

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 944**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2008 PCT/US2008/000426**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2008 WO08088757**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 08724501 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2102354**

54 Título: **Aparato y métodos para aplicar un choque osmótico a células**

30 Prioridad:

12.01.2007 US 880195 P

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

27.11.2017

73 Titular/es:

**DOW GLOBAL TECHNOLOGIES LLC (100.0%)
2040 Dow Center
Midland, MI 48674 , US**

72 Inventor/es:

**PATKAR, ANANT, YESHWANT;
SEN, SUBRATA y
CHAPPELL, MICHAEL, L.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 944 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

Aparato y métodos para aplicar un choque osmótico a células

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/880.195, presentada el 12 de enero de 2007, titulada "APARATO Y MÉTODOS PARA APLICAR UN CHOQUE OSMÓTICO A CÉLULAS".

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de la biotecnología. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para aplicar un choque osmótico a células bacterianas y a un método para preparar un polipéptido recombinante de interés.

10 **Antecedentes de la invención**

En una serie de bioprocesos comerciales, se utiliza la ruptura celular mecánica para liberar el contenido intracelular. Este procedimiento libera todo el contenido intracelular, dando como resultado desafíos significativos en otras operaciones unitarias posteriores. Para las moléculas de proteínas en el espacio periplásmico de las bacterias, se ha utilizado un procedimiento de choque osmótico por lotes a escala de laboratorio para liberar selectivamente el contenido periplásmico sin ruptura completa de las células. Un proceso de este tipo comienza típicamente equilibrando el caldo de fermentación con una solución de sal o azúcar de alta molaridad (tampón de inmersión) para generar una alta presión osmótica dentro de las células. A continuación se mezcla con tampón de baja osmolalidad (tampón de choque) en un modo por lotes durante un periodo de tiempo finito para la liberación del contenido periplásmico. La liberación va seguida por la eliminación de las células por centrifugación. Este proceso por lotes tradicional consume mucho tiempo y tiene otras limitaciones, como dificultad en la ampliación, control preciso del tiempo de exposición y bajo rendimiento. Estos factores limitan su aplicabilidad para la liberación a gran escala de moléculas de interés. Como tales, los métodos y aparatos que superen estas limitaciones serían una mejora en la técnica.

Breve compendio de la invención

25 En un primer aspecto, la invención proporciona un método de aplicación de choque osmótico a células bacterianas, comprendiendo el método:

proporcionar una primera solución que comprende células;

proporcionar una segunda solución; en el que la osmolaridad de dicha primera solución es mayor que la osmolaridad de dicha segunda solución;

30 generar una primera corriente de fluido que comprende dicha primera solución;

generar una segunda corriente de fluido que comprende dicha segunda solución; en el que el caudal de la segunda corriente de fluido es mayor que el caudal de la primera corriente de fluido;

combinar continuamente dichas primera y segunda corrientes de fluido en una tercera corriente de fluido a través del uso de una unión en T conectada a un mezclador estático; y

35 separar las células de la tercera corriente de fluido que comprende la proteína periplásmica liberada, en la que la separación utiliza un dispositivo para la separación de contenidos de un fluido basada en el tamaño o la densidad.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para preparar un polipéptido recombinante de interés que comprende:

40 (a) fermentar una célula huésped bacteriana transformada con un sistema de expresión recombinante capaz de provocar la secreción de un polipéptido de interés en el periplasma de dicha célula huésped, en donde dicha fermentación se realiza en un medio de fermentación bajo condiciones tales que el polipéptido de interés se secreta en el periplasma de la célula huésped;

(b) aplicar un choque osmótico a la célula huésped usando un método como se describe en el primer aspecto, en el que el método comprende:

45 (i) proporcionar una primera solución que comprende células mezclando una solución con una célula huésped para formar una suspensión de alta molaridad;

(ii) proporcionar un tampón de choque de baja molaridad, en el que la osmolaridad de la suspensión de alta molaridad es mayor que la molaridad del tampón de choque de baja molaridad;

(iii) generar una primera corriente de fluido que comprende la suspensión de alta molaridad y una

segunda corriente de fluido que comprende el tampón de choque de baja molaridad, en el que el caudal de la segunda corriente de fluido es mayor que el caudal de la primera corriente de fluido;

(iv) combinar continuamente la primera y segunda corrientes de fluido en una tercera corriente de fluido a través del uso de una unión en T conectada a un mezclador estático; y

5 (v) separar las células de la tercera corriente de fluido que comprende la proteína periplásmica liberada, en la que la separación utiliza un dispositivo para la separación de contenidos de un fluido en base al tamaño o la densidad;

(c) extraer el polipéptido de interés de la tercera corriente de fluido.

10 En una realización de la invención, el polipéptido de interés se extrae del periplasma aplicando un choque osmótico continuo a las células huésped contenidas en el medio de fermentación.

15 Se describe un aparato para aplicar un choque osmótico a células. El aparato puede incluir un primer depósito que contiene células en una primera solución y un segundo depósito que contiene una segunda solución. La primera solución puede tener una mayor osmolalidad que la segunda solución. El aparato puede incluir además un medio para generar una primera corriente de fluido que comprende la primera solución, un medio para generar una segunda corriente de fluido que comprende la segunda solución y un medio para combinar la primera y segunda corrientes de fluido en una tercera corriente de fluido.

En otra realización más, se describe un método para aislar un polipéptido recombinante de interés de una célula. La célula se puede retirar después de la tercera corriente de fluido.

Breve descripción de los dibujos

20 Los expertos en la técnica apreciarán que los elementos representados en los diversos dibujos no son a escala, sino que tienen sólo fines ilustrativos. La naturaleza de la invención que se presenta, así como las realizaciones ilustrativas de la presente invención, se pueden entender más claramente con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención, y a las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a métodos para someter células a choque osmótico. La presente invención se refiere además a métodos para la preparación de péptidos recombinantes mediante el uso de choque osmótico. Será evidente para los expertos en la técnica que las realizaciones descritas en la presente memoria, aunque ilustrativas, no pretenden limitar de este modo la invención o el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30 De acuerdo con una realización de la invención, un método de preparación de un polipéptido recombinante de interés incluye la fermentación de una célula huésped que se transforma con un sistema de expresión recombinante capaz de provocar la secreción de un polipéptido de interés en el periplasma de la célula huésped. La fermentación se realiza en un medio de fermentación bajo condiciones tales que el polipéptido de interés se secreta en el periplasma de la célula huésped. El polipéptido de interés puede seleccionarse del grupo que consiste en un interferón, una interleucina, una hormona del crecimiento, un factor de crecimiento, una citocina, una enzima, un inhibidor enzimático, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo. El polipéptido de interés se extrae del periplasma aplicando un choque osmótico continuo a las células huésped contenidas en el medio de fermentación. De acuerdo con una realización particular, la aplicación de un choque osmótico continuo a las células huésped incluye proporcionar una primera solución que comprende células y proporcionar una segunda solución, en la que la osmolalidad de la primera solución es mayor que la osmolaridad de la segunda solución. Se genera una primera corriente de fluido que incluye la primera solución y se genera una segunda corriente de fluido que incluye dicha segunda solución. La primera y segunda corrientes de fluido se combinan a continuación en una tercera corriente de fluido. El choque osmótico continuo se puede conseguir mezclando continuamente una suspensión de alta molaridad con un tampón de choque de baja molaridad. La suspensión de alta molaridad se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en una concentración elevada de azúcar o sal. El tampón de choque de baja molaridad se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en Tris, Bis-Tris y fosfato. El método puede incluir opcionalmente también la administración de un intercambiador de calor después o antes de que se libere la presión osmótica de las células, la administración de un disolvente antes o después de la liberación de la presión osmótica de las células y la administración de un tratamiento químico antes o después de la liberación de la presión osmótica de las células.

50 Un ejemplo de un aparato para aplicar un choque osmótico a células en un método de acuerdo con la presente invención incluye un primer depósito que contiene una primera solución. En la primera solución están las células. El aparato incluye además un segundo depósito que contiene una segunda solución. En los fondos del primer depósito y segundo depósito hay medios para generar corrientes de fluido. El medio para generar una primera corriente de fluido genera una primera corriente de fluido que comprende una primera solución y células. El medio para generar una corriente de fluido genera una segunda corriente de fluido que comprende una segunda solución. Además, hay un medio para combinar corrientes de fluido que combina la primera corriente de fluido 112 y la segunda corriente de

fluido para formar una tercera corriente de fluido.

Aunque los medios para generar una corriente de fluido pueden ser agujeros en el primer y segundo depósitos, se puede usar cualquier medio para generar una corriente de fluido conocido por un experto en la técnica. Los ejemplos de medios para generar una corriente de fluido incluyen, pero no se limitan a, agujeros, espitas, boquillas, válvulas, vertido, tubos, bombas y combinaciones de los mismos.

Como resultará evidente para un experto en la técnica, los medios para combinar corrientes de fluido pueden ser cualquier aparato o dispositivo que pueda combinar la primera corriente de fluido y la segunda corriente de fluido para formar una tercera corriente de fluido. Los ejemplos de medios adecuados para combinar corrientes de fluido que pueden usarse en las realizaciones ilustrativas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, uniones en T, uniones en Y y embudos. En una realización particular, el medio para combinar corrientes de fluido puede ser un aparato o dispositivo que no permita una retención prolongada de la combinación de primera corriente de fluido y segunda corriente de fluido antes de la formación de la tercera corriente de fluido. En una realización particular, la primera solución y la segunda solución se pueden combinar en una relación 1:4. En un método de la invención, se utiliza un conector de unión en T para combinar continuamente la primera y segunda corrientes de fluido en una tercera corriente de fluido.

La primera solución tiene una osmolalidad mayor que la segunda solución. La primera solución puede tener una concentración de soluto de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 10 M. La primera solución puede tener una concentración de soluto, por ejemplo, de aproximadamente 2 M a aproximadamente 6 M y, más específicamente, puede tener una concentración de soluto de aproximadamente 1 M a aproximadamente 3 M.

La segunda solución puede tener una concentración de soluto de aproximadamente 0 M a aproximadamente 1 M y, más específicamente, una concentración de soluto de aproximadamente 0 M a aproximadamente 0,5 M, o una concentración de soluto de aproximadamente 0 M a aproximadamente 0,1 M.

Los ejemplos de solutos que pueden ser útiles como componentes de la primera solución y segunda solución incluyen, pero no se limitan a, azúcares, sales, glucosa, sacarosa, glicerol, cloruro sódico, sulfato sódico, fosfato sódico, nitrato sódico, cloruro potásico, sulfato potásico, fosfato potásico, nitrato potásico, cloruro magnésico, sulfato magnésico, fosfato magnésico, nitrato magnésico, cloruro cálcico, sulfato cálcico, fosfato cálcico, nitrato cálcico, sulfato amónico y combinaciones de los mismos. En realizaciones particulares, la primera solución y la segunda solución incluyen glicerol y / o cloruro de sodio.

Como apreciará un experto en la técnica, las células pueden ser cualquier tipo de células biológicas que se desee someter a choque osmótico. Los ejemplos de tipos celulares que se pueden someter a choque osmótico incluyen, pero no se limitan a, células microbianas, células bacterianas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células animales, células vegetales, género *Pseudomonas*, *E. coli*, género *Klebsiella*, género *Saccharomyces*, género *Pichia* y género *Hansenula*. Las células pueden incluir un espacio periplásmico y también pueden producir una molécula de interés. En realizaciones particulares, la molécula de interés puede ser un polipéptido y las células pueden producir un polipéptido de interés que está localizado en el espacio periplásmico. Los polipéptidos representativos de interés pueden seleccionarse, por ejemplo, a partir del grupo que consiste en un interferón, una interleucina, una hormona del crecimiento, un factor de crecimiento, una citocina, una enzima, un inhibidor enzimático, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo.

En el funcionamiento normal de una realización particular de la invención, el depósito contiene una primera solución que comprende células. El depósito contiene una segunda solución, que es de menor osmolalidad que la primera solución. El medio para generar una corriente de fluido genera una primera corriente de fluido, que incluye una primera solución y células. El medio para generar una corriente de fluido genera una segunda corriente de fluido, que incluye una segunda solución. La primera corriente de fluido y la segunda corriente de fluido se ponen en comunicación fluida entre sí para generar una tercera corriente de fluido. La primera corriente de fluido y la segunda corriente de fluido se combinan usando una unión en T para combinar corrientes de fluido para formar una tercera corriente de fluido.

Otro ejemplo de un aparato para aplicar un choque osmótico a células en un método de acuerdo con la presente invención tiene algunas de las mismas características que el aparato del ejemplo anterior. Los medios para generar una corriente de fluido incluyen una bomba y un tubo que se inserta en la primera solución. La bomba y el tubo juntos generan la primera corriente de fluido que fluye a través del tubo. Los medios para generar una corriente de fluido comprenden una bomba y un tubo que se inserta en la segunda solución. La bomba y el tubo juntos generan una segunda corriente de fluido que fluye a través del tubo. Las bombas pueden controlar de forma independiente y variable la velocidad a la que cada una de la primera corriente de fluido y / o segunda corriente de fluido fluyen a través de los tubos. Los tubos están conectados de forma fluida a la unión en T. La unión en T se conecta al mezclador a través del tubo. El mezclador se conecta al clarificador a través del tubo.

Como apreciará un experto en la técnica, los tubos pueden ser cualquier tipo de dispositivo o material para dirigir una corriente de fluido. Los ejemplos de artículos que son adecuados para su uso como tubo incluyen, pero no se limitan a, canales, tuberías, tubos, tubos de caucho, tubos tygon y combinaciones de los mismos.

Las bombas pueden ser cualquier tipo de bomba útil para mover una corriente de fluido. Los ejemplos de bombas que pueden ser útiles en realizaciones de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bombas peristálticas, bombas de manguera, bombas dosificadoras, bombas de engranajes, bombas helicoidales, bombas de accionamiento magnético, bombas rotodinámicas, bombas de desplazamiento positivo, bombas de chorro, bombas de inyección de gas, bombas electromagnéticas, bombas de chorro de eductor, bombas rotorias, bombas rotativas de paletas, bombas de movimiento alternativo y bombas de diafragma. En una realización particular, las bombas proporcionan una primera solución y una segunda solución a la unión en T en una relación 1: 4, y la primera solución y segunda solución se proporcionan a una unión en T como se explica en otra parte de esta memoria descriptiva.

El uso de un mezclador estático en un método de la invención para combinar la primera y segunda soluciones puede proporcionar un dispositivo efectivo para mezclar corrientes de atributos físicos y de flujo diferentes. Los mezcladores estáticos no tienen partes móviles, creando así un cizallamiento relativamente bajo y proporcionando un control eficaz del tiempo de contacto / residencia dentro del dispositivo.

El clarificador puede ser cualquier tipo de dispositivo útil para la separación del contenido de un fluido basada en el tamaño o la densidad. Los ejemplos de clarificadores que pueden ser útiles en realizaciones de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, filtros, centrifugadoras, microfiltros, microfiltros de flujo tangencial, centrifugadoras continuas y centrifugadoras continuas de discos. Actualmente se prefiere una centrifugadora continua de discos.

Además, un aparato para uso en un método de acuerdo con la presente invención puede comprender un intercambiador de calor u otro dispositivo de alteración de la temperatura para alterar la temperatura de una o ambas de la primera solución y segunda solución y / o una o más de la primera corriente de fluido, segunda corriente de fluido y tercera corriente de fluido. Como será evidente para un experto en la técnica, un intercambiador de calor u otro dispositivo que altera la temperatura se puede colocar en cualquier parte del aparato con el fin de alterar la temperatura de una o ambas de la primera solución y / o segunda solución y / o una o más de primera, segunda y tercera corrientes de fluido en esa ubicación. Los ejemplos no limitantes para la colocación de un intercambiador de calor u otros dispositivos que alteran la temperatura incluyen entre la unión en T y el mezclador, entre el mezclador y el clarificador, y en uno o ambos depósitos. Los ejemplos de intercambiadores de calor adecuados u otros dispositivos que alteran la temperatura que se pueden usar en las realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, calentadores eléctricos, mantas de refrigeración o calentamiento, camisas de refrigeración o calentamiento, intercambiadores de calor de carcasa, intercambiadores de calor de placas, intercambiadores de calor de placas y bastidores, intercambiadores de calor regenerativos, intercambiadores de calor dinámicos, intercambiadores de calor de superficie rascada, intercambiadores de calor de rueda adiabática y bombas de calor.

Además, un aparato para uso en un método de acuerdo con la presente invención puede comprender puertos o dispositivos de acceso cuando se desee. Tales puertos o dispositivos de acceso permitirían la adición de otros componentes o productos químicos a una o ambas primera y segunda soluciones y / o una o más de primera, segunda y tercera corrientes de fluido en cualquier punto. Los ejemplos de puertos o dispositivos de acceso adecuados que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, puertas, puertos, diafragmas, válvulas, uniones y combinaciones de los mismos.

En el funcionamiento normal, el aparato de acuerdo con el segundo ejemplo descrito en la presente memoria arrastra la primera solución que contiene células a través de un tubo usando una bomba y entrega la primera solución a la unión en T. La segunda solución también se extrae a través del tubo usando la bomba y se entrega a la unión en T. La primera solución, las células y la segunda solución se combinan dentro de la articulación en T. Las células se someten a choque osmótico en virtud de la combinación de la primera solución y la segunda solución y el choque osmótico provoca la liberación de moléculas en el espacio periplásmico de las células en la solución circundante. La solución resultante de la combinación de la primera solución, las células y la segunda solución se hace pasar a través del mezclador y hacia el clarificador.

La presente invención proporciona un método para aislar un polipéptido recombinante de interés. El método incluye el cultivo o la fermentación de una célula que produce un polipéptido recombinante de interés, y la célula secreta el polipéptido recombinante de interés en el periplasma de la célula. Las células se incuban en una solución de alta osmolalidad. Una corriente de fluido de las células en la solución de alta osmolalidad se combina con una corriente de fluido de una solución de baja osmolalidad para formar una nueva corriente de fluido, en donde la mezcla de las células en la solución de alta osmolalidad con una corriente de fluido de una solución de baja osmolalidad provoca que las células liberen el polipéptido recombinante de interés en la nueva corriente de fluido. La nueva corriente de fluido puede entonces mezclarse (por ejemplo, con un mezclador estático) y las células se separan a continuación de la nueva corriente de fluido que contiene el polipéptido recombinante de interés utilizando un dispositivo clarificador, tal como un filtro o una centrifugadora.

Como resultará evidente para un experto en la técnica, la célula puede expresar naturalmente el polipéptido de interés y secretarlo en el espacio periplásmico, o la célula se puede modificar genéticamente para contener una construcción, que puede estar integrada en el genoma, para producir el polipéptido de interés y secretarlo en el espacio periplásmico.

La presente invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Choque Osmótico por Combinación de Corrientes de Fluido

Se utilizó una cepa bacteriana de *Pseudomonas fluorescens* (DC 456) que expresaba hormona de crecimiento humana (hGH) en el espacio periplásmico. Después de la fermentación a una escala de biorreactor de 20 L, el caldo se centrifugó en una centrifugadora por lotes de laboratorio. La pasta celular (3811 g) se mezcló con 3,5 L de tampón de inmersión (sacarosa al 25% pH 7,2) durante 30 min. El tampón de choque consistía en Tris 20 mM, pH 7,2. La configuración para el choque osmótico por combinación de corrientes de fluido consistió en dos bombas peristálticas (Masterflex L/S, Modelo # 77200-62) para flujo continuo de dos corrientes (suspensión de células equilibrada y tampón de choque), que se combinaron usando una unión en T, seguido de un mezclador estático (Conprotec, FM 08-10-36) para la mezcla rápida de las dos corrientes, unido a una centrifugadora continua de discos (Westfalia SC-6) para separar las células del extracto líquido. Los caudales para la suspensión celular equilibrada y los tampones de choque fueron de 200 ml / min y 800 ml / min, respectivamente. Las cantidades de hGH en las muestras de las corrientes de alimentación y extracción se midieron por electroforesis capilar (Caliper LabChip 90). El rendimiento escalonado para este proceso (cantidad de hGH en el extracto dividido por la del caldo de fermentación) fue de aproximadamente el 70%.

Ejemplo 2

20 Choque osmótico por procesamiento por lotes

Se utilizó una cepa bacteriana de *Pseudomonas fluorescens* (DC 456) que expresaba hormona de crecimiento humana (hGH) en el espacio periplásmico. Después de la fermentación a una escala de biorreactor de 20 L, el caldo se centrifugó en una centrifugadora por lotes de laboratorio. La pasta celular (150-225 g) se mezcló con 150-225 g de tampón de inmersión (sacarosa al 25% con Bis-Tris 20 M, pH 7,2) durante 30 min. La suspensión equilibrada se mezcló con un volumen 4X de tampón de choque (Bis-Tris 20 mM, pH 7,2), se mantuvo durante 30 minutos y se centrifugó en una centrifugadora por lotes de laboratorio (Eppendorf). Las cantidades de hGH en las muestras de las corrientes de alimentación y extracción se midieron por electroforesis capilar (Caliper LabChip 90). El rendimiento escalonado para este proceso (cantidad de hGH en el extracto dividido por la del caldo de fermentación) fue de aproximadamente el 40%.

30

REIVINDICACIONES

1. Un método de aplicación de choque osmótico a células bacterianas, y el método comprende:
proporcionar una primera solución que comprende células;
proporcionar una segunda solución;
- 5 en el que la osmolaridad de dicha primera solución es mayor que la osmolaridad de dicha segunda solución;
generar una primera corriente de fluido que comprende dicha primera solución;
generar una segunda corriente de fluido que comprende dicha segunda solución; en el que el caudal de la segunda corriente de fluido es mayor que el caudal de la primera corriente de fluido;
- 10 combinar continuamente dichas primera y segunda corrientes de fluido en una tercera corriente de fluido a través del uso de una unión en T conectada a un mezclador estático; y
separar las células de la tercera corriente de fluido que comprende la proteína periplásmica liberada, en la que la separación utiliza un dispositivo para la separación de contenidos de un fluido basada en el tamaño o la densidad.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha combinación de dichas primera y segunda corrientes de fluido en dicha tercera corriente de fluido comprende:
definir una primera trayectoria de fluido a lo largo de la trayectoria de dicha primera corriente de fluido;
- definir una segunda trayectoria de fluido a aproximadamente un ángulo recto con respecto a dicha primera trayectoria que intersecta con dicha primera trayectoria de fluido y no continúa más allá de dicha primera trayectoria de fluido para formar una intersección de dichas primera y segunda trayectorias de fluido;
- 20 definir una tercera trayectoria de fluido conectada a dicha intersección de dichas primera y segunda trayectorias de flujo;
- en el que dicha tercera trayectoria de fluido y dicha primera trayectoria de fluido forman una trayectoria de flujo sustancialmente recta;
- proporcionar dicha primera solución a dicha segunda trayectoria de fluido;
- 25 proporcionar dicha segunda solución a dicha primera trayectoria de fluido; y
combinar dichas primera y segunda soluciones en dicha intersección de dicha primera y dicha segunda trayectoria de flujo de manera que dicha tercera corriente de fluido salga de dicha tercera trayectoria de fluido.
3. El método según la reivindicación 2, en el que dicha segunda solución se proporciona a dicha intersección de dichas primera y segunda trayectorias de fluido a una velocidad mayor que dicha primera solución se proporciona a dicha intersección de dichas primera y segunda trayectorias de fluido.
- 30 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la segunda solución es una suspensión de alta molaridad seleccionada del grupo que consiste en una concentración alta de azúcar o sal.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la aplicación de un choque osmótico a las células causa la liberación de proteínas periplásmicas en la solución.
- 35 6. Un método de preparación de un polipéptido recombinante de interés que comprende:
(a) fermentar una célula huésped bacteriana transformada con un sistema de expresión recombinante capaz de provocar la secreción de un polipéptido de interés en el periplasma de dicha célula huésped, en donde dicha fermentación se realiza en un medio de fermentación bajo condiciones tales que el polipéptido de interés se secreta en el periplasma de la célula huésped;
- 40 (b) aplicar un choque osmótico a la célula huésped utilizando un método como el descrito en la reivindicación 1, en el que el método comprende:
(i) proporcionar una primera solución que comprende células mezclando una solución con una célula huésped para formar una suspensión de alta molaridad;
- 45 (ii) proporcionar un tampón de choque de baja molaridad, en el que la osmolaridad de la suspensión de alta molaridad es mayor que la molaridad del tampón de choque de baja molaridad;

- (iii) generar una primera corriente de fluido que comprende la suspensión de alta molaridad y una segunda corriente de fluido que comprende el tampón de choque de baja molaridad, en el que el caudal de la segunda corriente de fluido es mayor que el caudal de la primera corriente de fluido;
 - (iv) combinar continuamente la primera y segunda corrientes de fluido en una tercera corriente de fluido a través del uso de una unión en T conectada a un mezclador estático; y
 - (v) separar las células de la tercera corriente de fluido que comprende la proteína periplásmica liberada, en la que la separación utiliza un dispositivo para la separación de contenidos de un fluido en base al tamaño o la densidad;
- (c) extraer el polipéptido de interés de la tercera corriente de fluido.
- 10 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la suspensión de alta molaridad se selecciona del grupo que consiste en una concentración alta de azúcar o sal, y/o el tampón de choque de baja molaridad tiene un pH de alrededor de 5 a alrededor de 9.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, que comprende además: proporcionar un intercambiador de calor; un disolvente; o un tratamiento químico, antes o después de que se libere la presión osmótica de las células.
- 15 9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la aplicación de un choque osmótico a las células causa la liberación de proteínas periplásmicas en la solución.