

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 457**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/12** (2006.01)

**C12M 3/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2007 PCT/IB2007/000765**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2007 WO07116267**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2007 E 07734092 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2010642**

54 Título: **Biorreactor**

30 Prioridad:

**12.04.2006 ZA 200602976**

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

**31.01.2020**

73 Titular/es:

**QUORUS BIOTECH (PROPRIETARY) LIMITED  
(100.0%)**

**Unit 23A, Waverley Business Park, Kotzee Road  
Mowbray 7700, ZA**

72 Inventor/es:

**EDWARDS, WADE y  
LEUKES, WISTON DANIEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 739 457 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**

Biorreactor

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a un biorreactor. En particular, la invención se refiere a un biorreactor que incluye conductos de membrana y que está adaptado para recibir un primer y segundo fluido.

En la industria biotecnológica y biofarmacéutica, los compuestos de bio-origen más relevantes se producen mediante el uso de bioprocesos que implican sistemas de cultivo celular específicos que se hacen funcionar y controlan dentro de un biorreactor o módulo de cultivo celular.

10 En general, estos sistemas de cultivo celular se caracterizan por varias limitaciones de proceso, así como restricciones físicas fundamentales que delimitan la capacidad de producción máxima de estas tecnologías genéricas establecidas. Estas limitaciones se expresan fundamentalmente como límites en capacidades de transferencia másica de estas tecnologías. Ejemplos de tales tecnologías conocidas incluyen reactores neumáticos, reactores de estado sólido y biorreactores de conductos de membranas.

15 Resulta obvio que las limitaciones mencionadas anteriormente tienen un impacto negativo en la relación coste-eficacia de estos reactores y en la eficacia en la que funcionan.

Además, normalmente un proceso específico requiere un tipo específico de reactor y, por lo tanto, puede resultar extremadamente costoso tener que adquirir nuevos reactores específicos al proceso según se requieran.

Existe la necesidad de un biorreactor mejorado.

20 Existe una necesidad adicional de reactores mejorados que o bien estén adaptados al fin necesario o bien que puedan adaptarse a tal fin de un modo comercialmente viable.

Compendio de la invención

De acuerdo con la presente invención se proporciona un biorreactor que comprende:

- una primera cámara (47) de distribución de fluidos; y
  - una primera cámara (49) de recogida de fluidos, el reactor adaptado para recibir al menos un conducto (37) en comunicación fluida entre la primera cámara de distribución de fluidos y la primera cámara de recogida de fluidos;
- 25

30 en donde el reactor incluye un segundo medio (34) de distribución de fluidos que incluye una pluralidad de distribuidores (46) dispuestos para distribuir el segundo fluido entre la primera cámara (47) de distribución de fluidos y a primera cámara (49) de recogida de fluidos; en donde las cámaras incluyen placas (38, 39) perforadas; en donde las placas perforadas, conductos y segundo medio de distribución de fluidos comprenden un inserto (30) extraíble.

35 El biorreactor puede incluir una pluralidad de conductos en comunicación fluida entre la primera cámara de distribución de fluidos y la primera cámara de recogida de fluidos; Los conductos son, preferentemente, conductos de membrana. En una realización preferente de la presente invención los conductos son axialmente alargados y tienen primer y segundo extremos (parecidos a pajitas para beber). Tales conductos se describen en la patente de los EE.UU. n.º 5.945.002 (Leukes *et al.*) y en la publicación de los EE.UU. n.º 2004/0191855 A1 (Leukes *et al.*).

El primer extremo de los conductos está preferentemente adaptado para acoplarse en la primera cámara de distribución de fluidos y el segundo extremo del conducto está adaptado para acoplarse con la primera cámara de recogida de fluidos.

40 El primer fluido puede ser un líquido, por ejemplo, un nutriente líquido. El segundo fluido puede ser un gas, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno o una mezcla de los mismos.

Preferentemente, los distribuidores distribuyen el segundo fluido entre los conductos. Los distribuidores distribuyen, preferentemente, el segundo fluido en una dirección transversal al eje longitudinal de los conductos. Los

5 distribuidores se extienden, preferentemente, entre la primera cámara de distribución de fluidos y la primera cámara de recogida de fluidos y pueden ser sustancialmente paralelos con los conductos. Hay preferentemente, al menos, dos distribuidores, más preferentemente, al menos tres distribuidores, más preferentemente al menos, cuatro distribuidores, más preferentemente, al menos, cinco distribuidores, más preferentemente, al menos seis distribuidores, más preferentemente, al menos, siete distribuidores y, más preferentemente, al menos, ocho distribuidores.

Los conductores pueden acoplarse con o dentro de las perforaciones de las placas perforadas. Los conductos pueden acoplarse mediante sellantes epóxicos y/o placas de sujeción.

Las cámaras están preferentemente separadas entre sí con los conductos extendiéndose entre ellas.

10 El biorreactor puede incluir un revestimiento que define un lumen (52) entre las cámaras. El biorreactor puede incluir un segundo revestimiento externo. El revestimiento externo puede estar adaptado para recibir fluidos modificadores de temperatura en un espacio entre los dos revestimientos.

El segundo medio de distribución de fluidos incluye, preferentemente, una cámara. El segundo medio de distribución de fluidos puede incluir un colector.

15 El biorreactor puede incluir medios espaciadores, por ejemplo, barras que separan la primera cámara de distribución de fluidos de la primera cámara de recogida de fluidos;

El inserto puede conectarse con un armazón (20) del biorreactor.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un biorreactor con el inserto extraíble que comprende

- 20
- una primera placa (38) de distribución de fluidos;
  - una primera placa (39) de recogida de fluidos; y
  - un segundo medio de distribución de fluidos que incluye una pluralidad de distribuidores dispuestos para distribuir el segundo fluido entre la primera placa de distribución de fluidos y la primera placa de recogida de fluidos.

25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un biorreactor que comprende un bastidor adaptado para recibir el inserto extraíble, una primera entrada (31) de fluidos y medios (32) de distribución, una segunda entrada (33) de fluidos, un primer medio (44) de recogida de fluidos y una salida (35) y una segunda salida (36) de fluidos.

30 Preferentemente, el segundo medio de distribución de fluidos incluye una pluralidad de distribuidores dispuestos para distribuir el segundo fluido entre la primera placa de distribución de fluidos y la primera placa de recogida de fluidos.

35 Preferentemente, el inserto extraíble comprende un lumen y medios para efectuar la comunicación fluida entre el primer medio de distribución de fluidos y el primer medio de recogida de fluidos. Los medios para efectuar la comunicación fluida son, preferentemente, un conducto, lo más preferentemente, un conducto de membrana. En una realización preferente de la presente invención los conductos son axialmente alargados y tienen primer y segundo extremos (parecidos a pajitas para beber). El primer extremo de los conductos está adaptado para conectarse en el primer medio de distribución de fluidos y el segundo extremo del conducto está adaptado para conectarse con el primer medio de recogida de fluidos.

40 El primer medio de distribución de fluidos comprende, preferentemente, un depósito (cámara) de distribución definido por el bastidor, una placa de distribución y una base. La placa de distribución define al menos una perforación en la que se adapta para conectarse un primer extremo de los conductos de membrana. Lo mismo sucede para el primer medio de recogida de fluidos que comprende, preferentemente, un depósito (cámara) de recogida definido por el bastidor, una placa de recogida y una tapa. La placa de recogida define perforaciones en las que se aplican los segundos extremos de los conductos. Se apreciará que los extremos de los conductos de membrana pueden acoplarse, en primer lugar, coaxialmente o, de otro modo, en recipientes o similares que, a su vez, se acoplan con las perforaciones en las placas de distribución o recogida. También se pueden usar sellantes epóxicos. Además, también se pueden usar placas sellantes.

45 La tapa y la base se pueden unir de forma extraíble, preferentemente, al bastidor y/o inserto y se pueden configurar para alojar la primera y/o segunda entradas y/o salidas.

La placa de distribución y/o placa de recogida se incluyen, preferentemente, sobre el inserto.

5 En una realización preferente, la primera entrada de fluidos se encuentra en comunicación fluida con el depósito de distribución. De forma similar, la primera salida de fluidos se encuentra en comunicación fluida con el depósito de recogida. Durante el uso, el primer fluido entra en el depósito de distribución mediante la primera entrada de fluidos, pasa a través de las perforaciones en la placa de distribución, a través de los conductos de membrana, a través de las perforaciones en la placa de recogida y en el depósito de recogida donde el primer fluido sale del biorreactor a través de la primera salida de fluidos.

10 Preferentemente, el primer fluido es un líquido, por ejemplo, un medio líquido (nutriente) adecuado para mantener el crecimiento de microorganismos y el segundo fluido es un gas, por ejemplo, aire. Ejemplos de microorganismos que puede mantenerse por el medio incluyen bacterias y hongos que incluyen, pero no se limitan a *Streptomyces coelicolor* (modo de proceso aeróbico) y *Lactococcus lactis* (modo de proceso anaeróbico).

15 Los conductos de membrana pueden estar comprendidos de un material polimérico o un material cerámico. Preferentemente, los conductos están comprendidos de un material cerámico, más preferentemente,  $Al_2O_3$ . Esto permite la esterilización por autoclave, así como la limpieza química (por ejemplo,  $H_2O_2$ ) sin dañar los conductos de membrana o alojamiento. Los conductos de membrana son, normalmente, rígidos, (al contrario de flexibles, en el caso de conductos de membrana poliméricos), lo cual facilita el montaje del inserto y el biorreactor, mediante lo cual se puede minimizar el roce de los conductos de membrana. La pared de los conductos de membranas cerámica permite una buena sujeción de los microorganismos (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria) y el entorno podría estimular la diferenciación en los organismos adaptados al suelo.

20 Preferentemente, una pluralidad de los conductos de membrana une el primer medio de distribución y recogida de fluidos. Los conductos de membrana pueden seleccionarse previamente dependiendo de la aplicación particular del biorreactor. Se puede conseguir de forma precisa una separación consistente de los conductos de membrana y la separación puede optimizarse para cada aplicación. La separación de los conductos de membrana se efectúa colocando de forma adecuada perforaciones en las placas de distribución y recogida.

25 Preferentemente, el segundo medio de distribución de fluidos se incluye dentro del inserto extraíble. El segundo medio de distribución de fluidos comprende, preferentemente, un colector en comunicación fluida con la segunda entrada de fluidos y con los distribuidores de fluidos emplazados dentro del lumen del inserto. Los medios dispensadores de fluido pueden ser, al menos uno de conducto que se extiende axialmente posicionado adyacente y, preferentemente, sustancialmente paralelo al/a los conducto(s) de membrana. Los distribuidores de fluidos pueden adaptarse para efectuar el movimiento transversal del segundo fluido respecto al eje longitudinal del/de los conducto(s) de membrana. Esto puede conseguir mediante una serie de salidas emplazadas a lo largo de la longitud de los distribuidores de fluidos. Las salidas se dimensionan, preferentemente, de modo que se efectúan velocidades de entrada sustancialmente iguales del segundo fluido en el lumen del inserto por todas las salidas de los medios dispensadores de fluidos. De modo alternativo, las salidas también pueden dimensionarse de modo que se efectúan velocidades de salida sustancialmente iguales del segundo fluido desde los distribuidores por todas las salidas.

35 Esto puede conseguirse generando que las salidas sean tales que la resistencia proporcionada por la salida es sustancialmente superior a la resistencia entre cada salida.

El inserto puede incluir o estar contenido dentro de un manguito. El manguito permite, preferentemente, la inspección visual de los conductos de membrana.

40 Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describirá la invención con más detalle, a modo de ejemplo solo, haciendo referencia a los siguientes dibujos.

- Figura 1 muestra una vista en perspectiva del biorreactor de acuerdo con la presente invención, desde la parte superior y un lateral;
- Figura 2 muestra una vista de sección transversal del biorreactor de acuerdo con la presente invención;
- Figura 3 muestra una vista en perspectiva del inserto extraíble de acuerdo con la presente invención, desde la parte superior y un lateral;
- Figura 4 muestra la producción en el tiempo de actinorodina por *S. coelicolor* mediante el uso de un MFR;
- Figura 5A muestra una vista lateral de un biorreactor montado de acuerdo con un aspecto de la presente invención;
- Figura 5B muestra una sección transversal a través de la vista de la Figura 5A;
- Figura 6 muestra una vista de despiece del biorreactor de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

y  
 Figuras 7A y 7B muestran una vista en plano de sección transversal del segundo patrón de distribución de fluidos dentro del biorreactor, tanto con como sin una biopelícula presente sobre los conductos de membrana.

Descripción detallada de realizaciones preferentes

5 De acuerdo con la invención, tal como se ilustra en la Figura 1, un biorreactor (10) comprende un bastidor (20) adaptado para recibir un inserto (30) extraíble. El biorreactor (10) comprende una primera entrada (31) de fluidos y medios (32) de distribución, una segunda entrada (33) de fluidos y medios (34) de distribución, un primer medio (44) de recogida de fluidos y una salida (35) y una segunda salida (36) de fluidos.

El primer medio (32) de distribución de fluidos comprende un depósito (47) de distribución definido por el bastidor (20), una placa (38) de distribución y una base (48).

El primer medio (44) de recogida de fluidos comprende un depósito (49) de recogida definido por el bastidor (20), una placa (39) de recogida y una tapa (50).

10 La tapa (50) y la base (48) se pueden sujetar de forma extraíble al bastidor (20) y se configuran para alojar la primera y/o segunda entrada (31), (33) y/o salidas (35), (36).

15 El inserto (30) extraíble comprende medios para efectuar la comunicación fluida entre el primer medio (32) de distribución de fluidos y el primer medio (44) de recogida de fluidos en forma de una pluralidad de conductos (37) de membrana. Los conductos (37) son axialmente alargados y tienen primer y segundo extremos. El primer extremo (37) de los conductos está adaptado para acoplarse en las perforaciones de la placa (38) de distribución y el segundo extremo del conducto (37) está adaptado para acoplarse en las perforaciones de la placa de recogida (39).

20 El inserto (30) puede incluir o estar contenido dentro de un manguito (40) tal como se muestra en la Figura 2. El manguito (40) puede estar fabricado con cualquier material adecuado tal como vidrio, acero inoxidable o similares. El vidrio es particularmente adecuado ya que tiene una buena compatibilidad química y una buena estabilidad de temperatura, así como que permite la inspección visual de los conductos de membrana. Se puede usar un material tal como acero inoxidable para aplicaciones de alta presión. El bastidor (20) del biorreactor (10) incluye medios (41) de soporte extraíbles para fijar en posición el primer medio (32) de distribución de fluidos y el primer medio (44) de recogida de fluidos. El medio (41) de soporte puede ser al menos una barra o similares. El medio (41) de soporte permite la inserción sencilla y sin complicaciones del inserto (30) extraíble en el bastidor (20).

25 Durante el uso, el inserto (30) extraíble tal como se muestra en la Figura 3 se posiciona específicamente y se sella tanto hidráulica como neumáticamente dentro del bastidor (20) mediante el uso de medios de bloqueo tales como anillos bloqueadores enroscados flotantes que permiten que el inserto (30) se selle mecánicamente, a continuación, contra el bastidor (20). El sellado mecánico puede conseguirse mediante sellos mecánicos tales como juntas tóricas a base de caucho de silicona o similares. Los medios de bloqueo y sellos mecánicos permiten que los conductos (37) de membrana estén mecánicamente separados del primer medio (32) de distribución de fluidos y el primer medio (44) de recogida de fluidos. El primer medio (32) de distribución de fluidos y el primer medio (44) de recogida de fluidos también pueden estar sellados de un modo similar contra el bastidor (20) de modo que son herméticos para fluidos. El primer fluido se pasa hacia el primer depósito (47) de distribución de fluidos y a través de las perforaciones en la placa (38) de distribución. El primer fluido fluye a través de los conductos (37) de membrana, a través de las perforaciones en la placa (39) de recogida y hacia el primer depósito (49) de recogida de fluidos. El primer fluido puede entonces salir del primer depósito de recogida de fluidos mediante la salida (35).

40 La placa (38) de distribución de fluidos y la placa (39) de recogida puede ser tal como se ilustra en la Figura 2. La placa (38) de distribución permite velocidades de entrada iguales desde el depósito (47) de distribución hacia los conductos (37) de membrana por toda la disposición espacial de los conductos (37) de membrana dentro del inserto (30). Se apreciará que los medios (32) de distribución pueden consistir en más de una placa o similar dependiendo del biorreactor particular, tal como se ilustra en la Figura 3. Se puede usar una segunda placa como una placa de presión cuando se sellan mecánicamente los conductos de membrana dentro de la placa (38) de distribución y/o placa (39) de recogida mediante el uso de juntas tóricas o similares. En ausencia de las segundas membranas de placa se puede sellar dentro de la placa (38) de distribución y/o placa (39) de recogida mediante el uso de resina u otros medios mediante lo cual ya no se necesita la segunda placa de presión.

45 La primera placa (38) de distribución de fluidos y la primera placa (39) de recogida de fluidos así como el bastidor (20) del biorreactor (10) están normalmente fabricados con acero inoxidable o similares. Este material permite,

normalmente, una alta compatibilidad química y, preferentemente, el acabado superficial del acero es inferior a aproximadamente 0,22 !Jm.

Habitualmente, el primer fluido es un líquido y el segundo fluido es un gas, preferentemente aire. Entonces, el biorreactor sería, normalmente, un contactor de gas-líquido que permite la reticulación adecuada para el funcionamiento de un reactor de biopelícula de membrana. Sin embargo, el biorreactor también puede ser un contactor de líquido-sólido con una alta transferencia másica de líquido con respecto a una biopelícula que crece sobre una superficie externa de los conductos de membrana. Esto sería, normalmente, la configuración usada para el proceso de producción de metabolito secundario anaeróbico y proteína recombinante.

En la Figura 2, se muestra con más detalle la disposición de los conductos (37) de membrana. Preferentemente, una pluralidad de conductos (37) de membrana unen el primer medio de distribución (32) y de recogida (44) de fluidos. La configuración de los conductos (37) de membrana en el inserto (30) depende y se determina por, normalmente, la configuración de la placa (38) de distribución. Esta configuración variable permite que el inserto (30) sea flexible respecto al tipo/forma del conducto (37) de membrana. Además, permite determinar de forma precisa la separación de los conductos (37) de membrana y es más fácil mantener una separación consistente entre los conductos (37) de membrana. Esto resulta, habitualmente, complicado de conseguir en la fabricación a gran escala de módulos de reactores comercialmente disponibles y como resultado los conductos de membrana se disponen, a menudo, en manojos aleatorios que no son óptimos para el crecimiento de diversos microorganismos. En la presente invención, es más fácil optimizar la separación de los conductos (37) de membrana para cada aplicación particular. Por ejemplo, cuando se generan biopelículas gruesas, normalmente resulta más ventajoso tener una separación más ancha entre los conductos (37) de membrana. Los conductos (37) de membrana pueden seleccionarse previamente dependiendo del inserto (30) usado y de la aplicación particular.

Los conductos (37) de membrana puede tomar la forma de conductos de membrana tubulares, conductos de membrana capilares, fibra hueca o similares.

Los conductos (37) de membrana pueden estar fabricados con material cerámico, preferentemente, AbO<sub>3</sub>, o cualquier otro material adecuado. Esto permite la esterilización por autoclave (vapor) y la limpieza química sin dañar los conductos o alojamiento de membrana. Los conductos (37) de membrana son, normalmente, rígidos, (al contrario de flexibles, en el caso de conductos de membrana poliméricos), lo cual permite su fácil montaje, con el mínimo contacto de los conductos (37) de membrana. La pared de los conductos de membranas cerámica permite una buena sujeción de los microorganismos y el entorno podría estimular la diferenciación en los organismos adaptados al suelo.

Las ventajas de tener un inserto extraíble son numerosas. En primer lugar, con los reactores convencionales, si un conducto de membrana se rompe o agrieta, a menudo, se necesita reemplazar el reactor por completo. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, el conducto de membrana puede sustituirse fácilmente sin ningún retraso significativo en el proceso. Además, los insertos sellados mecánicamente con una placa de presión tal como se ilustra en la Figura 3 permiten que las membranas individuales se sustituyan y los insertos se reciclen más fácilmente que si se hubiera usado un sellante a base de resina. Esto daría como resultado, obviamente, una disminución en el tiempo invertido en reparaciones y mantenimiento. En segundo lugar, los insertos son fácilmente intercambiables dependiendo de la aplicación, al contrario de muchos reactores que se conocen en la técnica que se producen específicamente para una única aplicación. Tener un reactor que podría usarse para múltiples aplicaciones, dependiendo del inserto usado, sería muy rentable y eficaz. En tercer lugar, como los insertos son extraíbles, la limpieza del reactor es mucho más sencilla. El inserto extraíble proporciona, por lo tanto, flexibilidad de uso para su aplicación en distintos organismos que puedan requerir una separación de conductos de membranas distinta u otras aplicaciones del biorreactor que incluyen, aunque no se limitan a, filtrado de membrana para sistemas de perfusión. Además, el conjunto del biorreactor es tal que los insertos son intercambiables, se puede retirar fácilmente después de su uso para la limpieza o se puede cambiar para una disposición óptima.

Como se ilustra en las Figuras 2 y 3, los medios para distribuir el segundo fluido (34), normalmente un gas tal como aire, dentro del inserto (30) preferentemente comprende un colector (45) en comunicación fluida con distribuidores (46) emplazados dentro del lumen (52) del inserto (30). El colector (45) y/o distribuidores (46) está(n) integralmente formado(s) con el inserto (30). Esto permite que el inserto (30) esté fabricado con distintos tipos de materiales ya que los distribuidores forman parte de la estructura del inserto y no están sujetos al inserto en una etapa final.

Los distribuidores (46) son conductos posicionados adyacentes y sustancialmente paralelos con al menos un conducto (37) de membrana (no se muestra en la Figura 3). Los distribuidores (46) están adaptados para efectuar el movimiento transversal del aire respecto a las longitudes axiales de los conductos (37) de membrana. Esto se puede conseguir mediante una serie de salidas (no se muestra) emplazadas a lo largo de la longitud de los distribuidores (46)

Las salidas están dimensionadas, preferentemente, de modo que se efectúan velocidades de entrada sustancialmente iguales del aire a través de todas las salidas en el inserto (30). De este modo, el flujo de aire desde cada salida es, normalmente, sustancialmente el mismo. Esto puede conseguirse generando que las salidas sean tales que la resistencia proporcionada por la salida es sustancialmente superior a la resistencia entre cada salida.

5 Además, la disposición de los distribuidores (46) en el inserto (30) es tal que el flujo del aire se propaga/distribuye uniformemente alrededor de los conductos (37) de membrana (véanse Figuras 7A y 7B).

Los distribuidores (46) pueden fabricarse de modo tal para aumentar o disminuir el número de salidas a lo largo de la longitud de los distribuidores (46) según la aplicación particular para la cual se usa el biorreactor. El flujo de fluido del aire a través de la salida por todos los conductos (37) de membrana aumenta, normalmente, la turbulencia a tasas de flujo de fluido secundarias bajas lo cual facilita una transferencia másica de fluidos secundaria alta a tasas de transferencia de baja energía. Cuando el segundo fluido es aire, la transferencia másica es, preferentemente, transferencia másica de oxígeno. La comunicación fluida entre la normalmente fase líquida (por ejemplo, medio líquido) dentro de los conductos de membrana y la normalmente fase gaseosa (por ejemplo, aire) dentro del inserto se consigue mediante el uso de un gradiente de presión diferencial por todos los conductos (37) de membrana. El gradiente de presión necesita, normalmente, el sellado neumático o hidráulico de diversos compartimentos del biorreactor (10).

10

15

La recirculación del aire en la parte superior del inserto facilita, entonces, la transferencia energética cuando se calienta el aire para proporcionar una temperatura de incubación favorable al crecimiento celular. El flujo de aire transversal a la orientación de los conductos (37) de membrana permitiría, normalmente, una buena transferencia másica de oxígeno. Esto podría dar como resultado biorreactores más grandes que tienen una transferencia másica de oxígeno tan buena como los biorreactores más pequeños sin limitación de oxígeno. Los distribuidores (46) pueden personalizarse para adecuarse a las necesidades de una aplicación particular o tamaño de reactor de modo que se proporciona suficiente fluido (aire).

20

Normalmente, el primer y segundo extremo del biorreactor (10) no son intercambiables. Esto se debe a la configuración del inserto (30), como se muestra en las Figuras 1, 2 y 3, donde los distribuidores (46) pasan a través del primer extremo del inserto (30) y se posicionan en el extremo superior del biorreactor (10) solo. En este caso, los distribuidores (46) no pasan a través del inserto (30) completo y el segundo extremo del inserto/bastidor/biorreactor. Esta configuración de conjunto preferencial minimiza el número de sellos necesario para sellar los diversos componentes del biorreactor (10) y, por lo tanto, minimiza los posibles puntos de acceso de contaminación. Sin embargo, se apreciará que otras realizaciones pueden incluir extremos intercambiables y, por lo tanto, la presente invención no está limitada a la realización descrita anteriormente.

25

30

El biorreactor (10) está construido, normalmente, a partir de materiales que permiten la esterilización por vapor y limpieza con químicos agresivos tales como disolventes, agentes cáusticos y oxidantes. La altura del biorreactor se determina que sea tal, basándose en la porosidad y caudal de fluido de funcionamiento usados, de modo que la resistencia al flujo ofrecida con respecto a la primera corriente de fluido es tal que se facilita la permeación a lo largo de la longitud completa del conducto (37) de membrana. Además, los conductos de membrana no son demasiado largos de modo que la primera trayectoria de flujo de fluido en el funcionamiento vertical en el modo de cultivo aeróbico es subóptima para el crecimiento (es decir, la biopelícula se vuelve demasiado pesada y colapsa) y la formación del producto (es decir, la trayectoria del flujo toroidal es tan extendida que los productos residuales metabólicos inhiben la biomasa en el extremo inferior del biorreactor).

35

40

Durante el uso, el biorreactor (10) se coloca en una disposición sustancialmente vertical con la primera entrada (31) de fluidos normalmente en la base del reactor y la segunda entrada (33) de fluidos normalmente en la parte superior del biorreactor (10). Se establece una biopelícula sobre una superficie externa de los conductos (37) de membrana, que pueden ser conductos de membrana capilares. Esto se consigue mediante filtración inversa de una espesa o inóculo vegetativo del microorganismo deseado mediante la membrana y drenando cualquier permeado fuera del lumen (52) del inserto (30) en el lumen de los conductos (37) de membrana que salen a través de la primera salida (35) de fluidos. El inóculo se inmoviliza, de este modo, sobre la superficie de la membrana.

45

Un medio nutritivo adecuado del microorganismo se suministra, a continuación, en los conductos (37) de membrana para perfundir a través de los conductos y en el lumen (52) del inserto (30) continuamente a una tasa suficiente para permitir que se produzca el crecimiento en la biopelícula establecida sobre la superficie. El medio nutritivo que pasa a través de los conductos (37) de membrana entra en el depósito (49) de recogida y sale a través de la salida (35) y puede bombearse de nuevo y reciclarse a través del medio (32) de distribución del inserto (30). Algo del medio nutritivo pasa a través de la membrana formando gotas de permeado sobre la biopelícula y descendiendo por la biopelícula. Se suministra aire humidificado en el inserto (30) por medio de distribuidores (46) y se ventila a través de las salidas (36) y (51). La salida (51) puede estar cerrada o mantenerse abierta, dependiendo de la aplicación del biorreactor. Preferentemente, la salida incluye un manómetro de presión (no se muestra) para permitir controlar la presión en el biorreactor. Cualquier producto de la biopelícula se recoge en el permeado del medio nutritivo que se retira del lumen (52) del reactor junto con el segundo fluido a través de la salida (36).

50

55

El aire que se sopla a través del biorreactor (10) sirve para suministrar el oxígeno que se requiere para la viabilidad de la biopelícula y también para eliminar las esporas y células muertas que se desprenden desde la superficie externa de la biopelícula.

5 Cuando se hace funcionar el biorreactor como un contacto líquido-sólido, el medio nutritivo se suministra a la biopelícula a través de segundos distribuidores (46) de fluidos. El lumen (52) del reactor se carga con medio de cultivo y la biopelícula se inmoviliza sobre la superficie de los conductos (37) de membrana según pasa el flujo a través de la biopelícula en el lumen (37) del conducto tal como se describe durante el proceso de inoculación para el funcionamiento aeróbico anterior. El permeado sale a través del primer medio de distribución (32) o recogida (44) de fluidos y se recoge del primer medio de entrada (31) o salida (35) de fluidos. Esto permite el crecimiento  
10 microaerofílico o anaeróbico de una biopelícula con transferencia másica aumentada de nutrientes a la biopelícula y la retirada continua de residuos metabólicos y/o producto.

Las Figuras 5A, 5B y 6 muestran una realización alternativa del biorreactor de acuerdo con la presente invención (conductos no se muestran). En estas figuras, el biorreactor es una unidad sellada que puede venderse premontada para adecuarse a un fin particular. En tal realización, el biorreactor comprende barras espaciadoras que separan la primera cámara (depósito) (47) de distribución de fluidos de la primera cámara (depósito) (49) de recogida de fluidos.  
15

Los componentes del biorreactor se aseguran conjuntamente mediante tornillos (61) hexagonales y las interfaces entre componentes se vuelven herméticas al fluido (gas) mediante juntas (62) tóricas.

En la Figura 6, se emplaza una primera placa (63) de interruptor de fluidos adyacente a la primera entrada (31) de fluidos para ofuscar un vector de entrada del primer fluido que da como resultado su distribución mejorada dentro de la primera cámara (47) de distribución de fluidos.  
20

En las Figuras 7A y 7B, las simulaciones del LMA (edad media local) son análogas con respecto al análisis de distribución del tiempo de residencia simulado.

El resultado de la simulación permite el análisis de las variaciones en la edad de la molécula de aire saliente a determinar. Diferencias significativas indican zonas dentro del volumen designado donde flujo y/o condiciones desiguales del flujo laminar y turbulento se generan o existen (donde los números de Reynolds (Re) se encuentran significativamente por encima o por debajo de 2.000 dentro del mismo volumen que está siendo analizado).  
25

En situaciones donde existen Re de  $\gg$  y  $\ll$  2.000, la premisa de que el organismo se encuentra en un entorno de baja cizalla (una ventaja inherente con respecto a la presente invención), es nula. Las simulaciones de la dinámica de fluidos computacional (CFD) indican que el diseño toma provecho de esto y puesto que todos los valores de LMA se encuentran más o menos dentro de los 7-10 segundos de cada uno indica que los perfiles de velocidad son similares y muestra que el entorno alrededor del organismo es, de hecho, más homogéneo que heterogéneo - estas condiciones se analizaron hasta el momento en lo que respecta al hardware (todas las condiciones indicadas como "sin biopelícula") así como teniendo en cuenta el posible flujo de aire aumentado (y la posible canalización) que sería evidente con la biopelícula presente en los conductos (se simuló todos los modelos donde una biopelícula es de 12 mm). La biopelícula de 12 mm simuló una restricción de espacio desde 27 mm entre los conductos hasta 3 mm después de una cantidad predeterminada de crecimiento.  
30  
35

Todas las simulaciones se realizaron a una velocidad de aire lineal equivalente a 1 volumen de aire que entra y sale por minuto.

Las vistas de sección transversal presentadas en las Figuras 7A y 7B simulan patrones de chorro de entrada de aire (patrón de 4 vectores) y si una biopelícula simulada restringiría de forma negativa el pasaje de aire a cualquiera de las zonas dentro del volumen del reactor.  
40

A continuación, se describirá la invención haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1

Producción de actinorodina mediante *Streptomyces coelicolor*

45



Esterilización

El módulo de MFR, reticulación, manómetros de presión y equipo/frascos auxiliares se sometieron a autoclave por separado y se conectaron entre sí usando una técnica estéril. El MFR se configuró para el funcionamiento aeróbico de acuerdo con procedimientos de funcionamiento estándares.

5 Inoculación

El ECS del módulo de MFR se cargó con aproximadamente 2 l de medio de crecimiento que contenía 100 ml de un cultivo de matraz de *S. coelicolor* de 3 días. El inóculo miceliar se inmovilizó sobre la superficie externa de membranas capilares bajo presión. Se recogió el inóculo utilizado desde el lado del lumen de las membranas capilares a través de la salida de medio o línea primaria en un recipiente de recogida. Una vez se ha drenado el volumen completo del inóculo dentro del ECS, el reactor se configuró para su funcionamiento aeróbico de acuerdo con procedimientos de funcionamiento estándares.

Funcionamiento

15 El MRF se incubó a 28 °C y se hizo funcionar aeróbicamente con un flujo de aire por toda la superficie externa de las membranas capilares (y biopelícula) a un caudal de 2 l por hora. La presión de aire dentro del ECS se mantuvo a 20 kPa durante los primeros 26 días y se aumentó a 40 kPa y 50 kPa en los días 27 y 36, respectivamente. El diferencial de aire entre el lumen capilar y el ECS se usó para controlar el flujo por toda la superficie de la membrana y suministro de nutrientes a la biopelícula. La presión del medio se controló manualmente para mantener un flujo estable según la biopelícula en desarrollo aumentaba la resistencia al flujo de nutrientes influyendo, de este modo, en los niveles de flujo.

20 La biopelícula creció rápidamente expandiéndose a lo largo de capa superficie de la membrana, cambiando de amarillo a rojo de color antes de que se observara la diferenciación y esporulación. El día 8, la biopelícula era de color gris azulado con esporas y había visibles gotas de color negro rojizo de permeado sobre la superficie de la película. El permeado colorado que contenía el producto de actinorodina se recogió mediante la salida de aire y permeado. El nivel de actinorodina dentro del permeado se cuantificó espectrofotométricamente usando un procedimiento de funcionamiento estándar basado en métodos descritos por Ates *et al.* 1997 (E1%, 1CM = 355).

Compendio de productividad

30 Se produjo un total de 1.067 mg mediante el MFR durante un período de 50 días. Efectivamente, la producción se inició a los 3 días después de la inoculación. La producción máxima fue entre los días 27 y 50 (coincidiendo con el crecimiento confluyente y diferenciación de la biopelícula) proporcionando un promedio de producción diaria de 32,3 mg y una productividad volumétrica promedio (rendimiento espacio/tiempo) de 0,98 mg/h por l de volumen del reactor.

Tabla: Enumera la concentración máxima y de media de actinorodina (mg/l) y la productividad (mg/h por l de volumen de reactor) durante un período de 50 días.

Actinorodina (mg/l)			Rendimiento espacio/tiempo (mg/h por l de vol. de reactor)		
Máxima	Media	DE	Máxima	Media	DE
135,73	38,33	30,12	3,19	0,61	0,72

**Ejemplo 2**

35 La producción de β-lactamasa recombinante mediante cepa PRA290 de *Lactococcus lactis* usando el sistema de expresión P170.

Esterilización

40 El módulo de MFR, reticulación, manómetros de presión y equipo/frascos auxiliares se sometieron a autoclave por separado y se conectaron entre sí usando una técnica estéril. El MFR se configuró para el funcionamiento microaerófilico o anaeróbico de acuerdo con procedimientos de funcionamiento estándares.

Inoculación

5 Se inocularon 50 ml de un cultivo de 15 h de *L. lactis* PRA290 (que produce enzima de  $\beta$ -lactamasa recombinante con el control del promotor P170) directamente en el ECS del módulo de MFR. El ECS se cargó con medio de cultivo de LM1 y se hizo funcionar en el modo recirculatorio, se bombeó medio de cultivo desde el caparazón lateral a través de las membranas capilares y se recogió el permeado desde el lado del lumen. Este proceso permitió la inmovilización de la biomasa sobre la superficie externa de las membranas capilares.

Funcionamiento

Se cultivó *L. lactis* en medio de cultivo de LM1 que contenía 200 mM tampón de fosfato, pH 7,2. El cultivo se incubó a 25 °C.

10 Inicialmente, el MFR se hizo funcional anaeróbicamente en modo recirculatorio. Durante este periodo, las muestras se tomaron de la salida de lumen y se registraron las actividades del pH y de las enzimas. Después de 15 h la salida de lumen se desconectó del recipiente de suministro de nutrientes y se recogió el permeado en un recipiente de recogida de permeados limpio. Se medio de crecimiento de LM1 fresco se unió al MFR y el reactor se suministró continuamente con nutrientes frescos. Las actividades del flujo, pH y enzimas del permeado se controlaron a lo largo del tiempo. El flujo se reguló manualmente cambiando la presión suministrando el medio nutritivo al MFR en el lateral del caparazón. Según la biopelícula inmovilizada se volvía más gruesa y la resistencia contra el flujo aumentaba, la presión del medio aumentó gradualmente para mantener los niveles de flujo. El flujo óptimo se determinó controlando el pH del permeado, donde la estrategia de control de flujo se dirigió en mantener el pH dentro del ECS lo más cerca posible al intervalo de pH óptimo (pH 5,5-6,5) para la expresión proteica recombinante bajo el control del promotor P170.

20 Cuando se observó que los niveles de pH del permeado se acercaban a pH 4, se observó que la actividad de  $\beta$ -lactamasa caía y que los niveles de flujo ya no se podían mantener, incluso a presiones que se acercaban a los 100 kPa, el experimento se finalizó.

25 La actividad de  $\beta$ -lactamasa se cuantificó espectrofotométricamente usando un procedimiento de funcionamiento estándar basado en el método de Nitrocefín (Oxoid).

Compendio de productividad

30 Los niveles de  $\beta$ -lactamasa iniciales disminuyeron durante las primeras 15 h según la actividad residual del inóculo se diluía en el recipiente de suministro de medio durante su recirculación. Además, una concentración de nutrientes aumentada y disolución de ácido láctico producido por *L. lactis*, aunque resultaba óptimo para su crecimiento, hubiera afectado negativamente la autoinducción del sistema de expresión P170 que controlaba la producción de  $\beta$ -lactamasa limitando, de este modo, la expresión de enzima recombinante. Durante este periodo de 15 horas, se produjeron aproximadamente 1.021 unidades de  $\beta$ -lactamasa.

35 Después de 15 h la película en desarrollo fue aparente como una fina película sobre la superficie de las membranas capilares. Al cambiar el funcionamiento de MFR a un suministro continuo de medio nutritivo fresco a un flujo bajo, se consiguieron condiciones óptimas para la expresión de  $\beta$ -lactamasa (pH 5,5-6,5). De 16-38 h de postinoculación se produjo un total de 309 unidades de  $\beta$ -lactamasa con una titulación máxima de 785 U/l. Durante este periodo se mantuvieron caudales superiores, dando como resultado una productividad volumétrica máxima de 19,7 U/L por volumen de reactor y una media de 10,5 U/h por l de volumen de reactor. Según crecía la biopelícula y aumentaba la resistencia al flujo de nutrientes, se necesitaron presiones secuencialmente superiores para mantener el flujo. Durante un período durante la noche cuando el MFR no se controlaba, los niveles de flujo disminuyeron y el pH del permeado se redujo a un pH 4,5, por debajo del intervalo óptimo de expresión. Aumentando la presión que suministra el suministro de nutrientes, se recuperaron niveles de flujo superiores hasta cierto punto, pero el grosor de biopelícula aumentado y resistencia no permitió que los niveles de flujo suficientemente altos estabilizaran el pH dentro de un intervalo de producción, ni caudales suficientemente altos evitar el crecimiento de plancton de la biopelícula (esto puede dar como resultado un retroceso en crecimiento en el recipiente de suministro de nutrientes). De 39-62 h se produjo un total de 87 unidades de  $\beta$ -lactamasa con una titulación máxima de 400 U/l. Debido a las bajas tasas de flujo la productividad volumétrica se redujo a la mitad, alcanzando un máximo de 6,9 U/L por volumen de reactor con una media de 5,3 U/h por l de volumen de reactor.

50

## ES 2 739 457 T3

Tabla: Enumera la actividad máxima y de media de  $\beta$ -lactamasa (U/l) y la productividad (U/h por l de volumen de reactor) durante un período de 50 días.

Tiempo de proceso	Unidades de $\beta$ -lactamasa producidas	Actividad de $\beta$ -lactamasa (U/l)			Rende reactor)		
		Máxima	Media	DE	Máxima	Media	DE
0-15 h	~1021	812	706	97	Modo recirculatorio		
16-28 h	309	785	439	198	19,7	10,5	5,2
39-62 h	87	400	262	114	6,9	5,3	3,0
0-62 h	1417	812	568	450	19,7	7,9	4,9

Se debe tener en cuenta la siguiente referencia: Ates S., Elibol M. y Mavituna F. (1997) *Production of actinorhodin by Streptomyces coelicolor in batch and fed-batch cultures; Process Biochem* 32: 273-278.

**REIVINDICACIONES**

1. Un biorreactor que comprende:
- una primera cámara (47) de distribución de fluidos; y
  - una primera cámara (49) de recogida de fluidos, el reactor adaptado para recibir al menos un conducto (37) en comunicación fluida entre la primera cámara de distribución de fluidos y la primera cámara de recogida de fluidos;
- 5
- en donde el reactor incluye un segundo medio (34) de distribución de fluidos que incluye una pluralidad de distribuidores (46) dispuestos para distribuir el segundo fluido entre la primera cámara de distribución de fluidos y a primera cámara de recogida de fluidos;
- 10
- en donde las cámaras incluyen placas (38, 39) perforadas;
- en donde las placas perforadas, conductos y segundo medio de distribución de fluidos comprenden un inserto extraíble (30).
2. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1 que incluye una pluralidad de conductos en comunicación fluida entre la primera cámara de distribución de fluidos y la primera cámara de recogida de fluidos;
- 15
3. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 2 en donde los conductos son conductos de membrana.
4. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 2 en donde un primer extremo de los conductos está adaptado para acoplarse en la primera cámara de distribución de fluidos y el segundo extremo de los conductos está adaptado para acoplarse con la primera cámara de recogida de fluidos.
5. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el primer fluido es un líquido.
- 20
6. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el segundo fluido es un gas.
7. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1 en donde los distribuidores distribuyen el segundo fluido entre los conductos.
8. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 7 en donde los distribuidores distribuyen el segundo fluido en una dirección transversal al eje longitudinal de los conductos.
- 25
9. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1 en donde los distribuidores se extienden entre la primera cámara de distribución de fluidos y la primera cámara de recogida de fluidos;
10. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1 que incluye al menos tres distribuidores.
11. Un biorreactor de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde los distribuidores incluyen una serie de salidas emplazadas a lo largo de la longitud de los distribuidores.
- 30
12. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 11 en donde las salidas están dimensionadas de modo que se efectúan velocidades de salida sustancialmente iguales del segundo fluido desde los distribuidores por todas las salidas.
13. Un biorreactor de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye un revestimiento que define un lumen (52) entre las cámaras.
- 35
14. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 13 que incluye un segundo revestimiento externo.
15. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 14 en donde el revestimiento externo está adaptado para recibir fluidos modificadores de temperatura en un espacio entre los dos revestimientos.
16. Un biorreactor de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye barras espaciadoras que separan la primera cámara de distribución de fluidos de la primera cámara de recogida de fluidos;
- 40
17. Un biorreactor de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el inserto se adapta para acoplarse con un armazón del biorreactor.
18. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el inserto extraíble comprende
- una primera placa (38) de distribución de fluidos;

- una primera placa (39) de recogida de fluidos; y

- un segundo medio de distribución de fluidos que incluye una pluralidad de distribuidores dispuestos para distribuir el segundo fluido entre la primera placa de distribución de fluidos y la primera placa de recogida de fluidos.

5 19. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un bastidor adaptado para recibir el inserto extraíble, una primera entrada (31) de fluidos y medios (32) de distribución, una segunda entrada (33) de fluidos, un primer medio (44) de recogida de fluidos y una salida (35) y una segunda salida (36) de fluidos.

10 20. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 19 que incluye una pluralidad de distribuidores dispuestos para distribuir el segundo fluido entre la primera placa de distribución de fluidos y la primera placa de recogida de fluidos.

21. Un biorreactor de acuerdo con las reivindicaciones 1-17, 19 y 20 en donde los conductos de membrana están comprendidos de un material polimérico o un material cerámico.

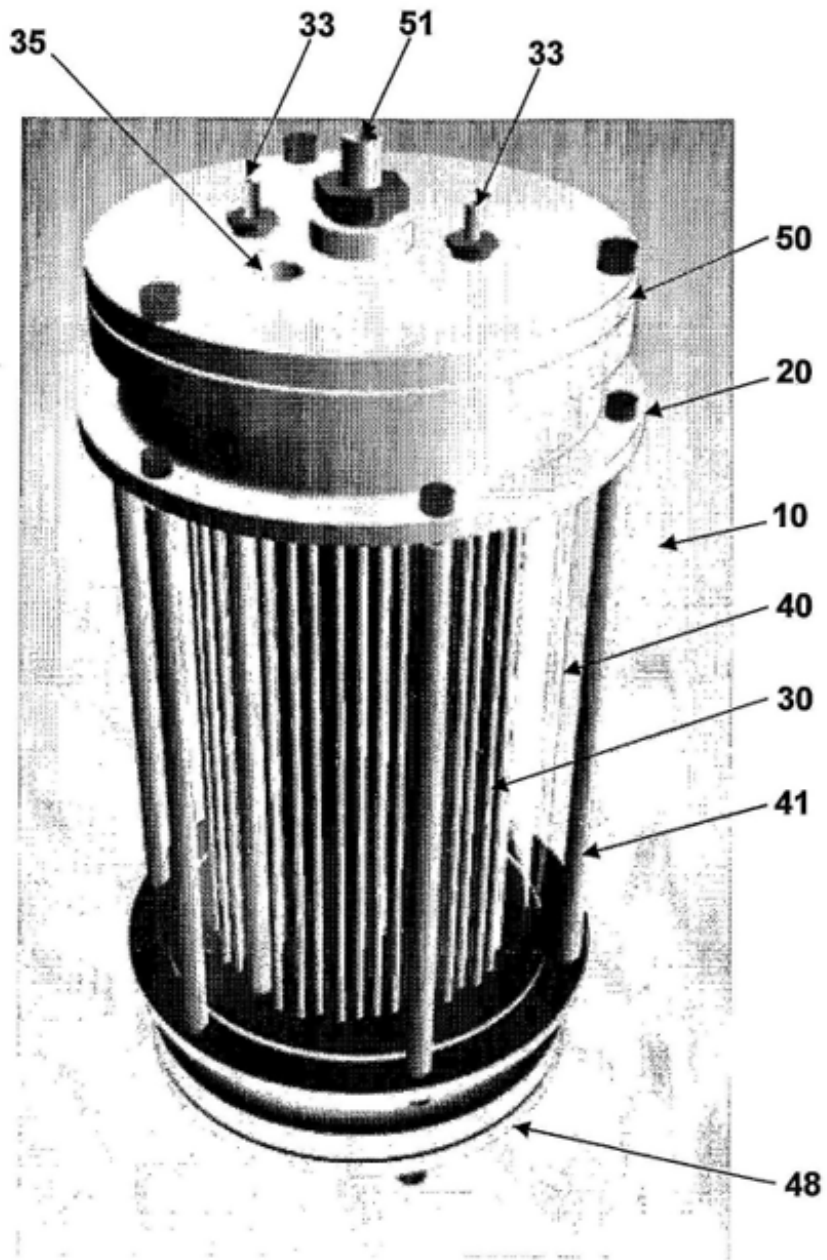


Figura 1

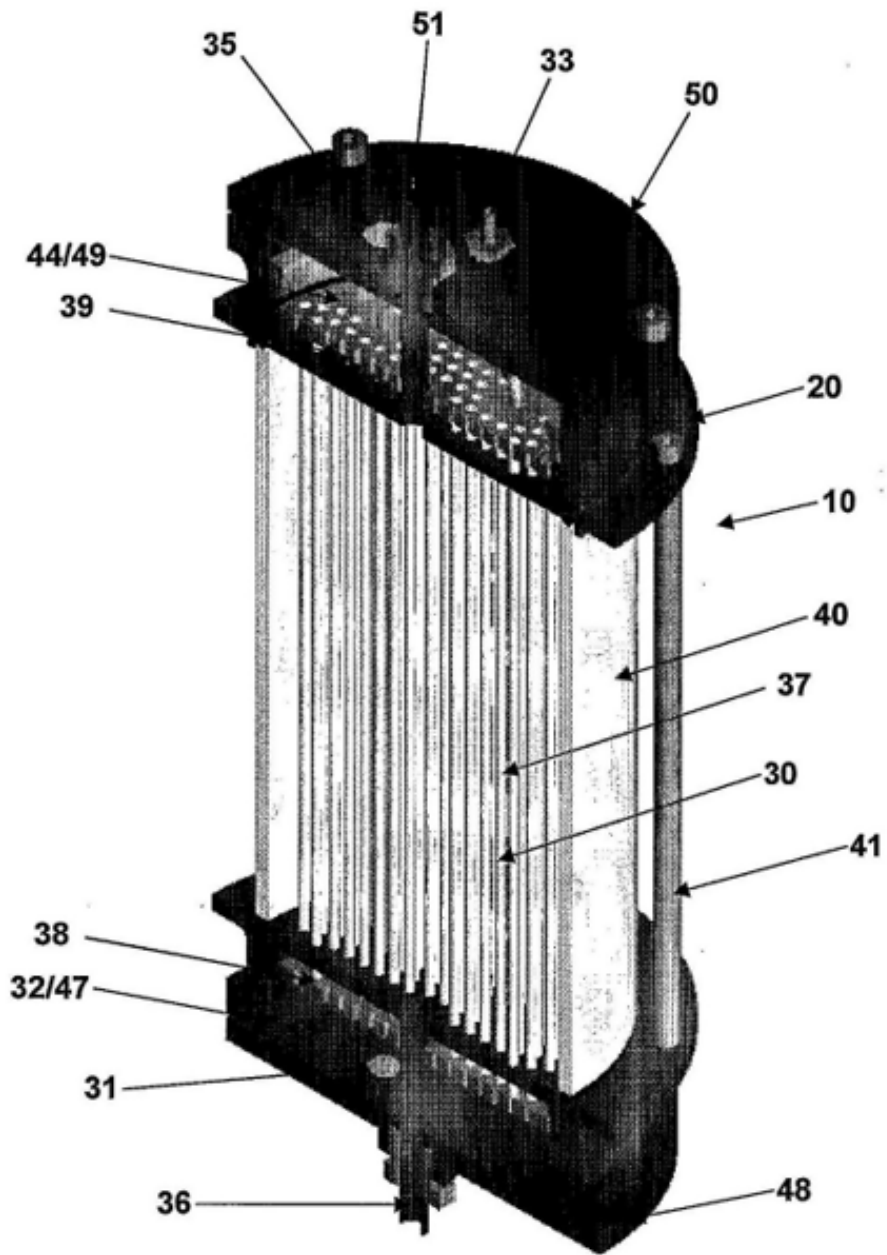


Figura 2

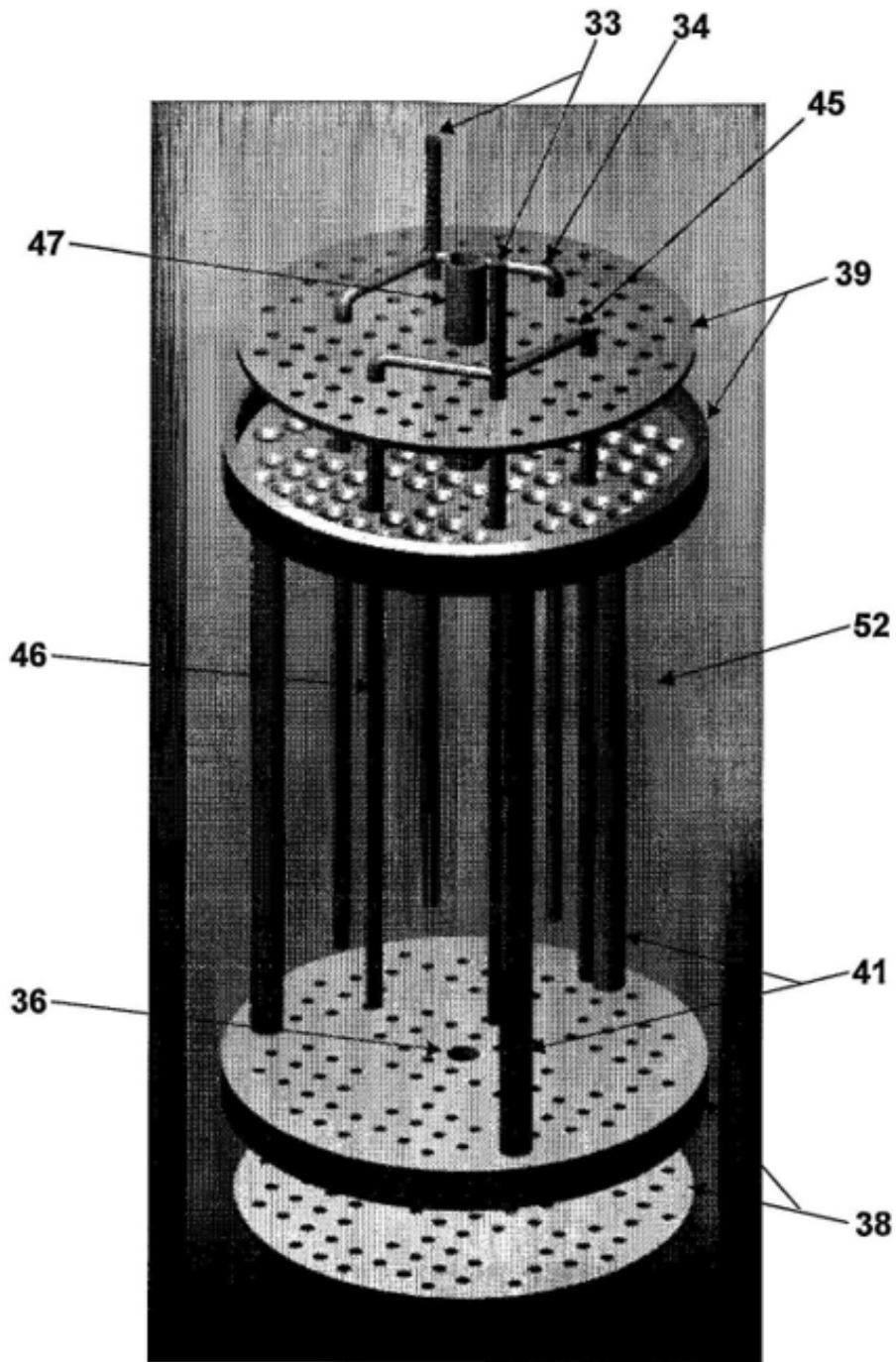


Figura 3



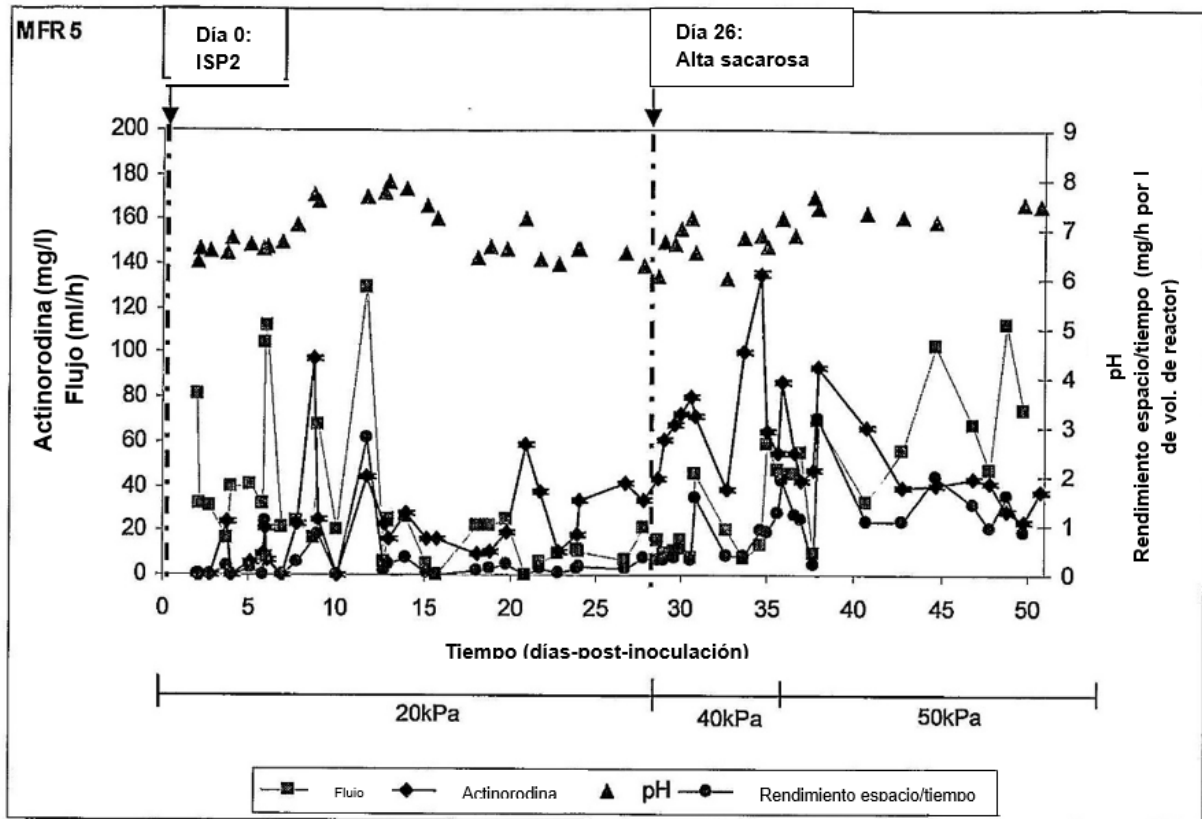


Figura 4

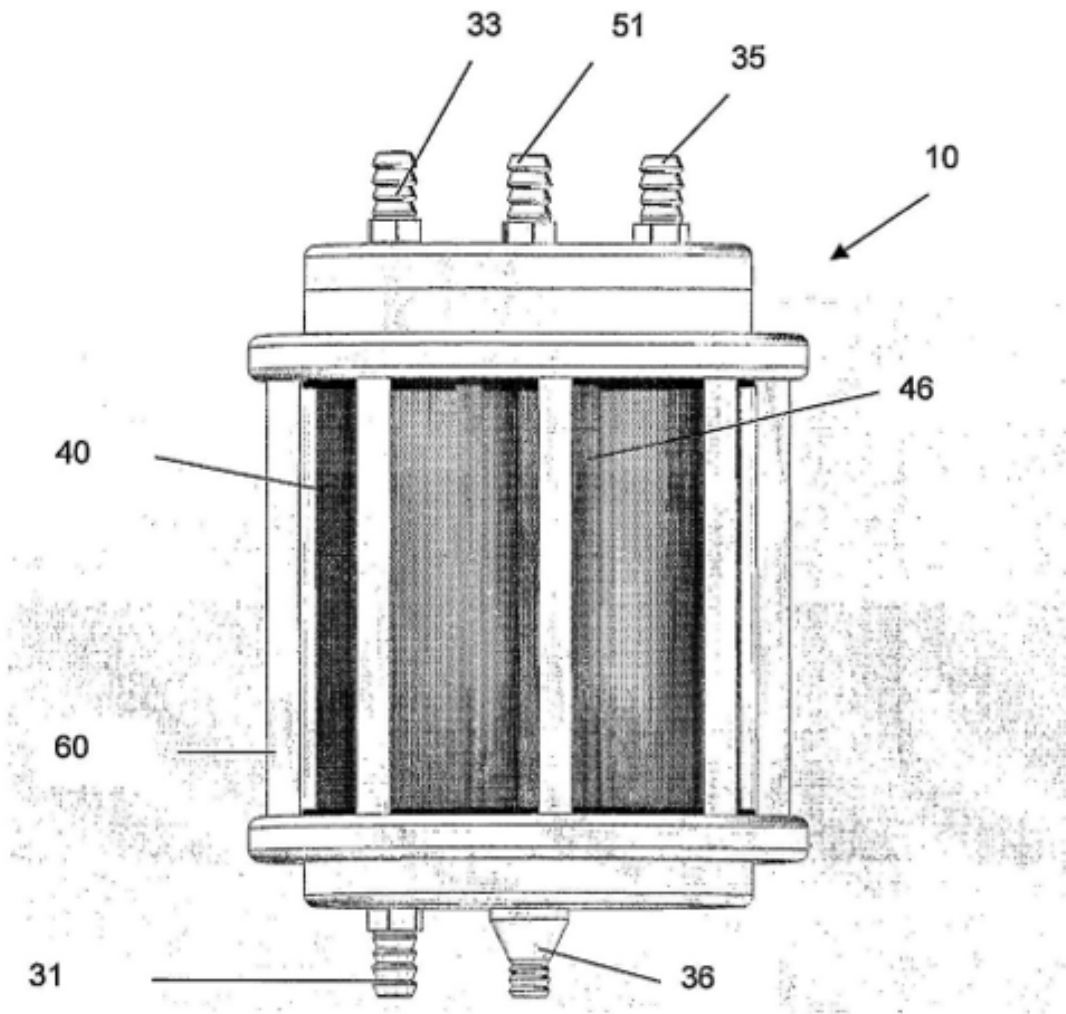


FIGURA 5A

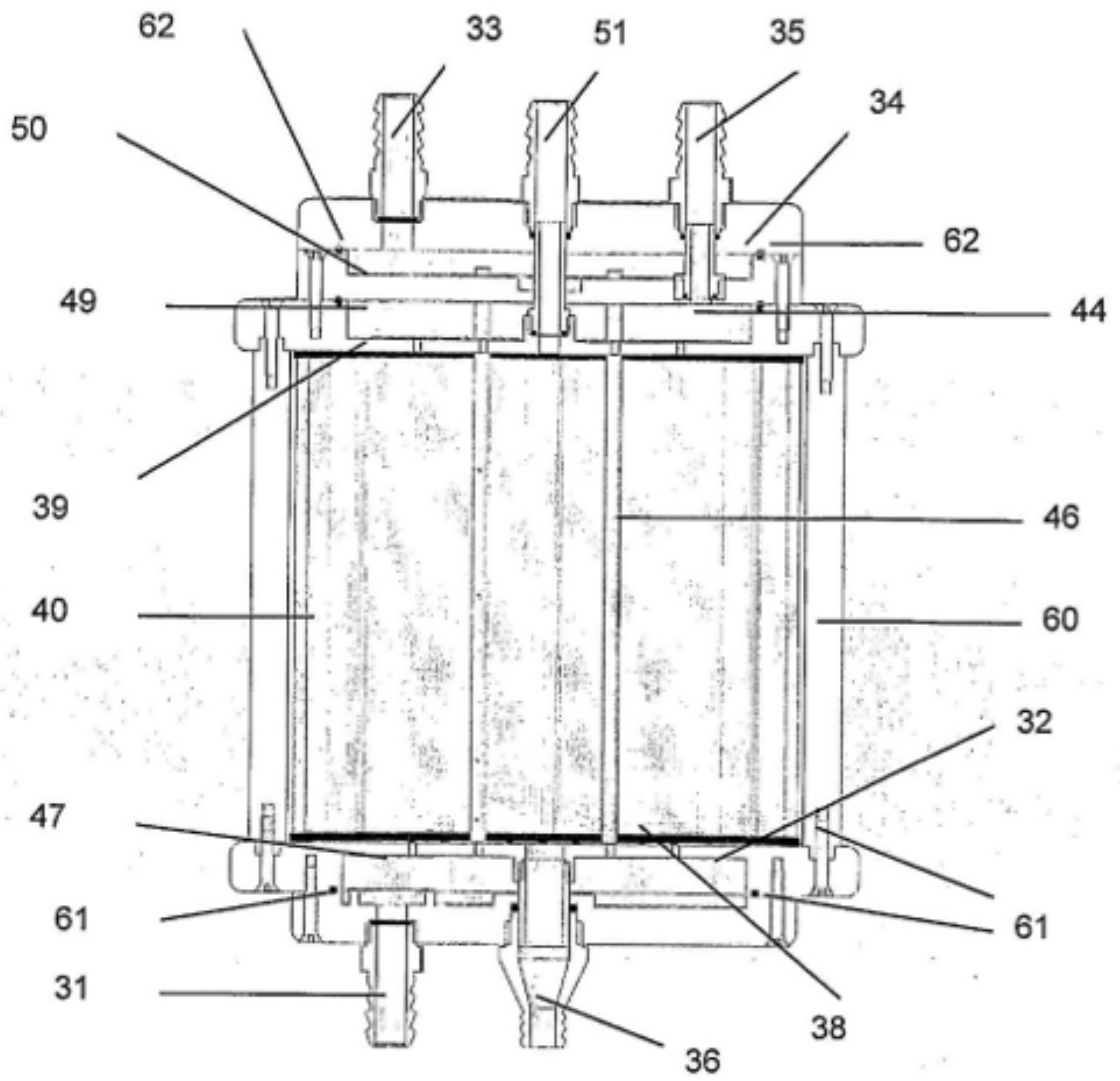


FIGURA 5B

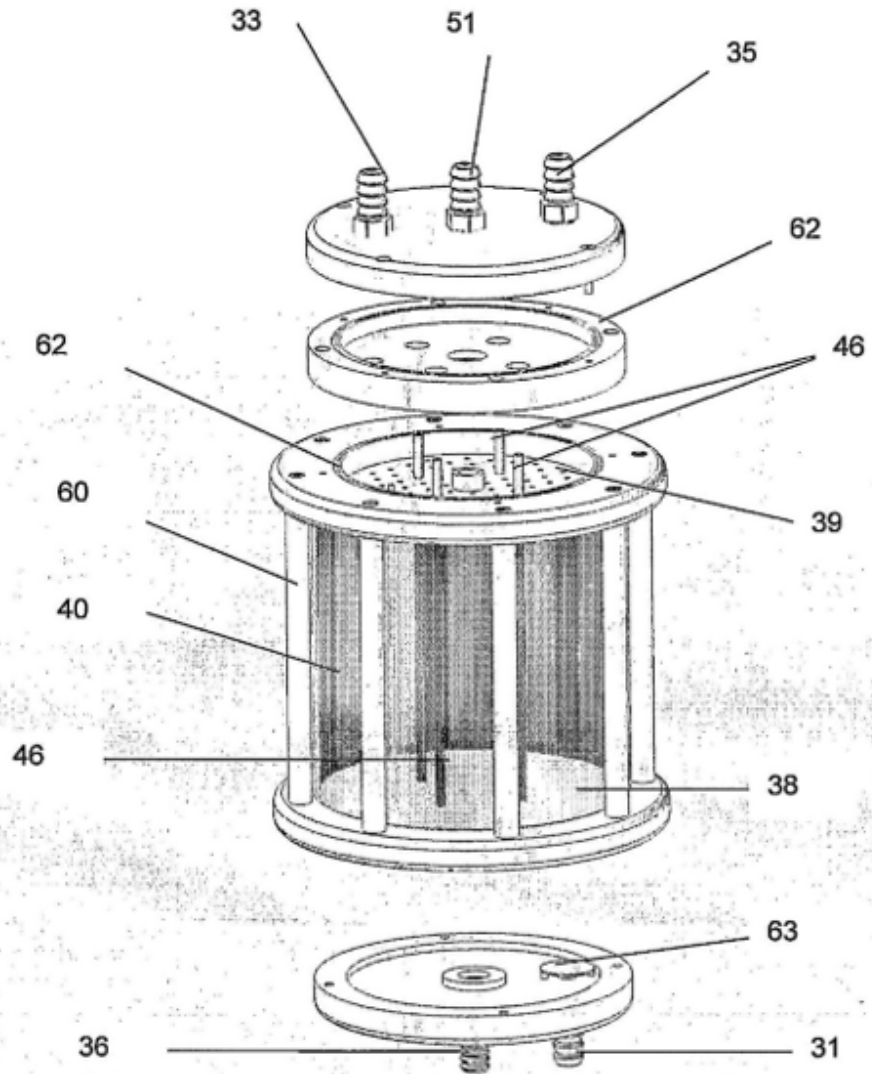


Figura 6

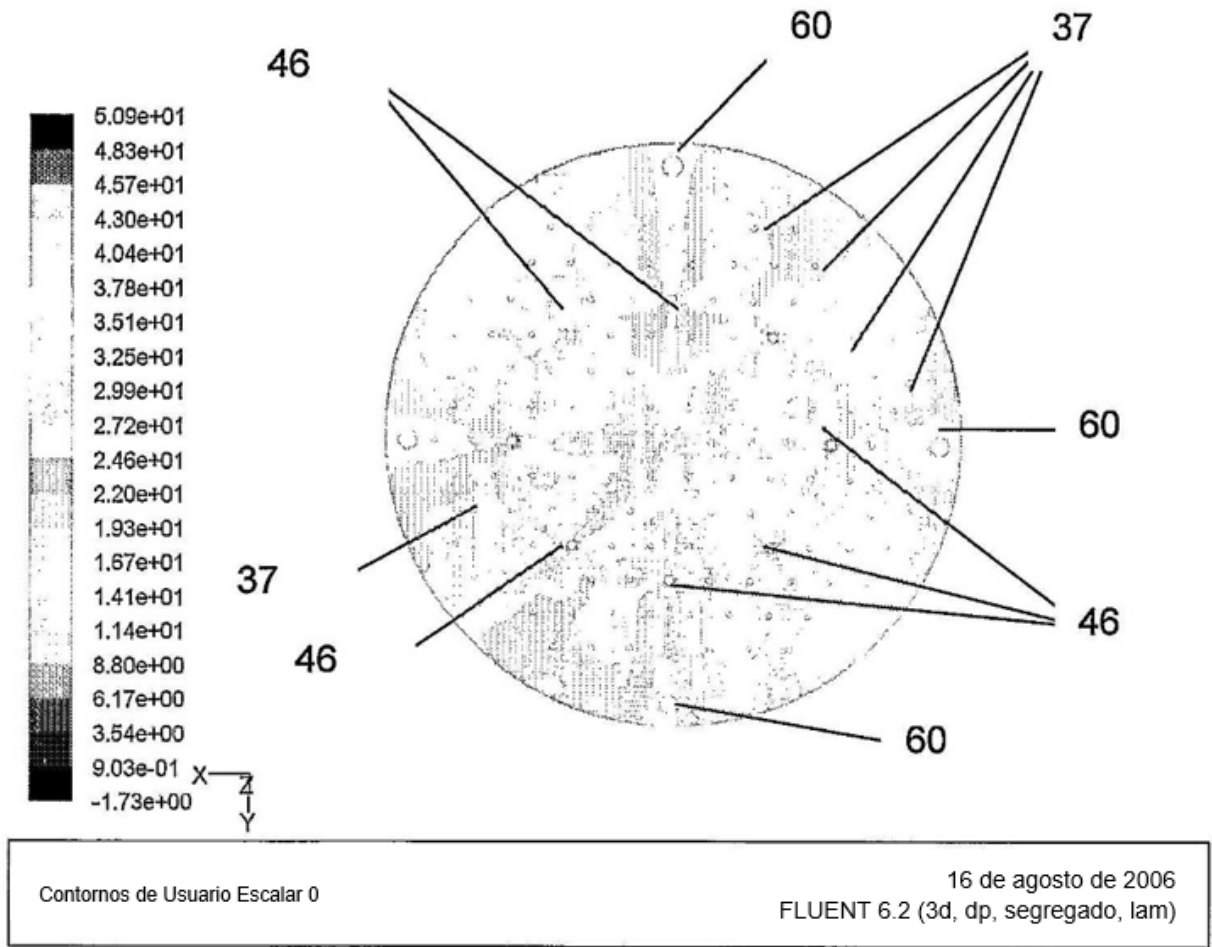


FIGURA 7A

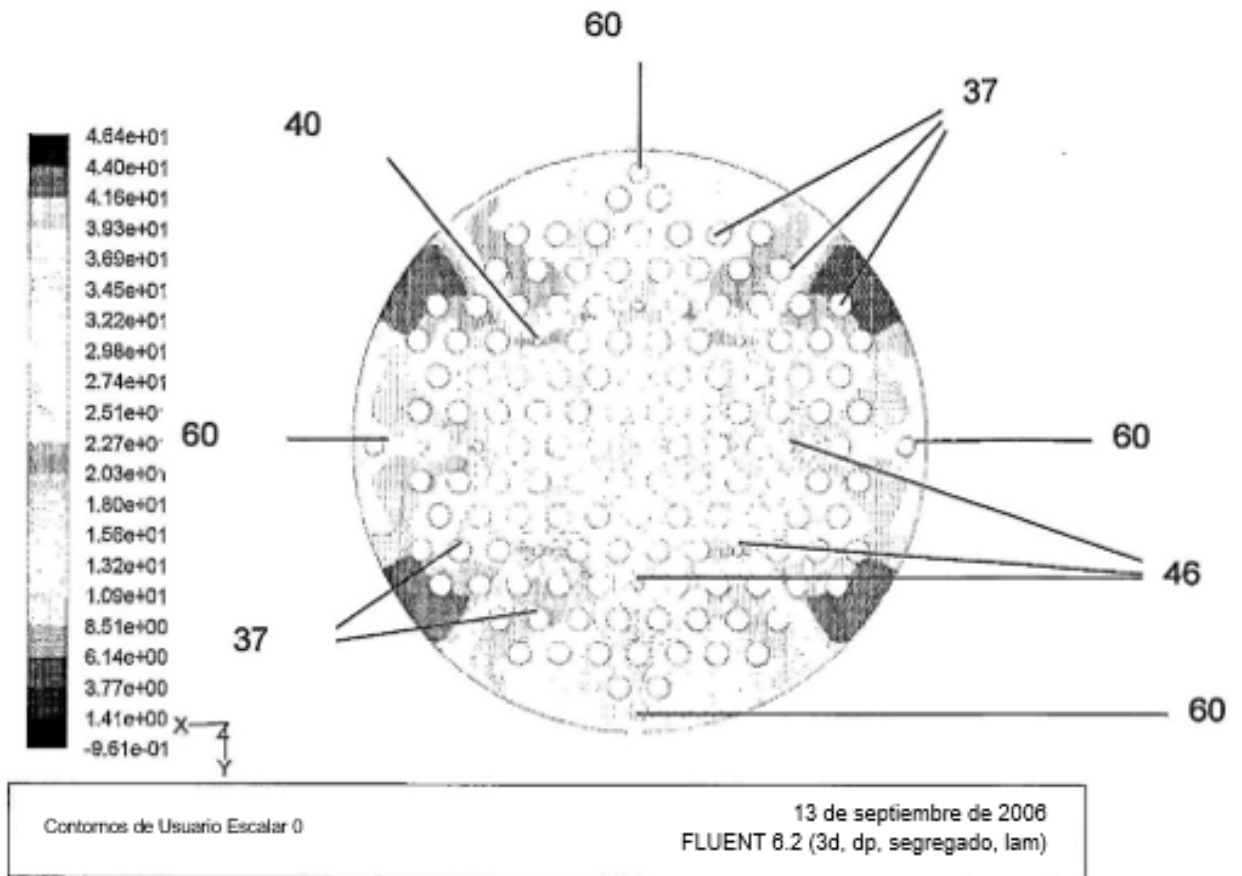


FIGURA 7B