỏ hơn 0,5 g/L, thì bổ sung nguồn cung cấp 40% glucoza với tốc độ 2 g/L/giờ. Thu lại lô sau 14 giờ nuôi cấy khi mật độ tế bào đạt được khoảng 90 đơn vị OD 600nm. Bọt trong lò phản ứng được kiểm soát bằng chất kháng bọt hữu cơ 30%. Việc sản xuất CRM₁₉₇ đạt được đến chuẩn độ từ 60 đến 65 mg/L của môi trường chứa nước hầm thịt lên men.

Việc lên men xảy ra dưới các điều kiện tương tự sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* C7 CRM₁₉₇ không được thiết kế sản xuất khoảng từ 35 đến 40 mg/L CRM₁₉₇ ít hơn chủng được thiết kế. Điều này cho thấy sự ảnh hưởng các bản sao gen thêm vào đến việc sản xuất CRM₁₉₇ tăng.

Ví dụ 3: Sản xuất CRM₁₉₇ với chủng *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep được thiết kế ở môi trường bazơ không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật bằng mô hình cân bằng dòng chuyển hóa.

Chủng *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep được sử dụng trong quy trình này. Nuôi cấy hai bước chế phẩm cấy trong bình lắc. Môi trường để nuôi cấy trong bình lắc bao gồm YE 10 g/L, Veg. Pepton 15g/L, KH₂PO₄ 4,3g/L, Tryptophan 50mg/L, Glucoza 4,0g/L Axit nicotinic 0,8 mg/L, Axit Pimelic 0,08 mg/L, CuSO₄. 5H₂O 25 mg/L, ZnSO₄. 5H₂O 12,5 mg/L, MnCl₂. 4H₂O 6,25 mg/L, xystin 0,5 g/L, Kanamycin 25mg/L, Glucoza 4,0 g/L.

Thêm vào 5% chế phẩm cấy vào 20 L môi trường lên men để bắt đầu quy trình.

Môi trường để nuôi cấy lên men bao gồm YE 15 g/L, Veg.Pepton 30 g/L, KH_2PO_4 4,3g/L, Tryptophan 50mg/L, axit nicotinic 0,8 mg/L, axit Pimelic 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, xystin 0,5 g/L, Kanamycin 25mg/L, Glucoza 4,0 g/L.

Khuấy mẫu nuôi cấy ở 300 RPM trong cả lô. Nhiệt độ được duy trì ở 35 °C và pH được duy trì ở 7,4 sử dụng 20% axit orthophosphoric và 12,5% amoni hydroxit. Sục khí mẫu nuôi cấy sử dụng 1,0 vvm không khí. Làm giàu môi trường nuôi cấy với oxy để duy trì hàm lượng DO đến 20%. Mô hình được đưa vào theo tỷ lệ chuyển hóa của chuyển đổi theo thời gian, mô hình này có đầu vào từ các thông số trực tuyến của DO dư liên quan đến sự thay đổi pH, CO_2 , sinh nhiệt. Ở pha log, hàm lượng DO được giữ thấp hơn 20% mặc dù đã giới hạn làm giàu O_2 . Hàm lượng DO trong phần còn lại của lô được giữ ở mức gần không có xu hướng tăng lên các giờ cuối. Khi glucoza dư trong môi trường chứa nước hầm thịt thấp hơn 0,5 g/L, thì nạp vào nguồn cung cấp 40% glucoza để căn chỉnh mô hình dòng chuyển hóa. Thu lại lô sau 14 giờ nuôi cấy khi mật độ tế bào đạt được khoảng 90 đơn vị OD 600nm. Bọt trong lò phản ứng được kiểm soát bằng chất kháng bọt hữu cơ 30%. Việc sản xuất CRM₁₉₇ đạt được đến chuẩn độ là 150 mg/L của môi trường chứa nước hầm thịt lên men.

Ví dụ 4: Sản xuất CRM₁₉₇ theo sáng chế

Nuôi cấy ba bước chế phẩm cấy. Thực hiện hai bước đầu tiên trong bình lắc. Môi trường để nuôi cấy trong bình lắc bao gồm YE 10 g/L, Veg.Pepton 15g/L, KH_2PO_4 4,3g/L, Tryptophan 50mg/L, Glucoza 4,0g/L, dung dịch muối vi lượng YC 2 ml/L, bổ sung xystin 1 ml/L, Kanamycin 25mg/L, Glucoza 4,0 g/L.

Chế phẩm môi trường bazơ cho thiết bị lên men mầm bao gồm YE 15g/L, Veg.Pepton 30 g/L, KH_2PO_4 4,3g/L, Tryptophan 50mg/L, axit nicotinic 0,8 mg/L, axit Pimelic 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, xystin 0,5 g/L, Kanamycin 25mg/L, Glucoza 4,0 g/L

Chế phẩm môi trường lên men được thể hiện dưới đây (bảng I) và các thành phần được thiết kế theo thiết kế Placket Burmann.

Bảng I

SỐ THỨ TỰ	THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG	HÀM LƯỢNG	ĐƠN VỊ	SỐ THỨ TỰ	THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG	HÀM LƯỢNG	ĐƠN VỊ
1	Alanin	0,1	g/L	18	Valin	1	g/L
2	Arginin	0,1	g/L	19	Kali	2	g/L
3	Axit aspartic	0,5	g/L	20	Magie	1	g/L
4	Xystein	0,5	g/L	21	Thiamin	0,1	mg/L
5	Axit glutamic	1	g/L	22	Biotin	4	mg/L
6	Glutamin	0,1	g/L	23	Canxi	2	mg/L
7	Glyxin	0,5	g/L	24	Clorua	0,5	mg/L
8	Histidin	1	g/L	25	Colin	0,1	mg/L
9	Isoleuxin	1	g/L	26	Đồng	10	mg/L
10	Leuxin	0,5	g/L	27	Axit Folic	1,6	mg/L
11	Lysin	0,1	g/L	28	Mangan	1	mg/L
12	Methionin	1	g/L	29	Axit nicotinamic	100	mg/L
13	Phenyl alanin	0,5	g/L	30	Axit pantothenic	50	mg/L
14	Prolin	0,1	g/L	31	Axit pimelic	20	mg/L
15	Serin	0,1	g/L	32	Riboflavin	50	mg/L
16	Threonin	0,1	g/L	33	Sulfat	20	mg/L
17	Tryptophan	0,1	g/L	34	Kẽm	7	mg/L

Thêm vào thiết bị lên men 20L các thành phần trên với môi trường bazơ (YE 15 g/L, Veg.Pepton 30 g/L, KH_2PO_4 4,3 g/L, Tryptophan 50 mg/L, axit nicotinic 0,8 mg/L, axit pimelic 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, xystin 0,5 g/L, Kanamycin 25mg/L, Glucoza 4,0 g/L), 5% chế phẩm cây từ thiết bị lên men mầm để bắt đầu quy trình. Nhiệt độ được duy trì ở 35 °C và pH được duy trì ở 7,4 đến 7,6 sử dụng 20% axit orthophosphoric, 12,5% amoni hydroxit và mô hình trên cơ sở dòng chuyển hóa (Fig. 2) điều biến việc cung cấp glucoza và OTR. Sự

khí mẫu nuôi cấy sử dụng 1,0 vvm không khí. Làm giàu môi trường nuôi cấy với oxy để duy trì hàm lượng DO đến 20%. Ở pha log, hàm lượng DO được giữ thấp hơn 20% mặc dù đã giới hạn làm giàu O₂. Hàm lượng DO trong phần còn lại của lô được giữ ở mức gần không có xu hướng tăng lên các giờ cuối. Khi glucoza dư trong môi trường chứa nước hầm thịt nhỏ hơn 0,5 g/L, thì bổ sung nguồn cung cấp với dung dịch 40% glucoza với tốc độ 4,5 g/L/giờ. Bổ sung từng đợt vitamin và nguyên tố vi lượng ở các hàm lượng sau đây; axit nicotinic 6,425 mg/L, axit Pimelic 0,465 mg/L, CuSO₄. 5H₂O 25 mg/L, ZnSO₄. 5H₂O 12,5 mg/L, MnCl₂. 4H₂O 6,25 mg/L, Thiamin 0,08 mg/L, axit pantothenic 0,25 mg/L, Biotin 0,006 mg/L, Riboflavin 0,3 mg/L, axit folic 0,06 mg/L. Thu lại lô sau 18 giờ nuôi cấy khi mật độ tế bào đạt được khoảng 132 đơn vị OD 600nm. Bọt trong lò phản ứng được kiểm soát bằng chất kháng bọt hữu cơ 30%. Việc sản xuất CRM₁₉₇ đạt được đến chuẩn độ từ 450 đến 500 mg/L của môi trường chứa nước hầm thịt lên men.

Ví dụ 5: So sánh sản lượng CRM₁₉₇ sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* C7 tự nhiên và chủng *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep được thiết kế

Việc lên men được thực hiện sử dụng môi trường không chứa thành phần từ động vật cơ bản, tiền mô hình cải thiện quy trình và mô trường và quy trình phù hợp với sáng chế sử dụng C7 *Corynebacterium diphtheriae* tự nhiên và chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế.

Một chủng *Corynebacterium diphtheriae* C7 phân giải và chủng được thiết kế với bản sao thêm ở thể bổ sung của gen CRM₁₉₇ (C7Ep) được sử dụng để tối ưu hóa quy trình. Trong môi trường YC được không khử ferat cụ thể có thành phần động vật, C7 cho từ 22 đến 25 mg/L CRM₁₉₇ trong khi đó C7Ep cho từ 40 đến 45 mg/L. Khi môi trường được biến đổi bằng cách thay thế thành phần động vật bằng veg pepton, chủng C7 cho từ 40 đến 45 mg/L CRM₁₉₇ và C7Ep cho 65 mg/L CRM₁₉₇. Các điều kiện quy trình khi được biến đổi bằng cách thay đổi các thông số, C7Ep sản xuất từ 120 đến 150 mg/L CRM₁₉₇. Mô hình được phát triển sử dụng đầu vào từ quy trình bazơ. Kết quả cuối cùng của phương pháp được tối ưu là thu được 120 mg/l CRM₁₉₇ từ C7 và >500 mg/L CRM₁₉₇ từ C7Ep. Sản lượng được so sánh trong bảng II dưới đây:

Bảng II: So sánh sản lượng của *Corynebacterium diphtheriae* C7 tự nhiên với sản lượng của C7Ep được biến đổi thể bổ sung ở điều kiện quy trình khác nhau.

Số thứ tự	Sinh vật	Sản lượng của CRM ₁₉₇ trong mg/L bằng ELISA		
		Môi trường không chứa thành phần động vật bazơ	Tiền mô hình cải thiện quy trình	Môi trường và quy trình phù hợp với sáng chế
1	<i>Corynebacterium</i> C7 (tự nhiên)	20 -25	35 - 40	110 - 120
2	<i>Corynebacterium</i> C7 Ep (Thể bổ sung được đưa vào bản sao gen thêm)	60 - 65	120 – 150	>500

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ với sản lượng cao được cải tiến sử dụng chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi chủng này trong môi trường lên men không được khử ferat chứa nhiều hơn 10 loại axit amin ngoài tyrosin và asparagin và không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật, trong đó maltoza không được sử dụng làm nguồn cacbon.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó việc bổ sung chất dinh dưỡng là trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó axit amin được chọn từ nhóm bao gồm alanin, arginin, axit aspartic, cystein, axit glutamic, glutamin, glyxin, histidin, isoleuxin, leuxin, lysin, methionin, phenyl alanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, valin và muối của nó.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó mỗi axit amin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2 g/l.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường lên men chứa hỗn hợp của phenyl alanin, arginin và axit amin khác, trong đó lượng phenyl alanin và arginin nhỏ hơn khoảng 1g/L.
7. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chất dinh dưỡng được chọn từ nhóm bao gồm các vitamin như axit nicotinic, thiamin, axit pantothenic, biotin, riboflavin, axit folic; axit pimelic; phosphat, nguồn nitơ và kim loại vi lượng.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó môi trường lên men hoàn toàn không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó môi trường lên men bao gồm môi trường lên men bazơ chứa chiết xuất nấm men, Veg.Pepton, kali-dihydro phosphat (KH₂PO₄), tryptophan, glucoza, dung dịch muối vi lượng YC.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, phương pháp này bao gồm bước bổ sung glucoza vào môi trường trong cả quá trình lên men.
11. Phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

i) nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không được khử ferat không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa môi trường bazơ và nhiều hơn 10 loại axit amin được chọn từ nhóm bao gồm alanin, arginin, axit aspartic, xystein, axit glutamic, glutamin, glyxin, histidin, isoleuxin, leuxin, lysin, methionin, phenyl alanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, valin và muối của nó; và

ii) bổ sung glucoza và chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa, trong đó maltoza không được sử dụng làm nguồn cacbon.

12. Phương pháp sản xuất CRM₁₉₇ được cải tiến, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheriae* được thiết kế có số lượng bản sao gen CRM₁₉₇ tăng trong môi trường lên men không được khử ferat không chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật và chứa nhiều hơn 10 loại axit amin ngoài tyrosin và asparagin và bước bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường trên cơ sở mô hình dòng chuyển hóa, trong đó mỗi axit amin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2 g/l, trong đó maltoza không được sử dụng làm nguồn cacbon.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40 °C và pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0, tốt hơn là từ 7,4 đến 7,6.

14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó sản lượng của CRM₁₉₇ thu được là lớn hơn 150mg/L, 200mg/L, 300mg/L, 500mg/L.

15. Phương pháp sản xuất vacxin liên hợp bao gồm bước liên hợp polysaccarit từ *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* với CRM₁₉₇ được sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.

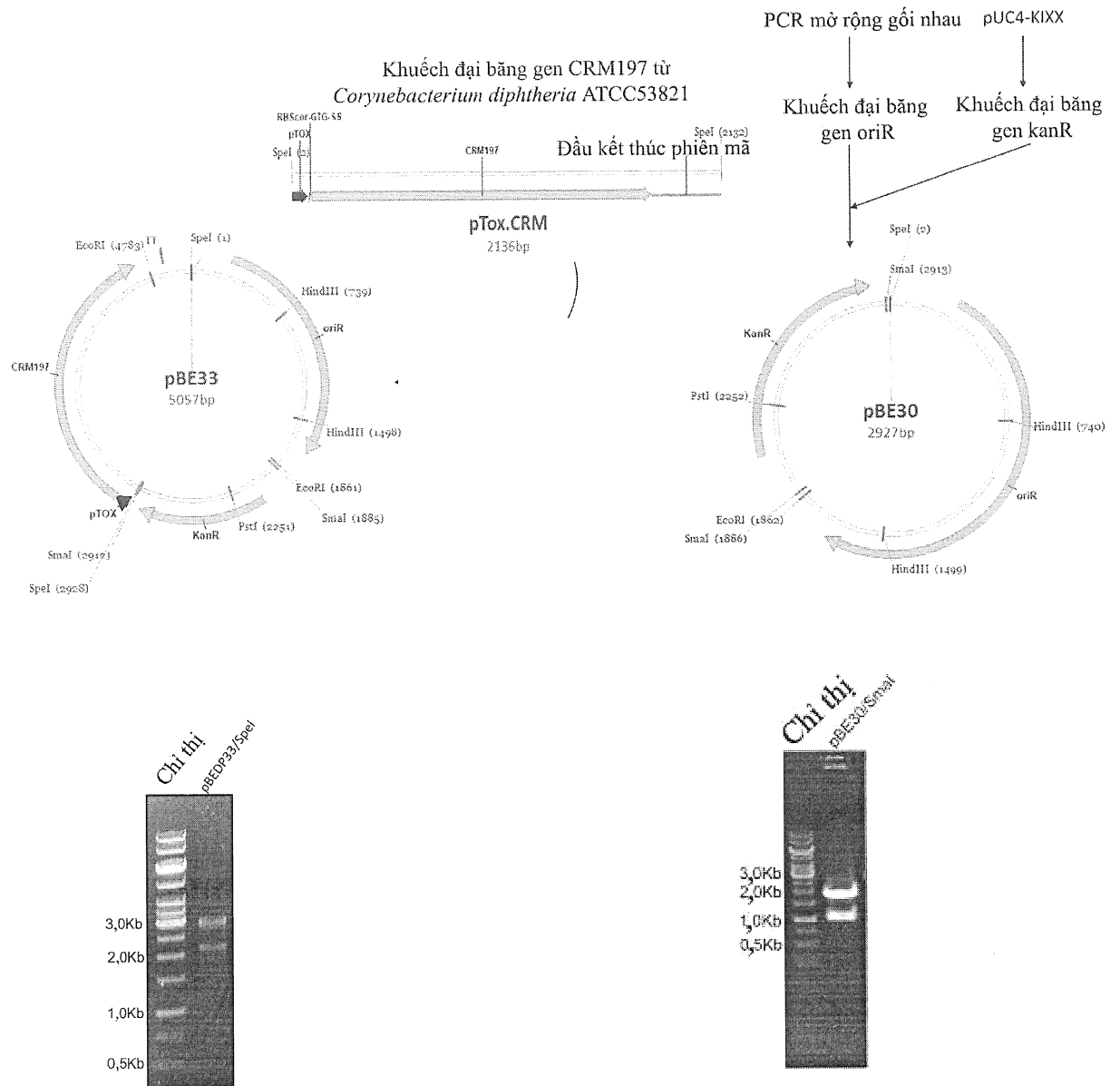


Fig. 1

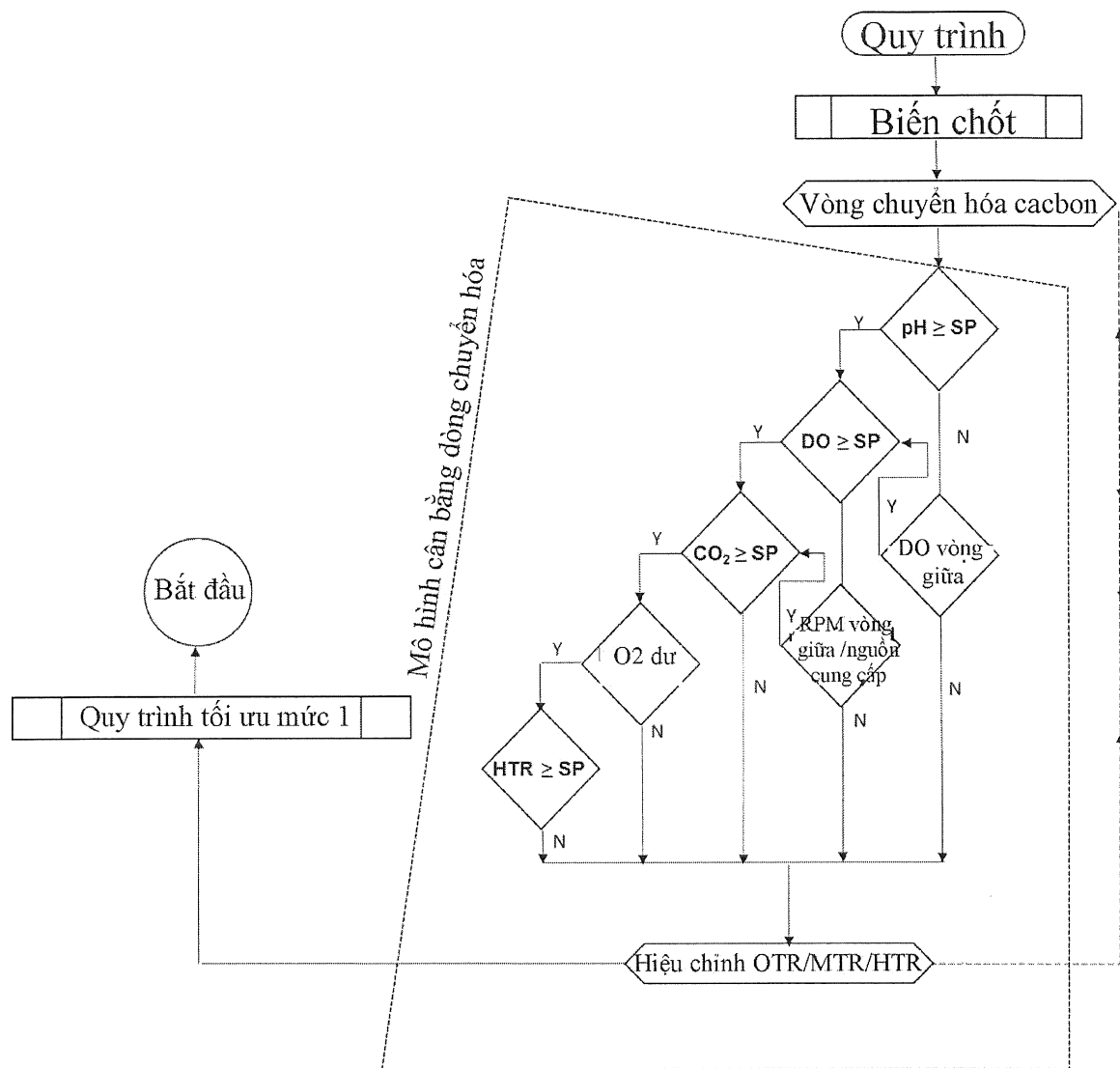


Fig. 2