Procédé de production d'antigènes *Haemophilus influenzae* type b

La présente invention est relative à un procédé, pour la production à l'échelle industrielle, de polysaccharides capsulaires de *Haemophilus influenzae* type b (Hib) , selon lequel une souche de Hib est cultivée dans un milieu de culture particulier, dont la composition est chimiquement définie et qui ne comprend donc aucune source complexe d'azote ou de carbone.

On connait dans l'art antérieur, et notamment dans la demande WO2009007641, des milieux de culture améliorés pour *Haemophilus influenzae* type b, qui ne comprennent pas d'élément de source animale, ainsi que cela est recommandé lorsque la culture de *Haemophilus influenzae* type b a pour but de produire du polysaccharide capsulaire qui sera ensuite introduit comme antigène dans la composition d'un vaccin. Dans les milieux décrits dans cet art antérieur, la source d'azote habituellement constituée par des peptones animales est remplacée par des peptones végétales.

De tels milieux représentent de grands progrès pour la sécurité des produits pharmaceutiques en ce qui concerne notamment l'élimination du risque de transmission de maladies telles que l'encéphalite spongiforme bovine ; ils permettent donc de répondre aux recommandations des autorités de santé.

Cependant, la composition des peptones est susceptible de variations suivant les lots fournis, ce qui peut entrainer des variations dans les quantités de bactéries produites ainsi que dans les rendements en antigènes d'intérêt, ce que les producteurs de vaccins essaient de limiter ou de corriger en modifiant certains paramètres lors de la mise en oeuvre du procédé. Cependant, dans le cadre de la production industrielle d'un produit pharmaceutique, il est souhaitable de pouvoir disposer de procédés robustes nécessitant le moins de modifications possible à chaque mise en oeuvre, et dont les résultats à chaque étape sont reproductibles d'un lot à l'autre.

De tels procédés doivent également permettre des rendements compatibles avec une rentabilité industrielle, le critère n'étant pas, dans le cas de production d'antigènes à partir de bactéries, d'obtenir uniquement la plus grande quantité possible de bactéries, mais également d'obtenir le meilleur rapport entre le titre en antigènes et la quantité de bactéries produites ; il est donc souhaitable que la bactérie soit cultivée dans des conditions orientant son métabolisme vers la production de polysaccharide capsulaire.

A cette fin, la présente invention a pour objet un procédé pour la production à l'échelle industrielle, de polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* type b (PRP) destiné à des fins vaccinales, selon lequel on cultive une souche d'*Haemophilus influenzae* type b (Hib) dans un milieu de culture, on recueille le surnageant de culture que l'on traite pour en extraire le polysaccharide capsulaire, ledit milieu de culture comprenant au moins :

- une source de carbone,
- de la protoporphyrine,
- des sels,
- des acides aminés,
- du NAD ou NADH,
- des vitamines,
- des moyens de régulation du pH,

caractérisé en ce que ledit milieu de culture est chimiquement défini.

Grâce à l'invention, on peut à la fois, disposer d'un procédé industriel robuste, et augmenter la production de polyoside capsulaire sans avoir à augmenter la biomasse en conséquence, ce qui permet de réduire la quantité de lipopolysaccharides (LPS) produits par rapport à la quantité de PRP produit.

En outre, l'absence de protéines dans la composition du milieu de culture réduit les besoins nécessaires en produit anti mousse et simplifie l'étape de purification qui permet, à partir du surnageant de culture, d'obtenir l'antigène constitué par le polyoside capsulaire.

Selon l'invention, le milieu de culture comprend des moyens de régulation du pH. Ces moyens de régulation du pH peuvent être constitués par des sels tampon et/ou par des moyens de mesure du pH associés à des moyens d'ajouter au milieu soit un acide, soit une base. Grâce à la régulation du pH, les rendements peuvent être optimisés.

Selon un mode de réalisation, le procédé selon l'invention consiste en outre à conjuguer le PRP produit à une protéine porteuse, telle que la protéine tétanique.

L' invention a également pour objet un procédé de préparation d'une composition vaccinale, selon lequel :

- on prépare, à l'échelle industrielle, un antigène contre *Haemophilus influenzae* type b (Hib), constitué par le polysaccharide capsulaire (PRP), en mettant en culture une souche de Hib dans un milieu chimiquement défini dont la nature et la quantité de chacun des composants est parfaitement définie et comprenant au moins :
  - une source de carbone,
  - de la protoporphyrine,
  - des sels,
  - des acides aminés,
  - du NAD ou NADH,
  - des vitamines,
  - ainsi que des moyens de régulation du pH,
- on recueille le surnageant de culture que l'on traite pour en extraire le polysaccharide capsulaire purifié,
- on conjugue le polysaccharide capsulaire à une protéine porteuse.

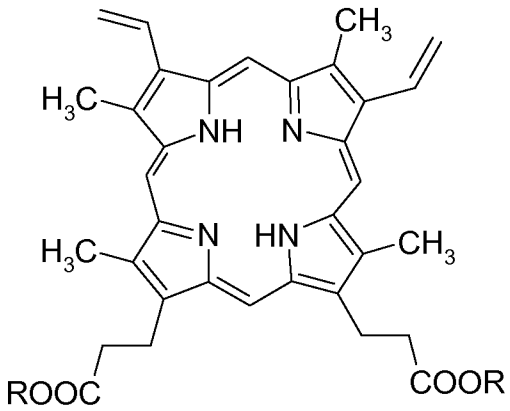
Selon un mode de réalisation, on combine en outre le conjugué obtenu à au moins un ou plusieurs antigènes destinés à la vaccination contre une ou plusieurs des infections suivantes : diphtérie, tetanos, polio, Hépatite B, varicelle, oreillons, rubéole, infections provoquées par *Neisseria meningitidis* ou *Streptococcus pneumoniae,* infections provoquées par le rotavirus, afin d'obtenir une combinaison vaccinale permettant l'immunisation simultanée contre plusieurs maladies.

Selon l'invention, le milieu de culture est chimiquement défini, c'est-à-dire que la structure chimique ainsi que la quantité de chacun des composants est connue. Un tel milieu est dépourvu de source complexe d'azote ou de carbone, telles que les peptones, caséines, sérums ou autres et peut donc, si cela est souhaité, être garanti ne contenir aucun élément provenant directement d'un animal.

L'invention est relative à un procédé pour la production, à l'échelle industrielle, de polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* de type b. Un tel procédé permet d'obtenir des rendements en biomasse et en polysaccharides capsulaire ou PRP compatibles avec des contraintes industrielles. Un tel procédé permet notamment d'obtenir, à partir d'une souche de *Haemophilus influenzae* de type b possédant dans son code génétique au moins 2 copies du locus *cap* codant pour les fonctions permettant la synthèse capsulaire, sans régulation particulière du milieu, (telles que pH ou pO_2), une biomasse correspondant à une D.O. à 694 nm d'au moins 2.4, après 12 heures de culture, et une quantité de PRP associée d'au moins 240 mg/litre de milieu de culture. La détermination de la quantité de PRP produite étant mesurée par une technique de chromatographie haute performance d'échanges d'anions couplé à un détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC-PAD) (Dionex), ou une méthode donnant des résultats équivalents. Avantageusement, le procédé selon l'invention permet d'obtenir une quantité de PRP d'au moins 270 mg/litre de milieu, et plus avantageusement encore une quantité d'au moins 300 mg/litre.

Parmi les sources possibles pour le carbone, on peut citer toutes celles métabolisables par la souche de *Haemophilus influenzae* type b et notamment: le glucose, le fructose, le galactose, le glycérol, le xylose, le ribose, le fucose, l'acide sialique, le lactate. On peut également utiliser 2 ou plusieurs sources différentes, notamment du lactate et du glucose. Selon l'invention, la quantité de glucose présente dans le milieu au départ est comprise entre 5 et 25g/l, plus particulièrement de 10 à 20g/l, et plus particulièrement de 12 à 16g/l.
La quantité de lactate présente dans le milieu au départ peut être comprise entre 0 et 15g/l, et plus particulièrement de 0.5 à 10g/l.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la protoporphyrine du milieu est de la protoporphyrine synthétique par exemple celle fournie par la société Sigma Aldrich sous la référence 258385 (Protoporphyrin disodium salt). Ainsi, il est possible d'utiliser un milieu que l'on peut garantir être complètement dépourvu de substance d'origine animale. Alternativement, on utilise de la Protoporphyrine IX de synthèse, dont la formule est la suivante :



où R désigne H, ou un contre-ion, de préférence un contre-ion de métal alcalin , en particulier le sodium.

Une telle protoporphyrine IX, et sa méthode de préparation, ont été décrites dans la demande de brevet FR2914302.

Selon l'invention, la quantité de protoporphyrine présente dans le milieu au départ est avantageusement comprise entre 0.1 et 10 mg/l, et plus particulièrement entre 0.25 et 2 mg/L.

Le milieu de culture selon l'invention comprend des sels qui apportent les minéraux nécessaires à la croissance cellulaire, permettent d'assurer une pression osmotique favorable à la bactérie, et qui exercent en outre un pouvoir tampon sur le pH.

De façon préférée, on utilise un mélange de cations monovalents tels que Na^+ et/ou K^+, de cations divalents tels que Ca^{++}, Mg^{++}, Co^{++}, Zn^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, d'anions phosphate sous la forme HPO_4^{--}, H_2PO4^- et/ou $PO4^{---}$ et d'anions SO_4^{--}, et Cl^- sous forme de solutions salines dont les molarités de chacune d'entre elles peuvent varier habituellement dans une gamme de concentration allant de 10^{-4} mM à 1000 mM.

Les sels présents dans le milieu de culture sont notamment choisis parmi : K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $MgSO_4$, 7 H_2O ; Na_2HPO_4, 12 H_2O ; NaH_2PO_4, 2 H_2O ; $CaCl_2$, 2 H_2O; $FeSO_4$, 7 H_2O ; $ZnSO_4$, 7 H_2O ; $CoCl_2$, 6 H_2O; $MnSO_4$, H_2O.

Les concentrations en sels sont choisies afin d'avoir une osmolarité comprise entre 200 et 700 milliosmole/l, en particulier entre 300 et 400 milliosmole/l, notamment 350 milliosmoles/l, et un pH allant de 6.5 à 7.5.

Pour cela, le milieu de culture selon l'invention peut comprendre en particulier :

- $MgSO_4$, 7 H_2O à une concentration comprise entre 150 et 1500 mg/l,
- $CaCl_2$, 2 H_2O à une concentration comprise entre 6.5 et 52 mg/l,
- $FeSO_4$, 7 H_2O à une concentration comprise entre 1.25 et 10 mg/l,
- $ZnSO_4$, 7 H_2O à une concentration comprise entre 2.5 et 80 mg/l,
- du $CoCl_2$, 6 H_2O entre 0.5 et 2 mg/l,
- du $MnSO_4$, H_2O entre 2.5 et 10 mg/l.
- du sodium sous forme notamment de lactate de sodium à 60% en quantité comprise entre 0 et 4 ml/l.
- K_2HPO_4 et KH_2PO_4 à une concentration comprise pour chacun d'entre eux entre 100 et 1200 mg/litre lorsque l'effet tampon est assuré par les Na_2HPO_4, 12 H_2O /NaH_2PO_4, 2 H_2O .
- Na_2HPO_4, 12 H_2O à une concentration comprise entre 15 et 120 g/l,
- NaH_2PO_4, 2 H_2O à une concentration de 10 à 30 fois inférieure à Na_2HPO_4, 12 H_2O.

Alternativement, il est possible que l'effet tampon soit assuré par le couple K_2HPO_4 / KH_2PO_4 ; dans ce cas, la concentration de K_2HPO_4 est comprise entre 15 et 120 g/l, et la concentration de KH_2PO_4 est inférieure de 10 à 30 fois celle de K_2HPO_4 ; la concentration de Na_2HPO_4, 12 H_2O et de NaH_2PO_4, 2 H_2O peut alors être comprise entre 100 et 1200 mg/litre.

Parmi les sels cités, on a pu noter que la présence de Zinc était particulièrement avantageuse pour la production de biomasse et de PRP. En particulier, en concentration allant de 2.5 à 80 mg/l, ou plus particulièrement de 5 à 20 mg/l. De très bons résultats ont été obtenus à une concentration de 20 mg/l.

Dans le cas où le pH du milieu de culture est régulé lors de la phase de culture, par ajout notamment d'une base fortement concentrée telle que NaOH ou KOH, il est possible de réduire la quantité de sels présents dans le milieu, et notamment la quantité des couples tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, ou K_2HPO_4/ KH_2PO_4, à condition toutefois de maintenir

l'osmolarité à une valeur convenable, c'est-à-dire entre 200 et 700 mOsm/l, par un ajout éventuel de NaCl.

Selon l'invention, le milieu de culture comprend également du NAD ou une source de NAD, ou de toute autre coenzyme équivalente. Le NAD (ou β-nicotinamide adenine dinucleotide) encore appelé coenzyme I ou facteur V est un facteur de croissance essentiel à la culture de *Haemophilus influenzae* type b. Il est avantageusement présent à une concentration comprise entre 0.5 et 50 mg/l, et plus particulièrement entre 2 et 10 mg/l, en particulier 5 mg/l de milieu de culture. Il peut être apporté au milieu sous sa forme réduite de NADH. Alternativement au NAD, le milieu de culture selon l'invention peut comprendre des éléments précurseurs du NAD que les bactéries seront capables d'utiliser tels que du NADP/NADPH (β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) ou du NMN (β-nicotinamide adenine mononucleotide) ou du NR (nicotinamide riboside), du 3-Acetylpyridine Adenine Dinucleotide (APAD) ou du 3-Acetylpyridine Mononucleotide (APMN).

Selon l'invention, le milieu de culture contient des acides aminés qui sont avantageusement choisis parmi : l'arginine, l'alanine, la lysine, l'histidine, le tryptophane, la valine, l'isoleucine, la leucine, la tyrosine, la phenylalanine, la cystine (ou un équivalent), l'asparagine, la glutamine, l'acide aspartique, l'acide glutamique.
Une formulation du milieu de culture selon l'invention comprend de l'arginine, de l'alanine, de l'histidine, du tryptophane, de la tyrosine, de la phenylalanine, de la cystine, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique uniquement. Alternativement, l'ensemble des acides aminés cités est présent dans le milieu de culture.
Selon un mode particulier de l'invention, la cystine est remplacée par du glutathion ou de la cystéine.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention met en oeuvre un milieu de culture dépourvu des acides aminés suivants : L- Methionine, L-Glycine, L-Proline, L-Serine, et L-Threonine. En effet, la présence de ces acides aminés a conduit à une augmentation de la biomasse, mais pas à une augmentation correspondante de la production de PRP.

Les acides aminés sont fournis sous forme de poudres très pures fournies par Sigma. De façon particulièrement avantageuse, ces acides aminés ont une origine synthétique ou ont été obtenus grâce à des procédés garantissant le fait qu'ils ne contiennent aucun élément provenant directement d'un animal, afin d'exclure tout risque de contamination par des infections transmissibles, et notamment par l'ESB (Encephalite Spongiforme Bovine).
Les quantités de chaque acide aminé sont choisies afin d'optimiser la croissance cellulaire et la production de PRP. Les quantités d'acide aspartique, d'asparagine et de glutamine sont choisies de manière à entrainer une carence lors de la culture cellulaire, ce qui permet d'orienter le métabolisme de la cellule vers la production de polysaccharide capsulaire, alors que les quantités des autres acides aminés sont choisies de manière à ce qu'il n'y ait pas de carence durant la phase de culture.

Selon l'invention, le milieu de culture contient en outre des vitamines qui sont choisies parmi : la thiamine, le pantothenate, l'uracile, l'hypoxanthine, la biotine, la riboflavine et la pyridoxine. Au sens de l'invention, le terme de vitamines englobe également l'uracile et l'hypoxanthine qui sont des bases azotées.
De façon particulièrement avantageuse, les vitamines présentes dans le milieu de culture selon l'invention ont une origine non-animale , en particulier une origine synthétique ce qui permet d'exclure tout risque de contamination par des infections transmissibles, et notamment par l'ESB (Encephalite Spongiforme Bovine). On utilise notamment des vitamines fournies par Sigma dont le degré de pureté est connu avec précision, ce qui permet un dosage très précis lors de la préparation du milieu de culture.
Les quantités de vitamines présentes dans le milieu sont choisies afin d'optimiser la production de biomasse et de PRP.

Selon un mode particulier de l'invention, le milieu de culture comprend de la citrulline qui peut se substituer à l'arginine et à l'uracile .
Dans ce cas, la quantité de citrulline comprise dans le milieu de culture est avantageusement comprise entre 150 et 500 mg/l.

Grâce au milieu de culture selon l'invention, on a pu produire du Polyribosyl-Ribitol-Phosphate en quantité plus importante que lors de l'utilisation de milieux selon l'art

antérieur, tout en ne consommant pas plus de carbohydrate, et en ne produisant pas plus de contaminant, notamment de LPS.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la souche de *Haemophilus influenzae* type b mise en culture est une souche capsulée possédant dans son code génétique au moins 2 copies du locus *cap*. Ce locus *cap*, d'une taille comprise entre 17 et 18 kb regroupe des genes dont l'expression est liée à la synthèse et à l'exportation de la capsule.
L'expression de la capsule donne une couleur blanche à la bactérie lorsqu'elle est cultivée sur gélose spécifique ; les colonies de bactéries possédant ce locus *cap* sont de ce fait nommées « colonies blanches », alors que les bactéries n'exportant pas le polyoside capsulaire à la surface de la capsule sont appelées « colonies grises ».
L'expression de la capsule est soumise à une instabilité génétique potentielle, pouvant entrainer l'apparition de mutants déficiants en capsule, ce qui entrainerait par conséquent une baisse de la production en PRP. Des études ont permis de démontrer que le milieu chimiquement défini mis en oeuvre dans le procédé selon l'invention permettait d'assurer une bonne stabilité génétique de la souche utilisée au cours d'une vingtaine de générations cellulaires.

Selon l'invention, on peut procéder à la culture de la bactérie d'*Haemophilus influenzae* de type b en plusieurs étapes successives de manière à augmenter progressivement la biomasse.
Dans ce cas, les bactéries provenant d'un lyophilisat ou d'un congelât sont ensemencées dans un volume de milieu n'excédant généralement pas 1 litre. Au bout d'une nuit de culture ou lorsque la densité optique du milieu est suffisante, on transfère cette première culture dans un second milieu de culture identique au premier, mais dont le volume peut être jusqu'à 10 à 20 fois plus grand. La quantité de bactéries ensemencées dans le second milieu est ajustée de telle sorte que la densité optique (D.O.) initiale du second milieu de culture à 694 nm soit comprise entre 0,2 et 0,4 pour favoriser une croissance rapide de la population bactérienne. Cette deuxième culture est habituellement réalisée en fermenteur mais d'autres types de récipients peuvent être utilisés (flasks, spinners,...). Lorsque la culture est effectuée en fermenteur, on utilise habituellement pendant la durée de la culture une température de 37 °C +/- 1°C, une agitation constante, une pression de 0,1

bar, une pO_2 de 30% et un débit d'air de 0,25 volume de gaz par volume de milieu par minute. Il est de la compétence de l'homme de l'art de choisir d'autres paramètres pour ce type de culture. A la fin de la phase exponentielle de croissance bactérienne, on peut encore amplifier la biomasse en la transférant dans un autre fermenteur de plus grande capacité en utilisant la même procédure et ainsi de suite. Les volumes de culture obtenus peuvent atteindre, voire dépasser 1000 litres. La(les) culture(s) est (sont) généralement réalisée(s) selon le mode « Batch ».

On prélève finalement le surnageant de la dernière culture après inactivation des bactéries. L'inactivation est classiquement réalisée à l'aide d'une solution de formol à une concentration finale de 0,35%-0,37% (V/V). Le surnageant est classiquement séparé des bactéries par une étape de centrifugation. Le PRP contenu dans le surnageant résultant est ensuite extrait et purifié selon des procédés classiques bien connus de l'homme du métier.

Le PRP récolté et purifié est ensuite avantageusement conjugué à une protéine porteuse telle que la protéine tétanique, afin de le rendre T-dépendant et permettre notamment l'immunisation de jeunes enfants. L'antigène PRP-T ainsi obtenu peut ensuite être utilisé seul dans un vaccin monovalent, ou être combiné à d'autres antigènes afin de permettre la vaccination simultanée contre plusieurs maladies.

De façon particulièrement avantageuse, la présente invention propose un procédé de préparation d'une composition vaccinale selon lequel on combine le conjugué obtenu à au moins un ou plusieurs antigènes présents habituellement dans les vaccins pédiatriques, et notamment des antigènes contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyelite, l'Hépatite B, les infections engendrées par *Neisseria meningitidis* ou par *Streptococcus pneumoniae,* la varicelle, les oreillons, la rubéole, les infections provoquées par un rotavirus...

Selon un mode de réalisation, le conjugué PRP-T est présent sous forme de poudre alors que les autres antigènes sont sous forme liquide, l'ensemble des antigènes étant mélangé extemporanément avant administration ; selon un mode de réalisation alternatif, la composition vaccinale est entièrement liquide.

Le procédé de préparation selon l'invention permet ainsi de préparer une combinaison vaccinale quadrivalente comprenant, en plus du conjugué PRP-T, des antigènes de la diphtérie, du tétanos, de l'hépatite B. Alternativement, il permet de préparer une combinaison vaccinale quadrivalente, comprenant, en plus du conjugué PRP-T, de

l'anatoxine diphtérique, de l'anatoxine tétanique, les antigènes acellulaires de Bordetella pertussis au nombre de 2 (anatoxine et l'hémagglutinine filamenteuse), ou 3 (les 2 précédents + pertactine) ou encore 5 (les 3 précédents + les aggutinogènes).
Il permet aussi de préparer une combinaison vaccinale pentavalente comprenant, en plus du conjugué PRP-T, de l'anatoxine diphtérique, de l'anatoxine tétanique, les antigènes acellulaires de Bordetella pertussis au nombre de 2, 3 ou 5, ainsi que les virus inactivés de la polio de type 1, 2 et 3.

Il permet aussi de préparer une combinaison vaccinale hexavalente comprenant en plus du conjugué PRP-T, de l'anatoxine diphtérique, de l'anatoxine tétanique, les antigènes acellulaires de Bordetella pertussis au nombre de 2, 3 ou 5, de l'hépatite B, ainsi que les virus inactivés de la polio de type 1, 2 et 3. Une telle combinaison hexavalente peut notamment être liquide et comprendre par dose de 0.5ml :

- l'anatoxine diphtérique en quantité de 20 UI,
- l'anatoxine tétanique en quantité de 40 UI,
- l'antigène de surface de l'hépatite B à raison de 10µg,
- l'anatoxine de Pertussis à raison de 25µg,
- l'hémagglutinine filamenteuse de Pertussis à raison de 25µg,
- du PRP-T à raison de 12µg de PRP,
- les virus polio inactivés de type 1, 2 et 3 en quantité respective de 40, 8 et 32 DU,
- de l'hydroxyde d'aluminium à raison de 0.6 mg d'Al^{3+}.

Alternativement, il permet de préparer des combinaisons vaccinales dans lesquelles les antigènes de la coqueluche sont constitués par la bactérie entière *Bordetella pertussis*.

Grâce au procédé de culture selon l'invention, il est possible d'accroitre la production de Polyribosyl Ribitol Phosphate, sans augmenter la quantité de biomasse ce qui permet de réduire la quantité de LPS contaminants ; cet avantage du procédé selon l'invention est très important pour l'industrie du vaccin, où ces produits sont introduits comme antigènes dans des compositions vaccinales, et où les quantités de LPS doivent être réduites au minimum. Le fait de disposer d'un procédé permettant de ne pas augmenter

la quantité de LPS produit pour une quantité supérieure de PRP offre la possibilité de simplifier le procédé de purification subséquent.

Exemple 1 : Préparation d'un milieu de culture selon l'invention

On a préparé un milieu de culture selon l'invention à partir d'un milieu de base auquel on a rajouté extemporanément des solutions d'enrichissement.

La composition du milieu de base est indiquée dans le tableau I ci-après :

Tableau I :

Composés	**Quantités en mg pour 1l**	**fournisseur**	**ref. produit**
Lactate de sodium à 60%	1,5 ml	Prolabo	27925.292
K_2HPO_4	300	VWR Prolabo	26931.263
KH_2PO_4	300	VWR Prolabo	26923.298
$MgSO_4$ $7H_20$	368	VWR Prolabo	25165.260
Na_2HPO_4 $12H_2O$	28620	VWR Prolabo	28028.298
NaH_2PO_4 $2H_2O$	1870	VWR Prolabo	28015.294
L-Arginine	87	Sigma	A5006 ou A8094
L-Alanine	134	Sigma	A7627 ou A7469 ou A4349
L-Asparagine	198	Sigma	A0884 ou A7094
L-Lysine	140	Sigma	L5626 ou L8662 ou L7039
L-Glutamine	220	Sigma	G3126 ou G8540 ou G5792
L-Histidine	78	Sigma	H8000 ou H6034 ou H3911

L-Tryptophane	200	Sigma	T0254 ou T8941 ou T4196
L-Valine	115	Sigma	V0500 ou V0513 ou V4638
L-Isoleucine	130	Sigma	I2752 ou I7403 ou I5281
L-Leucine	130	Sigma	L8000 ou L6914 ou L8912
L-Tyrosine	180	Sigma	T3754 ou T8566 ou T4321
L-Phenylalanine	165	Sigma	P5482
L-Cystine	61	Sigma	C8755 ou C7602 ou C5735
L-acide aspartique	1065	Sigma	A9256 ou A5474
L-acide glutamique	1471	Sigma	G1251 ou G8415
Pyridoxine HCl	4	Sigma	P5669
Riboflavine	0,2	Sigma	R4500
Thiamine HCl	4	Sigma	T4625
Biotine	4	Sigma	B4501
Pantothenate de Ca	4,5	Sigma	P5710
Uracil	70	Sigma	U0750
Hypoxanthine	20	Sigma	H9377
$FeSO_4$ $7H_2O$	2,5	Adrich	450278
$ZnSO_4$ $7H_2O$	5	Sigma	Z4750
$CoCl_2$ $6H_2O$	1	Fulka	60818
$MnSO_4$ H_2O	5	Sigma	M7634
$CaCl_2$ $2H_2O$	13	Panreac	131232.1211

Pour préparer 1 litre de milieu, on a ajouté, dans environ 100 ml d'eau déminéralisée, sous agitation grâce à un barreau aimanté, les différents composés suivant l'ordre décrit dans le tableau ci-dessus. Avant ajout, toutes les poudres avaient été au préalable dissoutes dans un faible volume d'eau déminéralisé avec, dans certains cas, ajout d'acide ou de base.

Ainsi, pour la Valine, l'Isoleucine et la Leucine, il a été nécessaire d'ajouter aux quantités indiquées dans le tableau 140µl de KOH 10N ; à la Tyrosine, il a fallu ajouter 280 µl de KOH 10N ; à la Phenylalanine, il a fallu ajouter 210 µl de HCl à 37%, et à la Cystine, il a fallu ajouter 70µl de HCl à 37%.

Au final, on a ajusté le pH à 7,2 ± 0,1 avec de la KOH 10 N (dans le cas où le pH aurait été trop élevé, on aurait utilisé de l'HCL 37 %), puis on a complété au volume désiré avec de l'eau déminéralisée.

Le milieu a ensuite été stérilisé grâce à une filtration sur filtre ayant un seuil de coupure à 0.22 µm .

Le milieu a ainsi pu être conservé 72 heures à 5 °C.

Avant l'inoculation du milieu, on a ajouté:

- 27.3 ml de glucose à 512.8 g/l préparé à partir de D(+) glucose anhydre fourni par la Société VWR sous la référence 24379.294,
- 5 ml d'une solution de NAD à 1 g/l, fourni par la Société Sigma sous la dénomination β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide hydraté (ref. 43410),
- 4 ml d'une solution-mère comprenant de la Protoporphyrine à la concentration de 0.25 g/l et de l'hydroxyde d'ammonium à la concentration de 5 ml/l ; la protoporphyrine étant fournie par la Société Sigma Aldrich sous la dénomination Protoporphyrine IX disodium salt (ref. 258385) et l'hydroxyde d'ammonium par la société VWR sous la dénomination Ammoniac solution 28 % (ref. 21190.292),

afin d'obtenir 1 litre de milieu prêt à être inoculé, et comprenant, outre les éléments décrits dans le Tableau I précédent, les éléments additionnels suivants avec les concentrations telles qu'indiquées dans le tableau II ci-après :

Tableau II :

Composés	**Concentration avant inoculation dans le milieu**
Protoporphyrine	1 mg/l
Ammoniaque	17.7 µg/l
Glucose anhydre	14 g/l
NAD	5 mg/l

Exemple 2 : Préparation d'un milieu de culture selon l'art antérieur.

On a préparé un milieu de culture selon l'art antérieur en ajoutant à un milieu de base des solutions spécifiques d'enrichissement.

La composition du milieu de base est indiquée dans le tableau III ci-après.

Tableau III :

Composés	Concentration dans le milieu de base
Peptone de pois	7,42 g/l
Lactate de Sodium 60 %	1,5 ml/l
Na_2HPO_4 $12H_2O$	31,14 g/l
NaH_2PO_4 $2H_2O$	2,03 g/l
Cystine (L)	0,07 g/l
HCl (10N)	0,07 ml/l
Tryptophane (L)	0,02 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	1 g/l
$MgSO_4$ $7H_2O$	0,4 g/l
$CaCl_2$ $2H_2O$	0,02 g/l

Pour préparer ce milieu de base, on a ajouté à 100 ml d'eau déminéralisée maintenue sous agitation grâce à un barreau aimanté, chacun des éléments suivant l'ordre dans lequel ils sont indiqués dans le tableau. Auparavant, chacun des éléments, fourni sous forme de poudre, avait été dissous dans un faible volume d'eau déminéralisée.

La peptone de pois provient de la Société Kerry et est commercialisée sous la référence Hy-pea 7404. Le $(NH_4)_2SO_4$ est fourni par la Société VWR sous la référence 21333.296. Les autres éléments proviennent des mêmes fournisseurs et sont fournis sous les mêmes références que celles décrites dans l'exemple 1 pour la préparation du milieu selon l'invention.

Le pH final a été ajusté à 7,2 ± 0,1 avec de la KOH 10N (dans le cas où le pH aurait été trop élevé, on aurait utilisé de l'HCL 37 %).

On a, ensuite, ajouté de l'eau déminéralisée afin d'obtenir le volume désiré, puis on l'a stérilisé par autoclavage, suivant un cycle de 30 minutes à 120 °C.

Une fois stérilisé, le milieu a pu être conservé 15 jours à 4 °C.

A ce milieu de base ont été ajoutées les solutions d'enrichissement A, B, C et D.
La solution A est une solution comprenant du glucose anhydre à la concentration de 512.8 g/l, fournie par la Société VWR sous la dénomination D(+) glucose anhydre (ref. 24379.294).
La solution B est une solution-mère comprenant du NAD à la concentration de 1 g/l, fournie par la Société Sigma sous la dénomination ß-Nicotinamide Adenine Dinucléotide hydraté (ref. 43410).
La solution C est une solution-mère comprenant de la Protoporphyrine à la concentration de 0.25 g/l et de l'hydroxyde d'ammonium à la concentration de 5 ml/l ; la protoporphyrine étant fournie par la Société Sigma Aldrich sous la dénomination Protoporphyrine IX disodium salt (ref. 258385) et l'hydroxyde d'ammonium par la société VWR sous la dénomination Ammoniac solution 28 % (ref. 21190.292).
La solution D est une solution concentrée comprenant de l'ultrafiltrat d'extrait autolytique de levure (Ufel) à 125 g/l ; elle est fournie par la Société Biospringer sous la dénomination Ultrafiltrat d'extrait autolytique de levure (Ufel) (Ref. springer 0701).

Chacune de ces solutions est stérilisée par filtration sur filtre dont le seuil de coupure est de 0.22µm.
On a ajouté à 1 litre de milieu de base :

- 35.1 ml de solution A
- 5 ml de solution B
- 4 ml de solution C
- 40 ml de solution D

L'ajout de chacune des solutions au milieu de base a été réalisé sous hotte à flux laminaire et a conduit à un milieu de culture ayant avant inoculation, outre les éléments mentionnés dans le tableau III précédent, les éléments additionnels suivants dans la concentration indiquée dans le tableau IV ci-après :

Tableau IV :

Composés	**Concentration avant inoculation dans le milieu**
Ultrafiltrat d'extrait autolytique de levure (Ufel)	4,9 g/l
Protoporphyrine	1 mg/l
Ammoniaque	17.7µg/l
Glucose anhydre	18 g/l
NAD	5 mg/l

Exemple 3 : Comparaison de la production de PRP avec un milieu selon l'invention tel que décrit à l'exemple 1 et un milieu de l'art antérieur tel que décrit à l'exemple 2.

On a réalisé ces expériences comparatives selon un protocole de culture en 2 étapes:

- une étape de préculture en Erlenmeyer en verre de 1 litre sans baffle, à 36°C sous agitation à 130 rpm (rotations par minute), pendant une durée de 8 heures à l'issue de laquelle la souche est en fin de phase linéaire de croissance ; cette préculture est initiée par l'inoculation de 280 ml de milieu de culture par un inoculum de bactéries d'*Haemophilus influenzae* type b contenant au moins 2 copies du locus *cap*, à une concentration de 0.5% (volume/volume).
- puis un transfert de 90 ml de la préculture a permis d'ensemencer un fermenteur Biostat B plus de 2 litres contenant 1.8 litres de milieu de culture. Ce fermenteur a été maintenu à 37° C, sous agitation de 400 rpm avec une aération de 0.45 lpm (litre par minute) pendant 12 heures.

Après 12 heures de culture, on a mesuré la D.O. à 694 nm, ce qui a permis de déterminer la biomasse. En effet, lors d'essais précédents, on a pu déterminer qu'une unité de la densité optique mesurée à 694 nm correspondait à 0.64 g de biomasse (masse sèche)/ litre.

On a déterminé la quantité de PRP total dans le surnageant de culture par chromatographie haute performance d'échange d'anions couplé à un détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC-PAD, selon une méthode très proche de celle décrite

dans la publication de Sturgess *et al.* (Vaccine 17 (1999) 1169-1178) . Le surnageant de culture a été filtré par passage sur filtre 0,22 µm puis 500 µl de surnageant a été ultrafiltré via l'utilisation de colonnes Amicon ultra avec un seuil de coupure de 10 KDa (millipore ref. UFC5010BK) et soumis ensuite à une étape d'hydrolyse basique par ajout de NaOH.

L'hydrolyse s'est déroulée à température ambiante durant au minimum 4 heures.

La validité du dosage a été contrôlée par l'utilisation d'un étalon interne, la glucosamine 1 phosphate (GlcN1P), présent dans la solution d'hydrolyse et par le passage régulier d'un contrôle interne ayant une concentration en PRP connue. Par rapport aux indications de Sturgess *et al*, la phase mobile était composée de NaOH 35 mM et de CH_3COONa 114 mM et la phase de régénération a été effectuée durant 10 minutes avec NaOH 100 mM et CH_3COONa 400 mM.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau V ci-après :

Tableau V :

	Milieu selon l'invention (4 essais)	**Milieu de l'art antérieur (1 essai)**
D.O. à 694 nm	2,52 ± 0.14	3,9
Biomasse en g de masse sèche/ litre de milieu de culture	1,74 ± 0.09	2,6
Concentration en PRP en mg/ litre de milieu de culture	349 ± 22	169
Production spécifique en mg de PRP/g de biomasse	199 ± 3	66

Ces résultats montrent l'intérêt du procédé selon l'invention pour la productivité du PRP : on remarque en effet, que pour un même volume de milieu de culture, si la biomasse obtenue était plus importante avec un milieu de culture selon l'art antérieur, la quantité de PRP était par contre plus faible.

Exemple 4 : Comparaison de la quantité de PRP et de LPS présente dans un surnageant de culture selon le procédé de l'invention, et dans un surnageant de culture selon un procédé de l'art antérieur.

On a procédé à la mise en culture de *Haemophilus influenzae* type b de façon comparative avec un milieu selon l'invention, et avec un milieu selon l'art antérieur, de la manière décrite à l'exemple 3, avec cependant la différence que le milieu de base du procédé selon l'art antérieur comprenait 10 g/l d'hydrolysat acide de caséine fourni par la Société Solabia (ref. A1434) à la place de la peptone de pois présente dans le milieu selon l'exemple 3.

Le temps de pré-culture est, comme à l'exemple 3, de 8 heures, et celui de culture de 12 heures.

Les dosages de PRP et de LPS sont tous deux effectués par HPAEC-PAD ; mais le dosage de LPS est réalisé par quantification d'un monosaccharide particulier, l'heptose, à partir d'une gamme étalon de LPS purifié ayant subi le même protocole, le contrôle interne étant pour ce dosage du rhamnose.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau VI ci-après :

Tableau VI :

	Milieu selon l'invention (4 essais)	**Milieu selon l'art antérieur (3 essais)**
DO à 694 nm	2.5 ± 0.1	3.9 ± 0.3
Biomasse en g de masse sèche/l de milieu	1.7 ± 0.1	2.5 ± 0.2
Concentration en LPS en mg/l de milieu	5 ± 1	4.6 ± 1
Concentration en PRP en mg/l de milieu	349 ± 22	17 ± 5
Rapport PRP/LPS	74 ± 15	38 ± 6

Les résultats obtenus montrent l'intérêt du procédé selon l'invention, qui permet de réduire la quantité de LPS produits par rapport à la quantité de PRP.

Ceci représente un avantage important du procédé selon l'invention, car cela simplifie beaucoup les opérations de purification, tout en maintenant un niveau de sécurité approprié.

Exemple 5 : Essai permettant d'évaluer l'importance du Zinc.

On a étudié l'importance de la présence de Zinc dans le milieu de culture.

A cet effet, on a comparé 3 milieux :

- un milieu tel que celui décrit à l'exemple 1 appelé MS,
- un milieu ayant une composition identique à celui de l'exemple 1 mais sans le $ZnSO_4$, appelé MS Zn-,
- un milieu tel que celui décrit à l'exemple 1 mais avec une concentration en $ZnSO_4$ 4 fois supérieure, soit 20 mg/l et appelé MS Zn++.

Les milieux ont ensuite été stérilisés grâce à une filtration sur un filtre ayant un seuil de coupure à 0.22 µm.

On a tout d'abord procédé à une étape de préculture en Erlenmeyer en verre de 1 litre, sans baffle, pendant 16 heures à 36°C sous agitation à 130 rpm, en ensemençant 280 ml d'un milieu tel que décrit à l'exemple 4 par un congelât de bactéries *Haemophilus influenzae* type b possédant dans son code génétique au moins 2 copies du locus *cap*.

Puis 9,5 ml de pré-culture ont été lavés dans chacun des milieux de culture à tester avant l'ensemencement pour la culture qui s'est déroulée à chaque fois dans un Erlenmeyer bafflé de 500 ml en polycarbonate contenant 170 ml du milieu de culture à tester ; la culture a été effectuée pendant 12 heures à 37 °C et une agitation à 150 rpm.

On a, pour chaque milieu, déterminé la biomasse, la concentration en PRP ainsi que la quantité de LPS en fin de culture, de la même manière que décrit aux exemples 3 et 4, et calculé les rapports PRP/biomasse ainsi que LPS/biomasse et PRP/LPS.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau VII ci-après :

Tableau VII :

	MS	**MS Zn-**	**MS Zn++**
Biomasse en g de masse sèche/litre de milieu de culture	1.98	1.23	2.22
Concentration en PRP en mg/litre de milieu de culture	319	203	372
Production spécifique en mg de PRP/g de biomasse	160	165	167
Concentration en LPS en mg/litre de milieu de culture	11.5	8.8	12.1
Rapport de LPS/biomasse en mg/g de biomasse	6.1	7.2	5.5
Rapport de PRP/LPS en mg/mg	30	23	31

Ces résultats ont montré que la présence de zinc dans le milieu de culture permet d'augmenter significativement la production de biomasse ainsi que la production de PRP, sans pour autant accroître la quantité de LPS proportionnellement.

Exemple 6 : Essais en fermenteur de 5 litres.

On a procédé à la mise en culture de *Haemophilus influenzae* type b dans le milieu de culture décrit selon l'invention à l'exemple 1 en utilisant uniquement des produits garantis par les fournisseurs comme étant animal-free et en utilisant de la protoporphyrine de synthèse telle que décrite dans la demande de brevet FR2914302, et fournie par la société SOLVIAS AG sous la désignation : Protoporphyrin IX Disodium Salt (Ref. SOL20402). Les essais se sont ensuite déroulés de la manière décrite dans l'exemple 3 à l'exception du fait que les fermenteurs utilisés étaient des fermenteurs 5 litres régulés à 37 °C, 550 rpm d'agitation et 0.5 lpm d'aération. Le volume d'inoculum était alors de 280 ml soit la totalité de l'erlenmeyer de préculture.

La détermination de la concentration en PRP et LPS a été faite suivant les procotoles décrits aux exemples 3 et 4.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau VIII ci-après :

Tableau VIII :

	Milieu animal free selon l'invention
D.O.à 694 nm	3.58
Biomasse en g de masse sèche/l de milieu	2.29
Concentration en PRP en mg/l de milieu	567
Production spécifique en mg de PRP/g de biomasse	247

Ces résultats confirment les résultats précédents, et montrent l'intérêt du procédé selon l'invention pour l'obtention d'une grande quantité de PPR.

Exemple 7 : Comparaison de la production de biomasse et de PRP avec un milieu selon l'invention tel que décrit à l'exemple 1 et avec des milieux chimiquement définis décrits dans l'art antérieur.

On a procédé à la mise en culture de *Haemophilus influenzae* type b dans le milieu de culture décrit selon l'invention à l'exemple 1, ainsi que dans 8 milieux décrits dans des publications en liaison avec la culture de *Haemophilus influenzae*, et présentés comme étant chimiquement définis.

Ces 8 milieux ont été préparés suivant les recommandations des auteurs. Il s'agit chronologiquement des milieux :

- de Talmadge et Herriott : Biochemical and Biophysical Research Communications, (March 1960), Vol.2 N°3, p 203-206),
- Butler : J. gen. Microbiol. (1962), 27, 51-60,
- Wolin : J. Bacteriol. Vol.85, (1963) Notes, p 253-254,
- Herriott *et al.* : Journal of Bacteriology, (Feb. 1970), Vol. 101, N°2, 513-516,
- Klein et Luginbuhl : Journal of General Microbiology (1979), 113, 409-411
- Coleman *et al.* : Journal of Clinical Microbiology, (Sept 2003), Vol.41, N°9 p. 4408-4410.

Les références des produits utilisés pour la préparation de ces 8 milieux sont reproduites dans le tableau IX ci-après :

Tableau IX :

Produits	Fournisseurs	ref. produit
Uridine	Sigma	U3003
Inosine	Sigma	I4125
Adenosine	Sigma	A4036
Guanine	Sigma	G6779
Guanosine	Sigma	G6264
Vitamine B12	Sigma	V2876
Citrulline	Sigma	C7629
Choline chloride	Fulka	26978
Thimidine	Sigma	T9250
Inositol	Sigma	I5125
Putrescine dihydrochloride	Sigma	P5780
Nicotinamide	Sigma	N0636
Hematin porcine	Sigma	H3281
Hemin	Fulka	51280

Sodium oléate	Sigma	O7501
Sodium acétate	Fulka	71185
Folique acid	Sigma	F7876
Polyinyl alcohol	Sigma	341584
Triethanolamine	Sigma	90278
Glycylglycine buffer	libios	B-GLYGLY250
Tween 40	Sigma	P1504
Tween 80	Sigma	P1754
Tris buffer	VWR	33621.260
éthylènediaminetétraacétate	VWR	20302.180
HEPES	Sigma	H3375
Glutathion	Sigma	G6013
Adénine	Sigma	A8626
Proline	Sigma	P0380
Thréonine	Sigma	T8625
Glycine	Sigma	G7126
Méthionine	Sigma	M9625
Sérine	Sigma	S4500
Glycerol	VWR	24387.292
K_2SO_4	VWR	26994.293
KCl	VWR	26764.298
$MgCl_2$ $6H_2O$	Panreac	131396.1211
NaCl	VWR	27810.295
$NaHCO_3$	VWR	27778.260
NH_4Cl	VWR	21236.291
RPMI 1640 avec L-glutamine et 25 mM HEPES	Invitrogen	anciene ref. citée dans la publication de Coleman (2003) ref. 61870036 => nouvelle ref. 52400025
Sodium pyruvate MEM 100 mM	Invitrogen	anciene ref. citée dans la publication de Coleman (2003) ref. 11360070 => nouvelle ref. 11360039

Les milieux ont ensuite été stérilisés grâce à une filtration sur un filtre ayant un seuil de coupure à 0.22 µm.

On a tout d'abord procédé à une étape de préculture en Erlenmeyer en verre de 1 litre, sans baffle, pendant 16 heures à 36°C sous agitation à 130 rpm, en ensemençant 280 ml d'un milieu tel que décrit à l'exemple 4 par un congelât de bactéries *Haemophilus influenzae* type b possédant dans son code génétique au moins 2 copies du locus *cap*.

Puis 9,5 ml de pré-culture ont été lavés dans chacun des milieux de culture à tester avant l'ensemencement pour la culture qui s'est déroulée à chaque fois dans un Erlenmeyer bafflé de 500 ml en polycarbonate contenant 170 ml du milieu de culture à tester ; la culture a été effectuée pendant 12 heures à 37 °C et 150 rpm d'agitation.

Chaque essai a été réalisé au moins 3 fois.

On a, pour chaque milieu, chaque heure, mesuré la D.O. à 694 nm et déterminé la concentration en PRP en fin de culture, de la même manière que décrit à l'exemple 3.

Les résultats de D.O. sont reproduits sur la Figure 1.

Les résultats des détermination de PRP sont indiqués dans le tableau X ci-après :

Tableau X :

à 12h	**D.O. à 694nm**	**PRP (mg/l)**
Milieu selon l'invention	2.86 ± 0,12	320 ± 15
Talmadge	0.28 ± 0,10	20 ± 1
Butler	0.04 ± 0,00	2 ± 0
Wolin	0.04 ± 0,00	6 ± 0
Herriot Mic-cit	1.26 ± 0,15	138 ± 7
Herriot Mic	0.98 ± 0,13	101 ± 5
Klein MMA (cit)	0.38 ± 0,01	40 ± 2
Klein MMB	0.20 ± 0,03	27 ± 1
Coleman	1.43 ± 0,04	204 ± 10

Exemple 8 : Production de PRP à l'échelle industrielle (1000 litres)

On a préparé un milieu de culture selon l'invention ayant la composition de l'exemple 1 exepté pour le zinc où la concentration est de 20 mg/L au lieu de 5 mg/L. En effet l'exemple 5 a montré que cette concentration permettait de produire plus de PRP sans accroitre la quantité de LPS.

Le milieu était identique pour les précultures et la culture finale, excepté le pH (pH initial à 7,2 ± 0,1 puis pH libre pour les précultures et pH régulé à 6,7 ± 0,1 pour la culture de production).

Le milieu a été préparé comme dans l'exemple 1. Après avoir mélangé les composés préalablement dissous dans un faible volume d'eau purifiée, avec dans certains cas ajout d'acide ou de base (cf exemple 1), et avant de faire le QSP avec l'eau purifiée, le pH a été ajusté à 7,2 ± 0,1 pour les précultures et 6,7 ± 0,1 pour la culture finale (avec de la potasse ou soude 10 N ou de l'HCl 37 %).

Le milieu a ensuite été stérilisé grâce à une filtration sur filtre ayant un seuil de coupure à 0.22 µm .

Le milieu a ainsi pu être conservé 72 heures à 5 °C.

Avant l'inoculation du milieu, on a ajouté:

- du glucose à 512.8 g/l préparé à partir de D(+) glucose anhydre fourni par la Société VWR sous la référence 24379.294,
- une solution de NAD à 1 g/l, fourni par la Société Sigma sous la dénomination β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide hydraté (ref. 43410),
- une solution-mère comprenant de la Protoporphyrine à la concentration de 0.25 g/l et de l'hydroxyde d'ammonium à la concentration de 5 ml/l ; la protoporphyrine étant fournie par la Société SOLVIAS AG sous la dénomination Protoporphyrin IX disodium salt (ref. SOL20402) et l'hydroxyde d'ammonium par la société VWR sous la dénomination Ammoniac solution 28 % (ref. 21190.292),

afin d'obtenir un milieu prêt à être inoculé, et comprenant, outre les éléments décrits dans le Tableau I de l'exemple 1, les éléments additionnels avec les concentrations telles qu'indiquées dans le tableau II de l'exemple 1 (excepté le glucose à une concentration finale de 14,87 g/L au lieu de 14 g/L).

Le procédé à l'échelle 1000 litres comprenait une série de 3 précultures :
- les premières précultures ont été réalisées en fiole Erlenmeyer de 1 litre, sans baffle, contenant 290 mL de milieu de culture complet, à 37°C sous agitation à 130 rpm (rotations par minute), pendant une durée de 17-18 heures. Ces précultures ont été initiées par l'inoculation du milieu de culture par un inoculum de bactéries d'*Haemophilus influenzae* type b contenant au moins 2 copies du locus *cap*, avec un taux d'inoculation correspondant à une $DO_{694\ nm}$ cible initiale de 0,014.

- la deuxième série de précultures a été réalisée en fermenteur de 6,8 litres. Deux fermenteurs contenant 5,2 litres de milieu de culture complet ont été ensemencés chacun avec 260 ml d'une préculture de la série 1. Ces fermenteurs ont été maintenus pendant 4 heures à 37° C ± 1, avec un pH initial à 7,2 ± 0,2 , une pO2 maintenue à 30% avec une cascade impliquant une augmentation de l'agitation (500 à 800 rpm) puis une augmentation de l'aération (0,5 à 2,5 lpm) et ensuite un débit d'O2 pur entre 0 et 6 lpm.

- la troisième série de préculture a été réalisée dans un fermenteur de 120 litres contenant 57 litres de milieu complet qui a été ensemencé avec 5,8 litres de la préculture provenant

de la série 2. Ce fermenteur a été maintenu pendant 3 heures 10 à 37° C ± 1, avec un pH initial de 7,2 ± 0,2 , une pO2 maintenue à 30% avec une cascade impliquant une augmentation de l'agitation (300 à 425 rpm) puis une augmentation de l'aération (6 à 28 lpm) et ensuite un débit d'O2 pur entre 0 et 50 lpm.

La culture industrielle a été réalisée dans un fermenteur de 1000 litres contenant 778 litres de milieu complet qui a été ensemencé avec 39 litres d'une préculture de la série 3. Ce fermenteur a été maintenu à 32° C ± 1, avec un pH régulé à 6,7 ± 0,2 (avec une solution de soude à 2,5N) , une pO2 maintenue à 70% grâce à une cascade impliquant une augmentation de l'agitation (100 à 230 rpm) puis une augmentation de l'aération (70 à 150 lpm) et ensuite un débit d'O2 pur entre 0 et 500 lpm. Par ailleurs de l'antimousse (Biospumex à 4%) a été ajouté à la demande en fonction du niveau de la mousse.

Après 12 heures de culture, on a mesuré la D.O. à 694 nm, ce qui a permis de déterminer la biomasse (selon la correspondance une unité de DO correspondant à 0,64 g de biomasse sèche). La détermination de la concentration en PRP et LPS a été faite suivant les procotoles décrits aux exemples 3 et 4.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau XI ci-après :

Tableau XI :

	Milieu selon l'invention (1 essai)
D.O. à 694 nm	3,45
Biomasse en g de masse sèche/ litre de milieu de culture	2,21
Concentration en PRP en mg/ litre de milieu de culture	865
Production spécifique en mg de PRP/g de biomasse	392
Concentration en LPS en mg/litre de milieu de culture	35,6
Rapport de LPS/biomasse en mg/g de biomasse	16,1
Rapport de PRP/LPS en mg/mg	24,3

Ces résultats ont montré l'intérêt du procédé selon l'invention pour la productivité du PRP et le ration PRP/LPS, résultats démontrés à l'échelle industrielle.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la production à l'échelle industrielle, de polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* type b (PRP) destiné à des fins vaccinales, selon lequel on cultive une souche d'*Haemophilus influenzae* type b (Hib) dans un milieu de culture, on recueille le surnageant de culture que l'on traite pour en extraire le polysaccharide capsulaire, ledit milieu de culture comprenant au moins :
   - une source de carbone,
   - de la protoporphyrine,
   - des sels,
   - des acides aminés,
   - du NAD ou NADH,
   - des vitamines,
   - des moyens de régulation du pH,

   caractérisé en ce que ledit milieu de culture est chimiquement défini.

2. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que ledit milieu de culture comprend au moins du Zinc.

3. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdits moyens de régulation du pH sont constitués par des sels tampon.

4. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite source de carbone peut être multiple et est choisie parmi : glucose, fructose, galactose, glycérol, xylose, ribose, fucose, acide sialique, lactate.

5. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite protoporphyrine est de la protoporphyrine IX de synthèse.

6. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdits sels sont choisis parmi les sels de potassium, de magnesium, de sodium, de calcium, de fer, de zinc, de cobalt et de manganèse.

7. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que lesdits sels sont choisis parmi: K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $MgSO_4$, 7 H_2O ; Na_2HPO_4, 12 H_2O ; NaH_2PO_4, 2 H_2O ; $CaCl_2$, 2 H_2O; $FeSO_4$, 7 H_2O ; $ZnSO_4$, 7 H_2O ; $CoCl_2$, 6 H_2O; $MnSO_4$, H_2O.

8. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdits acides aminés sont choisis parmi :
   - l'arginine,
   - l'alanine,
   - un au moins parmi : l'asparagine, la glutamine, l'acide aspartique, l'acide glutamique.
   - la lysine,
   - l'histidine,
   - le tryptophane,
   - la valine,
   - l'isoleucine,
   - la leucine,
   - la tyrosine,
   - la phenylalanine,
   - la cystine ou équivalent.

9. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que ledit milieu de culture comprend au moins de l'arginine, de l'alanine, de l'histidine, du tryptophane, de la tyrosine, de la phenylalanine, de la cystine, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique.

10. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la cystine est remplacé par du glutathion ou de la cystéine.

11. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdites vitamines sont choisies parmi : la thiamine, le pantothenate, l'uracile, l'hypoxanthine, la biotine, la riboflavine et la pyridoxine.

12. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'arginine et l'uracile sont remplacées par de la citrulline.

13. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de conjuguaison du polysaccharide capsulaire obtenu à une protéine porteuse.

14. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la protéine porteuse est l'anatoxine tétanique.

15. Utilisation de polysaccharides capsulaires obtenus selon une quelconque des revendications précédentes pour la préparation de composition vaccinale.

16. Procédé de préparation d'une composition vaccinale, selon lequel :

- a) on prépare, à l'échelle industrielle, un antigène contre *Haemophilus influenzae* type b (Hib), constitué par le polysaccharide capsulaire (PRP), en mettant en culture une souche de Hib dans un milieu chimiquement défini dont la nature et la quantité de chacun des composants est parfaitement définie et comprenant au moins :
  - une source de carbone,
  - de la protoporphyrine,
  - des sels,
  - des acides aminés,
  - du NAD ou NADH,
  - des vitamines,
  - ainsi que des moyens de régulation du pH,
- b) on recueille le surnageant de culture que l'on traite pour en extraire le polysaccharide capsulaire purifié,
- c) on conjugue le polysaccharide capsulaire obtenu à l'étape b) à une protéine porteuse,

- d) on combine le conjugué obtenu à l'étape c) à au moins un ou plusieurs antigènes destinés à la vaccination contre une ou plusieurs des infections suivantes : diphtérie, tetanos, polio, Hépatite B, varicelle, oreillons, rubéole, infections provoquées par *Neisseria meningitidis* ou *Streptococcus pneumoniae,* infections provoquées par le rotavirus, afin d'obtenir une combinaison vaccinale permettant l'immunisation simultanée contre plusieurs maladies.