

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 590**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2006 E 06765969 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1907543**

54 Título: **Producción de productos recombinantes usando membranas capilares**

30 Prioridad:

30.06.2005 ZA 200505315

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2014

73 Titular/es:

**QUORUS BIOTECH (PROPRIETARY) LIMITED
(100.0%)
Unit 23A, Waverley Business Park, Kotzee Road
Mowbray 7700, ZA**

72 Inventor/es:

**LEUKES, WINSTON DANIEL y
FRASER, SHEENA JANET**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 438 590 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de productos recombinantes usando membranas capilares

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la producción de productos recombinantes. En particular, se refiere a un método para producir productos recombinantes en condiciones aerobias y a un aparato para producir dichos productos recombinantes en condiciones aerobias.

Técnica anterior

10 Se ha descrito previamente la aplicación de cartuchos de membranas de fibras huecas para cultivos microbianos. El objetivo principal del uso de cartuchos de membranas para el cultivo de células es permitir el cultivo celular continuo de alta densidad para mejora de la productividad. Sin embargo, lo que en última instancia distingue unos de otros a los diferentes procesos de cultivo celular es la configuración, el funcionamiento y la aplicación de estos cartuchos de membranas. Por ejemplo, Canovas et al., (2005) utilizan un recipiente de reactor estándar conectado a un cartucho de filtración por membranas de flujo transversal para el reciclaje y la concentración de *E. coli* dentro del recipiente del reactor. En contraste, Inloes et al., (1983) buscaron utilizar el cartucho de membranas en sí mismo como el reci-
15 piente de cultivo celular por el atrapamiento de *E. coli* en crecimiento activo dentro de la matriz de la membrana macroporosa, reponiendo los nutrientes por difusión desde el lumen de las membranas; mientras que Leukes et al., (EP 0761608, publicada el 12 de marzo de 1997) inmovilizaron el hongo filamentoso *P. chrysosporium* como una biopelícula sobre la superficie exterior de las membranas, suministrando los nutrientes suministrados a las células inmovilizadas desde el lumen por el flujo de convección a través de la pared de las membranas hasta la biopelícula de células
20 de células

Antecedentes de la invención

25 Los productos recombinantes incluyendo, aunque sin limitación, enzimas, hormonas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, partículas similares a virus, péptidos, fragmentos de DNA y RNA son producidos por una variedad de sistemas de expresión microbianos. Los productos también pueden incluir productos químicos resultantes de la expresión de enzimas sintéticas recombinantes.

El mercado de productos recombinantes para la industria farmacéutica, así como otras industrias ha aumentado en los últimos años. Los productos comerciales incluyen tanto productos recombinantes expresados en hospedantes recombinantes como productos químicos producidos por enzimas biosintéticas recombinantes.

30 La producción eficaz de tales productos recombinantes se basa típicamente en el uso de hospedantes de expresión eficaces, así como una buena tecnología de bioprocesos. Los hospedantes de expresión incluyen cierto número de especies de bacterias de las cuales *Escherichia coli* es la más prominente, así como hongos, protozoos, plantas, insectos y células de mamíferos. Algunos de los productos son intracelulares, pero se prefiere que los productos sean excretados en el medio para facilitar la purificación. La mayoría de los sistemas de expresión son aerobios, requiriendo una considerable aportación de energía para aumentar la transferencia de masa de oxígeno en bio-
35 reactores de cultivos sumergidos. La mayoría de la tecnología de bioprocesos se centra en la producción de concentraciones muy altas de células en el bio-reactor, por lo general por el modo de cultivo de alimentación discontinua. Los hospedantes de producción están modificados por ingeniería genética para producir productos recombinantes de interés constitutivo o una vez está presente suficiente biomasa los hospedantes de producción son inducidos a expresar los productos recombinantes de interés. Esta inducción es típicamente una molécula que se añade en el momento apropiado o es un metabolito producido por el hospedante de producción como un producto de desecho metabólico o un metabolito secundario.
40

La estrategia para inducir la producción de proteínas recombinantes una vez que el cultivo está en fase estacionaria es típica puesto que:

- 45 1) Permite la producción de productos que son tóxicos para el organismo que los produce.
- 2) Se mejora la productividad volumétrica si la concentración de biomasa en el reactor es muy alta.
- 3) Los precursores para la formación del producto son típicamente metabolitos primarios, que se acumulan durante la fase de crecimiento primario.

50 En cultivos discontinuos sumergidos frecuentemente es difícil programar óptimamente en el tiempo la adición de inductores de proteínas recombinantes, de modo que los inductores se añadan cuando el cultivo alcance la fase estacionaria y no demasiado pronto o demasiado tarde. Es particularmente difícil cuando se realizan múltiples cultivos en paralelo en diferentes condiciones durante los experimentos de optimización.

55 Aunque la mayoría de los hospedantes de expresión de proteínas recombinantes son organismos aerobios, el cultivo de alta densidad está limitado debido a las limitaciones de transferencia de la masa de oxígeno y a la toxicidad o las limitaciones de solubilidad de los nutrientes suministrados al medio de crecimiento. Los factores que afectan a la productividad volumétrica de los bio-reactores para producir proteínas recombinantes incluyen: entorno de baja cizalladura, alta concentración de biomasa, amplia fase de producción y buena transferencia de masa de nutrientes.

- Por lo general, en los cultivos de alta densidad la transferencia de masas de oxígenos y de nutrientes está influenciada por la morfología y/o la reología del cultivo. En cultivos sumergidos, la expresión de los productos recombinantes en organismos filamentosos, tales como *Aspergillus* están especialmente afectados por la diferenciación morfológica y la formación de pelets y la productividad se ha mejorado por la inmovilización del organismo recombinante.
- 5 La inmovilización no sólo limita la tensión de cizalladura y reduce la viscosidad del caldo, mejorando el suministro de oxígeno y la transferencia de masa de nutrientes, sino que también ha demostrado inhibir la producción de proteasa extracelular en *Aspergillus niger*, limitando de ese modo la degradación de las proteínas recombinantes producidas por este organismo (Wang et al., 2005). En la mayoría de sistemas inmovilizados las limitaciones de transferencia de masa de oxígeno mantienen una etapa limitante de la velocidad en la productividad.
- 10 Inloes et al., (1983) trataron de mejorar la producción de proteínas recombinantes por el atrapamiento de *E. coli* en crecimiento activo dentro de la matriz macroporosa de la pared de las membranas de fibras huecas. Esta solución dio como resultado un entorno de baja cizalladura con alta concentración de biomasa; sin embargo, la transferencia de masa de nutrientes estaba limitada a la difusión desde el lumen de las membranas hasta las células atrapadas, mientras que el atrapamiento de las células en crecimiento activo resultó problemático, puesto que se rompió la
- 15 pared de las membranas y llegó a contaminarse la alimentación de nutrientes.
- La presente invención supera los problemas encontrados por Inloes et al., (1983) inmovilizando el microorganismo sobre la superficie de la membrana en forma de una biopelícula de células y controlando la velocidad de suministro de nutrientes a los microorganismos, de tal manera que una porción de células inmovilizadas se mantenga como células en crecimiento activo, mientras que una porción adicional entre en la fase estacionaria de crecimiento y se
- 20 mantiene en ella, como describen Leukes et al., (EP 0761608, publicada el 12 de marzo de 1997) de tal manera que las células en fase estacionaria puedan ser inducidas a producir productos recombinantes que puedan ser cosechados de forma continua desde estas células en fase estacionaria.
- Cualquier referencia en la presente memoria a un "microorganismo" debe interpretarse que significa una referencia a organismos que son miembros del grupo de bacterias, hongos, protozoos e incluye células de mamíferos o plantas que han sido modificadas por ingeniería genética para producir productos recombinantes en condiciones aerobias.
- 25 Cualquier referencia en la presente memoria a una "fase estacionaria" debe interpretarse que significa un período de crecimiento limitado o el crecimiento y la muerte sustancialmente en equilibrio que normalmente sigue inmediatamente después de la fase de crecimiento primario en cultivos en discontinuo o en continuo de microorganismos.
- Cualquier referencia en la presente memoria a "proteína recombinante" se debe interpretar como sinónimo de "producto recombinante" y significa cualquier producto o el producto de dicha proteína si se trata de un producto biosintético, homólogo o heterólogo para el hospedante de expresión, cuya producción puede ser inducida por algún mecanismo al inicio de la fase estacionaria o durante la misma de un típico proceso en discontinuo. El producto puede ser secretado por el hospedante de expresión en el entorno extracelular o retenido intracelularmente. Los productos recombinantes no se limitan a las proteínas.
- 30 Cualquier referencia en la presente memoria a una "solución de nutrientes" debe interpretarse que significa una solución líquida que contiene uno o más nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos y que incluye al menos un nutriente que limita el crecimiento. La solución de nutrientes puede llevar también un inductor requerido para iniciar la expresión de productos recombinantes.
- 35 Cualquier referencia en la presente memoria a un "inductor" debe interpretarse que significa un producto químico biológico o sintético incluido en la solución de nutrientes o un producto biosintético producido por el hospedante de expresión inmovilizado durante el crecimiento y utilizado como un medio de regulación de la producción de productos o proteínas recombinantes bajo el control de un promotor relevante que regula la expresión de dichos productos o proteínas recombinantes.
- 40 Cualquier referencia en la presente memoria a "permeado" debe interpretarse que significa solución de nutrientes agotada o corriente de producto que ha pasado a través de un sustrato y biopelícula y puede llevar producto secretado, productos residuales metabólicos y/o el resto de los nutrientes no metabolizados por el microorganismo durante el paso de la solución de nutrientes a través de la biopelícula.
- 45 Cualquier referencia en la presente memoria a "condiciones aireadas" debe interpretarse que significa cualquier estado de cultivo en el que se hace pasar un gas, que contiene oxígeno, a través de un bio-reactor y a su vez a través de una superficie de biopelícula, y que proporciona a los microorganismos el oxígeno para su crecimiento.
- 50

Sumario de la invención

- De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un método de producción de al menos un producto recombinante en condiciones aireadas, incluyendo dicho método:
- 55 proporcionar un sustrato poroso que tiene un primer lado y un segundo lado y que tiene una biopelícula de microorganismos unida al primero de sus lados, estando configurado el sustrato para permitir el paso de una solución de nutrientes a su través y para impedir el paso a su través de las células del microorganismo; y hacer que fluya una solución de nutrientes a través del sustrato y de la biopelícula en una dirección desde el segun-

- do de sus lados al primero de sus lados en condiciones aireadas, a un caudal que sea suficientemente bajo para que se establezca un gradiente de nutrientes a través de la biopelícula, en donde la concentración de nutrientes es relativamente mayor más cerca del sustrato y suficientemente alta para soportar el crecimiento primario de los microorganismos y en donde la concentración de nutrientes es relativamente menor más lejos del sustrato y suficientemente baja para entrar y mantener una fase estacionaria de los microorganismos, siendo inducidos los microorganismos para producir un producto recombinante.
- La inducción puede ser causada de varios modos, tales como por agotamiento de nutrientes, adición de una molécula inductora, acumulación de un producto metabólico primario o metabolito secundario producido en condiciones limitantes nutrientes, auto-inducción o similares. En otras palabras, el método puede utilizar la des-represión y/o la inducción de la expresión de genes recombinantes. En otras palabras, la inducción puede producirse por la adición de una molécula inductora a la solución de nutrientes o por la acumulación de un producto metabólico primario o metabolito secundario producido en condiciones limitantes de nutrientes.
- La inducción puede ocurrir por la adición de una molécula inductora a la solución de nutrientes, de modo que el flujo de la solución de nutrientes desde el segundo lado a través del sustrato y la biopelícula hasta el primer lado lleve dicho inductor al microorganismo induciendo con ello la producción por los microorganismos de al menos una proteína o producto recombinante. La inducción también puede ocurrir por la acumulación de metabolitos primarios o secundarios en la biopelícula, de tal modo que sean llevados a través de la biopelícula en la solución de nutrientes dando como resultado un gradiente de concentración, en el que la concentración del inductor es menor más cerca del sustrato y mayor más lejos del sustrato y suficientemente alta para inducir la expresión de productos recombinantes.
- El producto recombinante se puede recoger en el permeado en el primer lado si es secretado por los microorganismos o se puede cosechar en la biopelícula si es retenido intracelularmente por los microorganismos.
- El inductor puede ser cualquier inductor adecuado, tal como isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) (0,1-1 mM), metanol (0,5 - 1,5%) o ácidos orgánicos producidos por el microorganismo que interaccionan con el promotor específico con el que está modificado por ingeniería genética el sistema de expresión recombinante. La concentración del inductor se puede variar con el fin de optimizar la expresión de productos proteínicos correctamente plegados solubles.
- El método puede incluir poner en contacto la biopelícula con un gas. El gas puede ser inyectado en una superficie exterior de la biopelícula arrastrando con ello las esporas y células muertas de los microorganismos, así como eliminando la solución de nutrientes agotada que puede contener el producto secretado. El gas puede proporcionar oxígeno para el metabolismo. El gas puede ser aire.
- Los microorganismos pueden ser un cultivo sustancialmente puro de una cepa de un microorganismo o un cultivo mixto de diferentes microorganismos. Los microorganismos se pueden seleccionar del grupo que consiste en *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Mucor* sp., *Pichia* sp., *Fusarium* sp., *Neurospora* sp., *Penicillium* sp., *Streptomyces* sp., *Chrysosporium lucknowense* y *Mortierella alpinis*.
- El método de producción del producto recombinante se puede realizar a una temperatura en el intervalo entre la de crecimiento y la de formación del producto de los microorganismos. El método de producción del producto recombinante se puede realizar a una temperatura de 2 - 109°C, preferiblemente 20 - 40°C, por ejemplo 30°C.
- El método de producción del producto recombinante se puede realizar a un pH inicial en el intervalo entre el de crecimiento y el de la formación del producto de los microorganismos. El método de producción del producto recombinante se puede realizar a un pH inicial de 1 - 13, preferiblemente 4 - 8, por ejemplo 7.
- El método de producción del producto recombinante se puede realizar durante un periodo suficientemente largo para que la biopelícula o el cultivo permanezcan viables y productivos y no demasiado densos que evite el flujo de producto a través de la membrana. El método de producción del producto recombinante se puede realizar durante un periodo de 2 - 60 días, preferiblemente 2 - 30 días, por ejemplo 25 días.
- El producto recombinante puede ser producido intracelular o extracelularmente por los microorganismos. El producto recombinante se puede recoger en el primer lado si es secretado por los microorganismos o se puede cosechar en la biopelícula si es retenido intracelularmente por los microorganismos. Los metabolitos intracelulares pueden ser retenidos en el citoplasma o secretados al espacio periplásmico y extraídos usando procedimientos de lisis celular o permeabilización celular, tal como choque osmótico.
- La solución de nutrientes se puede hacer pasar a través de la biopelícula y el sustrato a un caudal que sea suficiente para retener e inmovilizar el microorganismo manteniendo mientras un gradiente de nutrientes a través de la biopelícula. Los caudales pueden diferir dependiendo del contenido en nutrientes de la solución de nutrientes y/o del tipo de microorganismo cultivado. Los caudales pueden variar entre 0,001 - 10 volúmenes de solución de nutrientes por volumen de reactor por hora.
- El espesor de la biopelícula puede depender del contenido en nutrientes de la solución de nutrientes y del tipo de microorganismo cultivado. La biopelícula puede tener un espesor de 0,1 - 10 mm y debe estar limitado de modo que

la transferencia óptima de masa de oxígeno entre el aire humidificado y la biopelícula se mantenga en un intervalo adecuado para que la biopelícula o el cultivo permanezca viable y productivo.

También se describe en la presente memoria un aparato para producir un producto recombinante en condiciones aireadas, que incluye:

5 al menos un sustrato poroso que tiene un primer lado y un segundo lado; y una disposición de alimentación para suministrar una solución de nutrientes en condiciones aireadas en contacto con los microorganismos que llega a unirse y formar, durante su uso, una biopelícula sobre el primer lado del sustrato, estando operativa la disposición de alimentación para hacer que la solución de nutrientes fluya a través del sustrato y la biopelícula en dirección desde su segundo lado hasta su primer lado a una velocidad suficientemente baja para que se establezca un gradiente de nutrientes a través de la biopelícula en el que la concentración de nutrientes es mayor más cerca del sustrato y suficientemente alta para mantener el crecimiento primario de los microorganismos y en el que la concentración de nutrientes es menor más lejos del sustrato y suficientemente baja para entrar y mantener una fase estacionaria de los microorganismos, siendo inducidos los microorganismos para producir un producto recombinante. La inducción también puede ocurrir por la acumulación de metabolitos primarios o secundarios dentro de la biopelícula, de tal modo que son llevados a través de la biopelícula en la solución de nutrientes dando como resultado un gradiente de concentración en el que la concentración del inductor es menor más cerca del sustrato y mayor más lejos del sustrato y suficientemente alta para inducir la expresión por el organismo de al menos un producto recombinante.

La disposición de alimentación puede incluir al menos una fuente mecánica, tal como una bomba, y una fuente neumática, tal como aire comprimido, para alimentar la solución de nutrientes en contacto con el sustrato en el segundo lado y hacer que la solución de nutrientes fluya a través del sustrato y la biopelícula hasta el primer lado.

El aparato incluye una fuente neumática, tal como aire comprimido suministrado en el primer lado que puede fluir y ser dirigido en contacto con la parte exterior de la biopelícula. El gas debe incluir oxígeno para el crecimiento y metabolismo y se puede usar también para arrastrar esporas y células muertas del microorganismo y para separar el permeado que puede contener el producto secretado.

El aparato puede incluir medios de recogida de producto para recoger el gas y el permeado, que puede contener producto, en el primer lado de la biopelícula. Los medios de recogida de producto pueden incluir también una salida que incluye medios creadores de contrapresión tal como, aunque sin limitación, una restricción mecánica, que se puede usar para regular la presión del gas en el primer lado alterando con ello la transferencia de oxígeno del gas a la biopelícula bajo la contrapresión aplicada resultante.

El sustrato puede comprender una membrana porosa que tenga aberturas suficientemente grandes para permitir el flujo de la solución de nutrientes a su través, pero que dichas aberturas sean suficientemente pequeñas para evitar el paso o crecimiento a su través de células de microorganismos. La configuración exacta de la membrana puede variar mucho. En realizaciones particulares, la membrana puede tener la forma de una membrana de fibras huecas, una membrana capilar o puede tener una configuración tubular o de lámina plana.

El aparato puede incluir un alojamiento para el sustrato, estando el alojamiento separado del sustrato. El alojamiento puede incluir una entrada para la solución de nutrientes, una entrada para la solución del gas y una salida para descargar el permeado del alojamiento.

Salvo definición contraria, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el aplicado usualmente por los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. En caso de conflicto, el presente documento, incluyendo las definiciones, ignorará los términos entendidos usualmente por los expertos en la técnica. A continuación se describen los métodos y aparatos preferidos, aunque en la práctica o realización de la presente invención se pueden usar métodos y aparatos similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. Los métodos, aparatos y ejemplos descritos en la presente memoria tienen sólo fines ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Breve descripción de los dibujos

A continuación se describen otras características de la invención como ejemplo no limitativo de dicha invención, con referencia a los dibujos esquemáticos que se acompañan para su ilustración. En los dibujos:

50 La Figura 1 muestra una vista esquemática en alzado lateral de un aparato de acuerdo con el método de la invención;

La Figura 2 muestra una vista en planta en corte esquemática del sustrato poroso y la biopelícula, cortes I, II y III, suministrados con nutrientes desde el segundo lado hasta el primer lado y oxígeno suministrado en el primer lado, de tal modo que se establezca un gradiente de nutrientes a través de la biopelícula que sea el mayor en el segundo lado y el menor en el primer lado, y que se establezca un gradiente de oxígeno que sea el mayor en el primer lado y el menor en el segundo lado;

La Figura 3 muestra una vista esquemática de una pluralidad de bio-reactores de membranas de una sola fibra que forman una realización efectuada a mayor escala del aparato usado en la invención.

Breve descripción de la realización preferida

5 Con referencia a las Figuras 1 a 2 de los dibujos, se designa generalmente por el número de referencia 10 a un aparato para producir una proteína recombinante en condiciones aireadas, de acuerdo con el método de la invención. El aparato está en forma de un bio-reactor 10 mostrado en la Figura 1 de los dibujos a escala de laboratorio, sin embargo, se apreciará que los principios aplicados en el bio-reactor 10 se pueden aplicar en una realización comercial o a mayor escala.

10 El bio-reactor 10 incluye una membrana capilar cerámica de fibra hueca 12, estando los extremos de la membrana acoplados en inserciones de plástico 14, 16 con resina epoxi 18. El alojamiento o carcasa del reactor 20 de vidrio está dispuesto coaxialmente con la membrana capilar 12 y está provisto de tapas 22 and 23 en los extremos que están ensartadas en el alojamiento de vidrio 20. El alojamiento 20 incluye una entrada de aire 26 para introducir oxígeno en el espacio 24 entre la membrana capilar 12 y el alojamiento 20, una entrada de inoculación 25 para introducir un inóculo en el espacio 24 entre el alojamiento 20 para su fijación a la membrana 12. El alojamiento incluye además una salida para el permeado y el aire, 27, para descargar la solución de alimentación y hacer fluir aire desde el alojamiento.

20 Durante su uso, se establece una biopelícula 32 sobre una superficie externa 30 de la membrana capilar 12. Esto se consigue introduciendo una espora o inóculo vegetativo del microorganismo deseado en el espacio 24 entre la superficie de la membrana 30 y el alojamiento de vidrio 20 en el primer lado y filtrando el inóculo por la membrana capilar 12 desde la superficie externa 30 hacia el lumen de la membrana 34 en el segundo lado, y drenando el permeado del lumen 34 a través de la salida 29. Por tanto, el lumen 34 está en comunicación de flujo con la salida 29. El inóculo es por consiguiente inmovilizado sobre la superficie de la membrana 30. La membrana 12 tiene una piel porosa relativamente delgada 36 en el interior y una estructura de huecos externamente despellejados, porosa y relativamente grande 38 radial externamente desde la piel 36. Típicamente, la membrana 12 tiene un diámetro exterior de aproximadamente 2 mm.

25 Durante la operación, se introduce una solución apropiada de nutrientes para el microorganismo en el alojamiento por la entrada del medio 28. La solución de nutrientes se hace fluir a través de la membrana 12 en dirección desde el segundo lado o lumen de la membrana 34 hasta el primer lado o su superficie exterior 30. El aire es desplazado del lumen de la membrana 34 o segundo lado por la salida del medio 29 que está cerrada durante la operación para facilitar la permeación de la alimentación de nutrientes desde el lado del lumen, a través de la pared de la membrana capilar 36 y 38, hasta el espacio 24 entre la superficie de la membrana 30 y el alojamiento de vidrio 20.

30 En la Figura 3, se ilustran una pluralidad de bio-reactores 10. Un suministro de aire comprimido, indicado con el número de referencia 40, está conectado por medio de dos válvulas reguladoras 42 a dos filtros 44 de 0,22 µm. Se dispone un vaso para humidificación 46 y se mide la presión por medio de los manómetros 48. Los recipientes cebadores 50 y los recipientes suministradores del medio 52 se muestran conectados a los bio-reactores 10. Los recipientes de recogida del permeado 54 están conectados a filtros de ventilación 56 y a reguladores de flujo 58.

35 Con referencia a la Figura 3, la tubería al recipiente de recogida del permeado 54 está cerrada mecánicamente por medio de una pinza 60 antes de que el microorganismo sea introducido directamente en el espacio entre la superficie de la membrana y el alojamiento de vidrio de cada bio-reactor 10 en una entrada de inoculación 62, de tal forma que el espacio entre la superficie de la membrana y el alojamiento de vidrio se llene de inóculo. La entrada de inoculación 62 está cerrada mecánicamente con la pinza 60 y el inóculo está inmovilizado sobre la superficie de la membrana bajo presión, suministrada por el compresor 40 a través de la tubería B. La presión de aire comprimido es controlada por la válvula reguladora de la presión 42 y monitorizada por el manómetro 48. Las piezas en forma de T 64 distribuyen uniformemente la presión entre los diversos bio-reactores 10. El aire presurizado procedente de la tubería B se esteriliza haciendo pasar el gas a través del filtro 44 de 0,22 µm y a continuación se humidifica burbujeando la corriente de aire a través de agua destilada estéril en un recipiente para humidificación 66 antes de que entre en el bio-reactor 10, con el fin de evitar la desecación del microorganismo y mejorar la tasa de transferencia de oxígeno entre la corriente de aire y la biopelícula. El filtrado de inoculación se recoge en el lado del lumen en el recipiente cebador 50. Una vez llena se abre la tubería que va hasta el recipiente de recogida del permeado 54 y se ajustan la presión de aire y el caudal de aire de la tubería B en la salida de aire del recipiente de recogida del permeado 54 usando el regulador de flujo 58.

40 Durante la operación, se suministra solución de nutrientes desde el recipiente de suministro de medio 52 bajo la presión suministrada por el compresor 40 a través de la tubería A. La presión de aire comprimido es controlada por la válvula reguladora de presión 42 y monitorizada usando un manómetro 48. Las piezas en forma de T 64 distribuyen uniformemente la presión entre los diversos bio-reactores 10. El aire presurizado procedente de la tubería A se esteriliza pasando el gas a través del filtro 44 de 0,22 µm. La solución de nutrientes se alimenta neumáticamente desde el recipiente de suministro de medio 52 al lumen de la membrana capilar, desplazando el aire del lumen en el recipiente cebador 50. Durante la operación, la tubería que va hasta el recipiente cebador 50 está cerrada mecánicamente con las pinzas 60. El caudal al que la solución de nutrientes se suministra desde el lumen de la membrana

en el segundo lado hasta la biopelícula inmovilizada sobre la superficie de la membrana en el primer lado se determina por la diferencia de presión entre el suministro de aire comprimido de la tubería B y el suministro de aire comprimido de la tubería A. El permeado se puede retirar a intervalos del recipiente de recogida de permeado 54 a través de un orificio de toma de muestras 68.

5 Es fundamental para la producción de proteínas recombinantes la regulación de la expresión génica por moléculas que reprimen o inducen la expresión génica actuando sobre un elemento promotor que controla la expresión del gen extraño. Además de los inductores mejor conocidos, tales como IPTG y metanol, nutrientes tales como carbono o nitrógeno pueden servir para sub-regular (reprimir) o sobre-regular (inducir) la expresión de un producto recombinante. Por agotamiento de los nutrientes se puede des-reprimir y/o inducir el elemento promotor, iniciando así la expresión génica y la producción de proteínas recombinantes. Esto se consigue con el bio-reactor con biopelícula inmovilizada con membranas 10 por la producción de gradientes radiales de concentración de nutrientes a través de la biopelícula 32. Como resultado, la concentración de nutrientes en la interfase membrana/biopelícula es alta, mientras que la concentración de nutrientes en la superficie exterior expuesta de la biopelícula 32 es baja. En la Figura 2 de los dibujos, con fines de ilustración, un gráfico representa el nivel de concentración de nutrientes C (eje y) frente a la distancia desde la superficie de la membrana (eje x), mientras que las zonas de concentración de nutrientes desde valores altos a bajos se designan con los números de referencia I a III, respectivamente. En la zona I la concentración de nutrientes es suficientemente alta para mantener el crecimiento primario de los microorganismos, en la zona II la concentración de nutrientes es suficientemente baja para provocar el agotamiento de los nutrientes que estresa a los microorganismos induciendo y manteniendo por ello una fase estacionaria de los microorganismos, mientras que en la zona III se puede agotar la concentración de nutrientes dando como resultado la muerte y lisis celular.

Debido a la toxicidad de muchos productos recombinantes y a las altas densidades celulares requeridas para aumentar la productividad, la mayoría de los sistemas de expresión han sido modificados por ingeniería genética para producir productos recombinantes durante el crecimiento en fase estacionaria por auto-inducción o por la adición de un inductor durante el crecimiento en fase estacionaria. La auto-inducción puede resultar de:

- 1) los gradientes de nutrientes descritos en la presente memoria; o
- 2) que la concentración de producto residual metabólico aumente a medida que la solución de nutrientes perfunda la biopelícula, lo que puede inducir también la formación de productos en cultivos en los que la acumulación de residuos metabólicos induce la formación de productos; y
- 3) esto podría dar también como resultado la producción de un metabolito secundario que induzca la producción de un producto recombinante. Se apreciará que después del establecimiento del gradiente de nutrientes, la formación de productos también puede ser inducida por la alteración del pH como resultado de una acumulación de ácido orgánico.

En esta invención pueden mantenerse condiciones óptimas para la expresión limitando mientras la exposición del hospedante recombinante a productos tóxicos. Cuando funciona el bio-reactor, permite la producción prolongada de proteínas recombinantes y a medida que es retenida la biomasa, permite la recuperación de un producto libre de biomasa de pureza relativamente alta. Además, se reducen la degradación y descomposición de productos recombinantes por enzimas proteolíticas por medio de la retirada continua del producto.

En un hospedante recombinante en el que la expresión está auto-regulada por condiciones de los nutrientes o productos metabólicos producidos por el organismo hospedante propiamente dicho, la producción de proteínas recombinantes se puede mantener en la zona II, por ejemplo la producción de xilanasa en *Aspergillus niger* bajo el control del promotor de gliceraldehído-6-fosfato-deshidrogenasa (gpd) (Rose and van Zyl, 2002).

En un hospedante recombinante en el que la expresión está regulada por un compuesto químico sintético o biosintético, la producción de proteínas recombinantes puede ser inducida a través de la biopelícula en ausencia de un inhibidor o la producción de proteínas recombinantes puede ser mantenida en la zona II donde dicho inhibidor puede ser metabolizado por el microorganismo, por ejemplo la producción recombinante en *Pichia pastoris* bajo el control del promotor de AOX es inducida por metanol en condiciones limitantes de carbono. En este sistema de expresión, la albúmina es un producto secretado y la β -galactosidasa es un producto intracelular.

Se apreciará que la regulación de la producción de proteínas recombinantes es un sistema hospedante y de expresión específico y que los medios por los que se consigue la producción de proteínas recombinantes dentro de la biopelícula inmovilizada pueden diferir, aunque siempre incorporando las características esenciales de los gradientes de nutrientes, metabolitos y/o inductores descritos en la presente memoria.

También se apreciará que la configuración exacta del bio-reactor y del régimen de flujo de fluidos pueden variar mucho, aunque siempre incorporando las características esenciales definidas anteriormente en la presente memoria.

En la patente de EE.UU. 5945002 y la solicitud de patente europea EP-A-1907542 se describen métodos de producción de metabolitos secundarios.

Ejemplo 1**Sistema de expresión en *Aspergillus niger***

Habitualmente se ha usado *Aspergillus niger* como hospedante de expresión fúngica usando una variedad de vectores de expresión. En este ejemplo se usó *A. niger* modificado por ingeniería genética para expresar constitutivamente el gen de la β -1,4-xilanasa (*xyn2*) de *Trichoderma reesei* bajo el control transcripcional del promotor de la gliceraldehído-6-fosfato-deshidrogenasa (*gpd*) de *A. niger* (Rose and van Zyl, 2002) para demostrar la producción continua de xilanasa recombinante por este transformante estable de alto rendimiento usando el aparato descrito en la presente memoria.

Cepa y condiciones del cultivo

La cepa recombinante *Aspergillus niger* D15 que contenía el gen de la xilanasa II (*xyn2*) de *Trichoderma reesei* integrado en su genoma fúngico fue proporcionada por el Prof. W. H. van Zyl, Dept. of Microbiology, University of Stellenbosch, South Africa (Rose and van Zyl, 2002).

El *Aspergillus* productor de xilanasa se cultivó en melazas al 20% (v/v), 1 vez en el medio definido (Punt and van den Hondel, 1992), 2 veces en el medio definido (Punt and van den Hondel, 1992) o en el medio mínimo (Record *et al.* 2002).

Puesta a punto del bio-reactor

Se configuraron bio-reactores de una sola membrana de fibras como se ilustra en la Figura 3. Se hicieron funcionar cuatro bancadas de cuatro módulos de bio-reactores, cada bancada con diferentes condiciones de nutrientes. Los bio-reactores se esterilizaron en autoclave y se pusieron a punto para un funcionamiento aerobio de acuerdo con los métodos de funcionamiento estándares (abreviadamente SOP, por la expresión inglesa *Standard Operating Procedures*). Se distribuyó asépticamente medio de crecimiento estéril en cada uno de los recipientes de suministro de medio antes del comienzo del experimento.

Inoculación

Todos los bio-reactores se inocularon con 1 mL de suspensión de esporas generada por nueva puesta en suspensión de esporas a partir de una sola placa de agar-agar en 20 mL de agua destilada estéril. El inóculo se inyectó asépticamente y directamente en el espacio extracapilar (abreviadamente ECS por la expresión inglesa *ExtraCapillary Space*) es decir, entre la superficie de la membrana y el alojamiento de vidrio de cada bio-reactor. La inmovilización del inóculo sobre la superficie exterior de las membranas capilares se completó por flujo inverso, de acuerdo con los SOP.

Funcionamiento

Los bio-reactores se hicieron funcionar en condiciones aerobias de acuerdo con los SOP. El oxígeno en la forma de aire humidificado filtrado por un filtro de 0,22 μ m se suministró desde un compresor usando una válvula reguladora de la presión y monitorizado por un manómetro. Se usaron pinzas Hoffman en la salida del aire de cada bio-reactor para regular el flujo de aire y crear una contrapresión. La presión del aire dentro del ECS, es decir, el espacio entre la superficie de la membrana y el alojamiento de vidrio en el primer lado se monitorizó usando un manómetro y se mantuvo a 60 kPa y el caudal de aire a través del bio-reactor se ajustó a 1 volumen de aire por minuto por volumen de reactor usando un rotámetro.

El medio de crecimiento se suministró a cada uno de los recipientes de suministro de medio separado de los bio-reactores usando aire comprimido filtrado por un filtro de 0,22 μ m usando una válvula reguladora de la presión y monitorizado por un manómetro. El medio de crecimiento se alimentó a la biopelícula desde el lumen o segundo lado de las membranas capilares, a través de la pared de la membrana hasta el primer lado o superficie exterior de la membrana capilar. El caudal medio desde el segundo lado hasta el primer lado fue regulado manualmente para mantener una diferencia de presión positiva ajustada a través de la superficie de la membrana desde el lumen o segundo lado hasta la superficie exterior de la membrana o primer lado del bio-reactor, controlando de este modo el caudal de alimentación de nutrientes (flujo) a la biopelícula. El aumento del crecimiento en la biopelícula crea mayor resistencia al flujo y por consiguiente se debe ajustar las presiones para mantener el flujo constante. En condiciones de flujo óptimas el espesor de la biopelícula y el flujo se mantienen sustancialmente en equilibrio lo que facilita los gradientes de nutrientes requeridos para la diferenciación del microorganismo y la producción continua de las proteínas recombinantes.

El permeado se recogió en recipientes de recogida de permeado y se tomaron muestras diariamente para posteriores análisis. Se monitorizaron diariamente la tasa de acumulación de permeado y el pH. Las muestras se conservaron a -20°C para análisis posteriores.

Desarrollo de la biopelícula

Se observaron la diferenciación y la productividad del transformante *A. niger* D15 usando diferente medio de crecimiento y diferentes espesor de la biopelícula.

5 El crecimiento de la biopelícula se desarrolló rápidamente en el medio mínimo (Record *et al.* 2002) mostrando un crecimiento uniforme intensamente esporulante y pigmentado en negro tan pronto como el día 3.

El cultivo 1 vez y 2 veces en el medio definido (Punt and van den Hondel, 1992) fue similar, con un espesor de la biopelícula ligeramente mayor cuando se usó 2 veces en medio de crecimiento. El crecimiento fue más lento que en el medio definido y no demostró la misma pigmentación oscura o esporulación. La pigmentación de la biopelícula era de color crema moteado a pardo claro y oscuro, oscureciéndose a partir el día 10 y esporulando a partir del día 15.

10 El crecimiento en melazas fue pobre, mostrando solo un crecimiento de biopelícula difuso con pigmentación oscura y esporulación oscura el día 14.

Con referencia a la Tabla 1, los bio-reactores fueron cosechados después de 25 días y para cada bio-reactor se calcularon los pesos de células secas. Se obtuvieron cantidades significativamente mayores de biomasa usando el cultivo de 2 veces en el medio definido. La cantidad de xilanasa producida por los bio-reactores durante un periodo de 25 días estaba fuertemente correlacionada con el rendimiento de la biomasa ($r^2 = 0,92$).

15

Tabla 1: Biomasa media producida en los bio-reactores (n = 2) cultivados con diferentes medios de crecimiento

	Peso de células secas (g)		Unidades de xilanasa por g de biomasa	
	Valor medio	Desviación típica	Valor medio	Desviación típica
Medio mínimo	0,53	0,04	4843	3103
2 veces en el medio definido	1,71	0,08	4207	1095
Melazas al 20%	0,12	0,05	8282	3232
1 vez en el medio definido	0,66	0,05	5647	94

Productividad

20 La actividad enzimática se cuantificó usando el ensayo de actividad de xilanasa con azo-xilano (madera de abedul) de Megazyme. El método se realizó en tampón de fosfato de sodio, pH 6,0 a 55°C. El pH y las temperaturas de incubación usados fueron descritos previamente como los óptimos para la xyn2 recombinante producida en *Aspergillus niger* D15 (Rose and van Zyl, 1992). Se prepararon controles (blancos) separados para cada muestra debido a diferencias en la composición del medio entre los bio-reactores. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un μmol de equivalentes del azúcar reductor D-xilosa a partir de arabinosilano por minuto.

25

Con referencia a la Tabla 2, el medio de crecimiento definido mostró mayores rendimientos de producción de xilanasa, doblando en el caso de 2 veces en el medio definido la productividad volumétrica de los bio-reactores en comparación con 1 vez en el medio definido. Esto estaba correlacionado con la mayor cantidad de biomasa producida cuando se usó un medio de crecimiento más concentrado (como antes). Los bio-reactores cultivados usando el medio mínimo mostrado fueron marginalmente menos productivos que los cultivados con 1 vez en el medio definido, mientras que las melazas al 20% mantuvieron un mal crecimiento y producción de xilanasa en los bio-reactores.

30

Tabla 2. Producción de xilanas por los bio-reactores.

Bio-reactor	Xilanas (Unidades/Litro)			Rendimiento espacio - tiempo (Unidades/h por volumen del reactor en litros)			Xilanas (Unidades)
	Valor máximo	Valor medio	Desviación típica	Valor máximo	Valor medio	Desviación típica	Durante periodos de 25 días
1	13,53	9,67	3,43	2,20	0,72	0,75	3498
2	5,55	7,81	3,65	1,09	0,31	0,34	1470
3	18,63	10,74	4,43	2,87	0,75	0,81	3621
4	17,86	10,02	4,35	4,30	0,90	1,18	4311
5	54,29	17,98	14,98	6,10	1,38	1,63	7042
6	33,88	16,83	12,14	8,68	1,63	2,20	8250
7	27,28	12,79	6,85	2,36	1,02	0,74	6059
8	31,98	12,76	7,53	2,92	1,17	0,73	6940
9	3,64	2,26	1,13	0,55	0,21	0,14	1135
10	4,40	2,31	1,24	0,44	0,17	0,12	898
11	3,23	2,06	1,02	0,30	0,18	0,13	965
12	4,30	1,97	1,47	0,58	0,14	0,15	713
13	21,99	12,38	6,00	1,11	0,65	0,36	3493
14	30,20	15,70	8,39	1,44	0,72	0,43	3993
15	22,76	13,51	6,19	1,28	0,74	0,42	4005
16	23,51	15,95	7,74	1,78	0,81	0,46	4231

Referencias:

- 5 1. Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. and Moo-Young M. (2005) *Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. Biotech. Advances* 23, pp. 115-129
2. Rose, S.H and van Zyl W.H. (2002) *Constitutive expression of the Trichoderma reesei beta-1,4-xylanase gene (xyn2) and the beta-1,4-endoglucanase gene (egl) in Aspergillus niger in molasses and defined glucose media. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, pp. 115-129.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir al menos un producto recombinante en condiciones aireadas, incluyendo dicho método:
 - 5 proporcionar un sustrato poroso que tiene un primer lado y un segundo lado y que tiene una biopelícula de microorganismos unida al primero de sus lados, estando el sustrato configurado para permitir el paso a su través de una solución de nutrientes e impedir el paso a su través de células de microorganismos; y
 - 10 hacer fluir una solución de nutrientes a través del sustrato y la biopelícula en una dirección desde el segundo de sus lados hasta el primero de sus lados en condiciones aireadas, en donde el caudal de la solución de nutrientes desde el segundo lado hasta el primer lado es 0,001 - 10 volúmenes de solución de nutrientes por volumen de bio-reactor y por hora, proporcionando con ello un gradiente de nutrientes que tiene una diferencia de concentración a través de la biopelícula, en el que la concentración de nutrientes es mayor más cerca del sustrato para manteniendo con ello el crecimiento primario de los microorganismos y en el que la concentración de nutrientes es menor más lejos del sustrato con lo cual se provoca que los microorganismos entren en una fase estacionaria y la mantengan, siendo los microorganismos inducidos a producir el producto recombinante.
- 15 2. Un método de la reivindicación 1, en donde los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Mucor* sp., *Pichia* sp., *Fusarium* sp., *Neurospora* sp., *Penicillium* sp., *Streptomyces* sp., *Chrysosporium lucknowense* y *Mortierella alpinis*.
3. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el método se lleva a cabo durante un periodo de 2 - 60 días.
- 20 4. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la biopelícula tiene un espesor de 0,1 - 10 mm.
5. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye añadir una molécula inductora a la solución de nutrientes, de tal modo que el caudal de la solución de nutrientes desde el segundo lado a través del sustrato y la biopelícula hasta el primer lado lleva dicho inductor hasta los microorganismos con lo cual induce la producción de al menos un producto recombinante por los microorganismos y en donde el inductor es opcionalmente un metabolito primario o secundario que se acumula dentro de la biopelícula, de tal modo que cuando el inductor es llevado a través de la biopelícula en la solución de nutrientes da como resultado un gradiente de concentración, en el que la concentración del inductor es menor más cerca del sustrato y mayor más lejos del sustrato induciendo con ello la expresión de al menos un producto recombinante por el microorganismo.
- 25 6. Un método de la reivindicación 7, en donde el inductor se selecciona de al menos uno de isopropil- β -D-tiogalacósido (IPTG) (0,1 - 1 mM), metanol (0,5 - 1,5%) y ácidos orgánicos producidos por el microorganismo.
7. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el producto recombinante es producido intracelularmente por los microorganismos.
- 30 8. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el producto recombinante es producido extracelularmente por los microorganismos.
9. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que incluye poner en contacto la biopelícula con un gas.

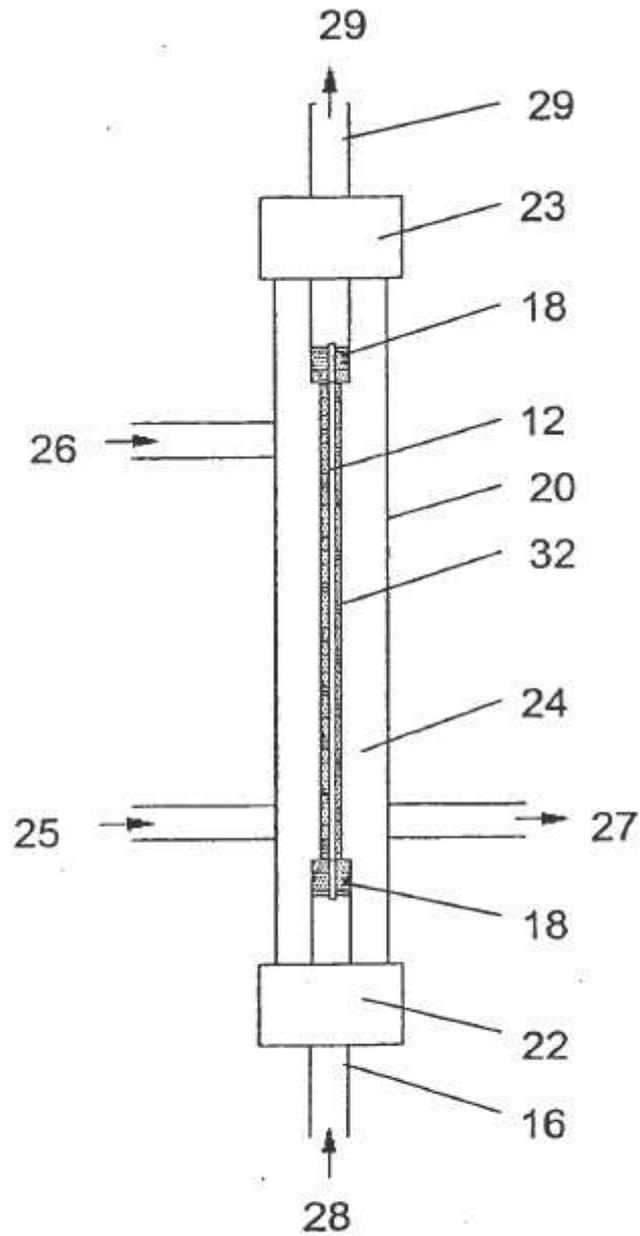


FIG 1

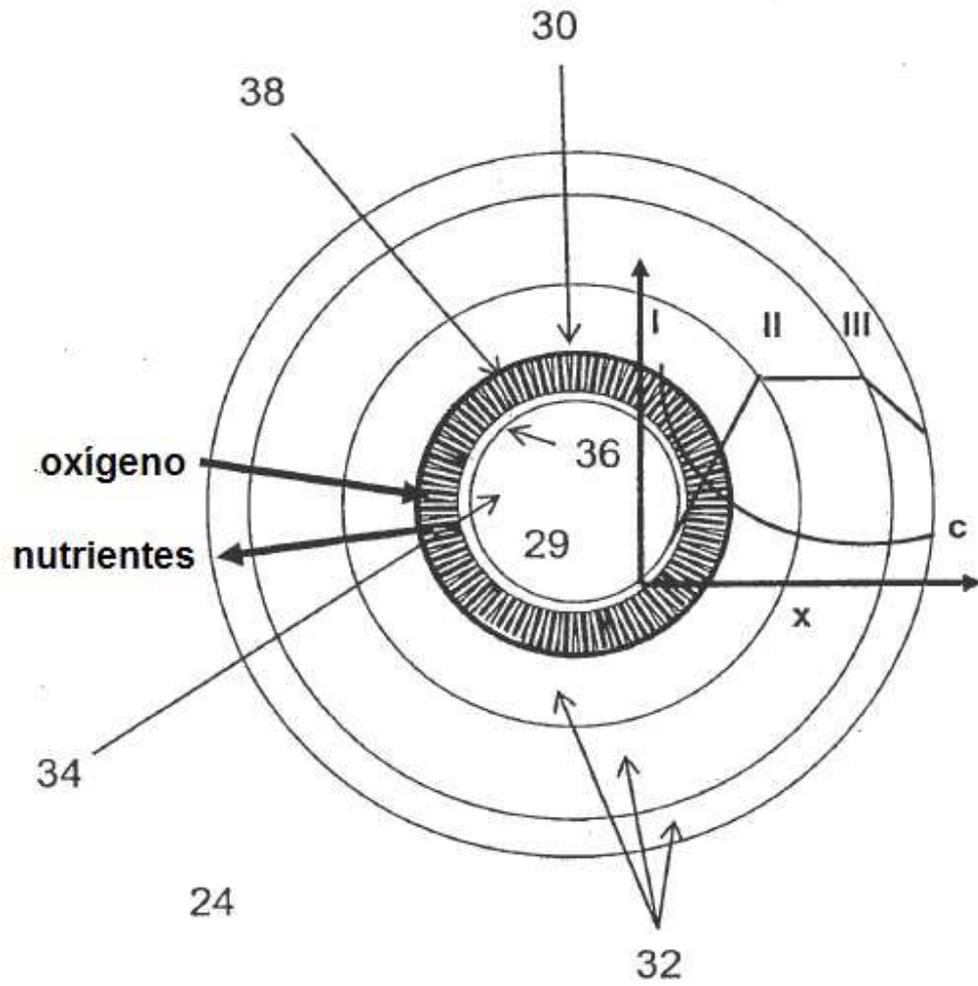


FIG 2

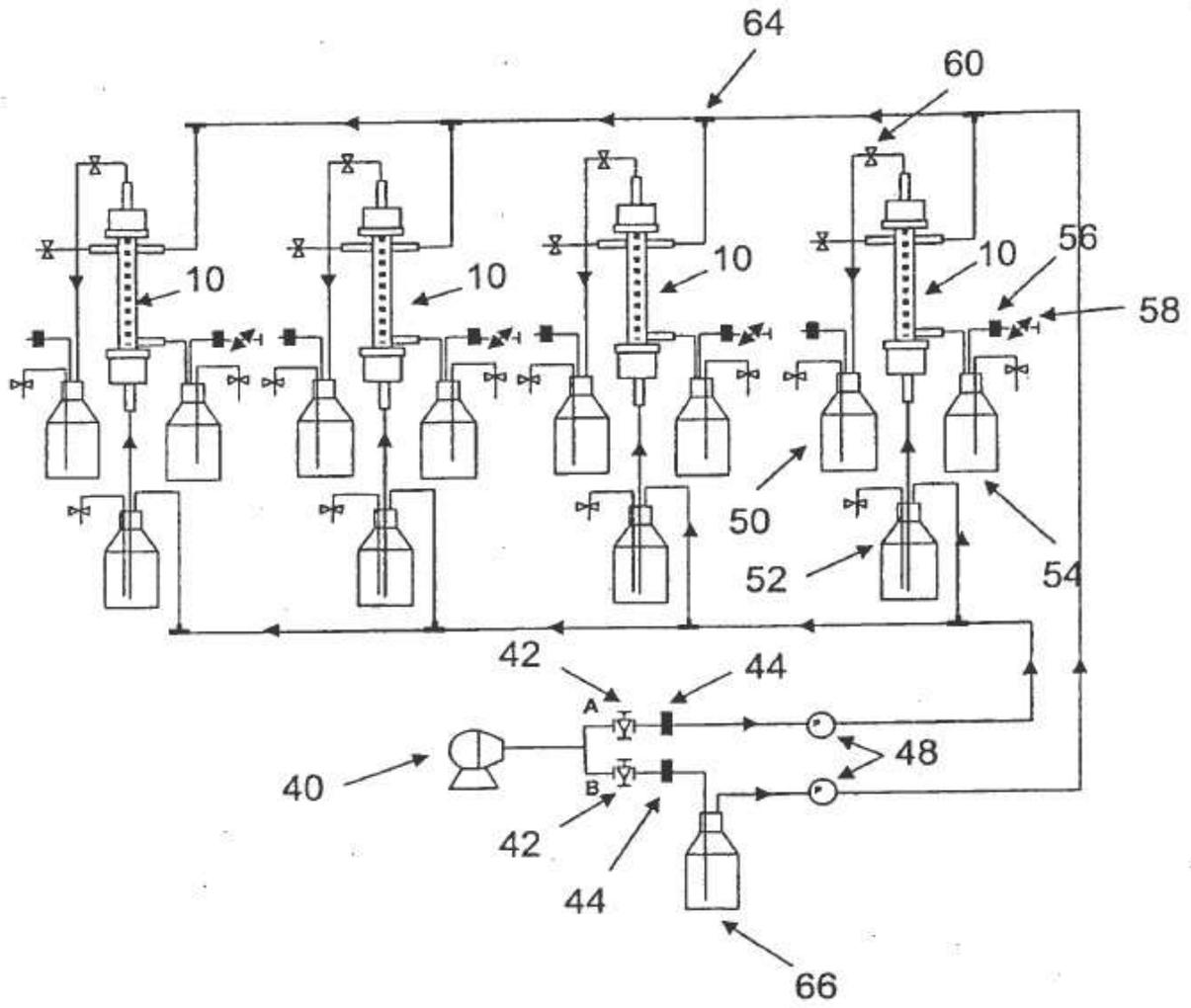


FIG 3