

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 428**

51 Int. Cl.:

A61K 31/716 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2013 PCT/US2013/039939**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13169768**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2013 E 13788362 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2858652**

54 Título: **Proceso de múltiples etapas para la producción de un inmunomodulador**

30 Prioridad:

07.05.2012 US 201261643572 P

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

19.02.2020

73 Titular/es:

**KEMIN INDUSTRIES, INC. (100.0%)
2100 Maury Street
Des Moines, Iowa 50317, US**

72 Inventor/es:

**LEVINE, ROBERT, BERNARD;
LEBRUN, JEFFREY, RICHARD y
HORST, GEOFFREY, PAUL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 743 428 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

Proceso de múltiples etapas para la producción de un inmunomodulador

Introducción

5 Esta sección proporciona información de antecedentes relacionada con la presente divulgación que no es necesariamente técnica anterior.

El beta glucano puede funcionar como un inmunomodulador. El sistema inmunitario de los organismos superiores ha evolucionado para reconocer el beta glucano, ya que generalmente se asocia con la superficie de los microorganismos patógenos. Al introducir beta glucano de una fuente no patógena en la dieta de humanos y animales, uno puede, de hecho, preparar el sistema inmunitario para que su respuesta a una exposición real a la enfermedad sea más robusta. A nivel fisiológico, el beta glucano interactúa con los receptores de la superficie celular para iniciar una cascada de eventos, incluida la fagocitosis y la producción de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y numerosas interleuquinas (IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12). Hasta la fecha, la gran mayoría de las investigaciones sobre el beta glucano como inmunomodulador se ha llevado a cabo con beta glucano derivado de la levadura. El beta glucano de levadura contiene una mezcla de enlaces beta-1,3/1,6 y está asociado con componentes de la pared celular de la levadura que hacen que el beta glucano derivado de la levadura sea difícil de aislar.

Resumen

La presente tecnología incluye sistemas, procesos, artículos de fabricación y composiciones que se relacionan con organismos en crecimiento del género *Euglena*, que producen beta glucano y predominantemente beta-1,3-glucano.

Se proporcionan métodos para cultivar *Euglena* que incluyen: cultivar *Euglena* heterotróficamente en un medio de crecimiento; eliminar una porción del medio de crecimiento que comprende *Euglena* para formar un primer medio de crecimiento eliminado, el primer medio de crecimiento eliminado tiene una concentración de *Euglena* de al menos aproximadamente 50 gramos de peso seco por litro y la *Euglena* tiene más de 30% en peso de beta glucano y menos del 70% en peso de beta glucano; y reponer una parte de los medios de crecimiento con medios de crecimiento frescos para formar un primer medio de crecimiento reabastecido. Las etapas de crecimiento, eliminación y reabastecimiento pueden repetirse una pluralidad de veces. Se agrega una fuente de carbono a los medios de crecimiento en las etapas de crecimiento, eliminación y reabastecimiento de manera que la concentración nunca exceda los 30 gramos por litro. La etapa de eliminación y la etapa de reabastecimiento pueden realizarse simultáneamente o la etapa de eliminación y la etapa de reabastecimiento pueden realizarse secuencialmente. La harina de algas preparada de acuerdo con los métodos descritos posee una capacidad sorprendente e inesperada para modular el sistema inmunitario de los animales.

Otras áreas de aplicabilidad serán evidentes a partir de la descripción proporcionada en este documento. La invención está definida por el objeto de las reivindicaciones.

Dibujos

35 Los dibujos descritos en este documento son solo para fines ilustrativos de realizaciones seleccionadas y no todas las implementaciones posibles, y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

La Figura 1 ilustra una primera realización de un proceso para cultivar *Euglena* de acuerdo con la presente tecnología.

La Figura 2 ilustra una segunda realización de un proceso para cultivar *Euglena* de acuerdo con la presente tecnología.

La Figura 3 ilustra una tercera realización de un proceso para cultivar *Euglena* de acuerdo con la presente tecnología.

La Figura 4 ilustra una cuarta realización de un proceso para cultivar *Euglena* de acuerdo con la presente tecnología.

40 La Figura 5 ilustra una primera realización de un sistema para cultivar *Euglena* de acuerdo con la presente tecnología.

La Figura 6 ilustra una segunda realización de un sistema para cultivar *Euglena* de acuerdo con la presente tecnología.

La Figura 7 ilustra una tercera realización de un sistema para cultivar *Euglena* de acuerdo con la presente tecnología.

La Figura 8 ilustra realizaciones de un reactor neumático dividido por circuito interno (ALR), un ALR de tubo concéntrico de circuito interno y un ALR de circuito externo para su uso en la presente tecnología.

45 La Figura 9 ilustra seis configuraciones diferentes de separador de gas de ALR de circuito interno y tres configuraciones diferentes de separador de gas de ALR de circuito externo para su uso en la presente tecnología.

La Figura 10 ilustra la agitación mecánica de los medios de crecimiento *Euglena* para producir mezcla radial y mezcla axial.

La Figura 11 ilustra dos ejemplos de cuchillas de bajo corte para agitación mecánica de *Euglena* en medios de

crecimiento, que incluyen una cuchilla de ángulo fijo a la izquierda y una cuchilla marina a la derecha para usar en la presente tecnología.

La Figura 12 representa gráficamente la concentración de *Euglena* en un proceso repetido de crecimiento por lotes de acuerdo con la presente tecnología.

- 5 La Figura 13 representa gráficamente la concentración de *Euglena* en un proceso continuo de crecimiento por lotes de acuerdo con la presente tecnología.

10 La Figura 14 representa gráficamente el índice de fagocitosis de neutrófilos de ratón muestreados de sangre periférica 48 horas después del tratamiento con beta glucano. Las barras representan medias (\pm SE), ($n = 3$ ratones). Con respecto a cada par de barras, la barra izquierda representa una dosis de 0,0035 % en peso de alimentación y la barra derecha representa una dosis de 0,035 % en peso de alimentación.

La Figura 15 representa gráficamente la actividad de las células asesinas naturales (NK) de las células del bazo recolectadas 48 horas después del tratamiento con beta glucano. Con respecto a cada par de barras, la barra izquierda representa una dosis de 0,0035 % en peso de alimentación y la barra derecha representan una dosis de 0,035 % en peso de alimentación.

- 15 La Figura 16 representa gráficamente la formación de IL-2 (citoquina) (por ELISA) en ratones 48 horas después del tratamiento con glucano. Las barras representan medias (\pm SE), ($n = 3$ ratones). Con respecto a cada par de barras, la barra izquierda representa una dosis de 0,0035 % en peso de alimentación y la barra derecha representan una dosis de 0,035 % en peso de alimentación.

20 La Figura 17 representa gráficamente la formación de anticuerpos después de la inyección de ovoalbúmina y la dosificación diaria de tratamientos con beta glucano. Las barras representan medias (\pm SE), ($n = 3$ ratones). Con respecto a cada par de barras, la barra izquierda representa una dosis de 0,0035 % en peso de alimentación y la barra derecha representan una dosis de 0,035 % en peso de alimentación.

25 La Figura 18 representa gráficamente la supervivencia de ratones después de una inyección de *E. coli* en el día 0. La harina de algas, el beta-1,3-glucano de algas purificadas y el beta glucano derivado de levadura se alimentaron por vía oral por sonda durante 5 días a una dosis equivalente a 0,01% de la ración diaria de alimentación que comienza 2 días antes de la inyección de *E. coli* (día -2). El grupo de control con PBS recibió solo una sonda de PBS mientras que el grupo de tratamiento con antibióticos recibió 13 mg/kg de ampicilina por vía oral en los días 0 a 4. $n = 10$ ratones por grupo de tratamiento. La línea punteada representa ampicilina y las líneas más altas a más bajas como se ve en el extremo derecho del gráfico (es decir, días 7-10) representan beta-1,3-glucano de algas purificado, harina de algas, beta glucano de levadura y control de PBS, respectivamente.

30 La Figura 19 representa gráficamente la formación de anticuerpos después de la inyección de ovoalbúmina (días 3 y 16) y la dosificación diaria de tratamientos con beta glucano durante 23 días. El control negativo recibió ovoalbúmina pero no beta glucano. Las barras representan medias \pm error estándar. $n = 3$ ratones por grupo de tratamiento. Cada grupo de barras representa, de izquierda a derecha, control de PBS, harina de algas, beta glucano de algas purificado y beta glucano de levadura. Téngase en cuenta que los valores de control de PBS solo se muestran para la dosis de 0,002%.

35 La Figura 20 representa gráficamente la actividad de las células asesinas naturales (NK) de las células de bazo recolectadas en el día 14. Las barras representan medias \pm error estándar. $n = 3$ ratones por grupo de tratamiento. Cada grupo de barras representa, de izquierda a derecha, control de PBS, harina de algas, beta glucano de algas purificado y beta glucano de levadura. Téngase en cuenta que los valores de control de PBS solo se muestran para la dosis de 0,002%.

40 La Figura 21 representa gráficamente el índice de fagocitosis de neutrófilos de ratón muestreados de sangre periférica el día 14. Las barras representan medias \pm error estándar, $n = 3$ ratones por grupo de tratamiento. Cada grupo de barras representa, de izquierda a derecha, control de PBS, harina de algas, beta glucano de algas purificado y beta glucano de levadura. Téngase en cuenta que los valores de control de PBS solo se muestran para la dosis de 0,002%.

45 La Figura 22 representa gráficamente el beta glucano, la densidad de biomasa de *Euglena*, el momento de las extracciones y los reabastecimientos y la glucosa residual en los medios de crecimiento durante un proceso repetido de crecimiento por lotes de acuerdo con la presente tecnología.

Descripción detallada

50 La siguiente descripción de tecnología es meramente a modo de ejemplo en la naturaleza del tema, fabricación y uso de una o más invenciones, y no pretende limitar el alcance, la aplicación o los usos de cualquier invención específica reivindicada en esta solicitud o en cualquier otra solicitud que se pueda presentar reivindicando prioridad a esta solicitud, o patentes emitidas a partir de ella. Con respecto a los métodos divulgados, el orden de las etapas presentados es solo de ejemplo y, por lo tanto, el orden de las etapas puede ser diferente en diversas realizaciones cuando sea posible. Excepto en los ejemplos, o donde se indique expresamente lo contrario, todas las cantidades

numéricas en esta descripción que indican cantidades de material o condiciones de reacción y/o uso deben entenderse modificadas por la palabra "aproximadamente" al describir el alcance más amplio de la tecnología.

Las divulgaciones de intervalos son, a menos que se especifique lo contrario, incluyen puntos finales e incluyen todos los valores distintos e intervalos divididos adicionales dentro del intervalo completo. Por lo tanto, por ejemplo, un intervalo de "de A hasta B" o "de aproximadamente A hasta aproximadamente B" incluye A y B. Descripción de los valores e intervalos de valores para parámetros específicos (tales como temperaturas, pesos moleculares, porcentajes en peso, etc.) no son exclusivos de otros valores e intervalos de valores útiles en el presente documento. Se prevé que dos o más valores ejemplificados específicos para un parámetro dado pueden definir puntos finales para un intervalo de valores que pueden reivindicarse para el parámetro. Por ejemplo, si el parámetro X se ejemplifica en este documento para tener un valor A y también se ejemplifica para tener un valor Z, se prevé que el parámetro X pueda tener un intervalo de valores de aproximadamente A hasta aproximadamente Z. De manera similar, se prevé la divulgación de dos o más intervalos de valores para un parámetro (ya sea que dichos intervalos estén anidados, superpuestos o distintos) incluyen todas las combinaciones posibles de intervalos para el valor que podría reivindicarse utilizando los puntos finales de los intervalos divulgados. Por ejemplo, si el parámetro X se ejemplifica en este documento con valores en el intervalo de 1-10, o 2-9, o 3-8, también se prevé que el parámetro X pueda tener otros intervalos de valores, que incluyen 1-9, 1-8, 1-3, 1-2, 2-10, 2-8, 2-3, 3-10 y 3-9.

La presente tecnología incluye sistemas, procesos, artículos de fabricación y composiciones relacionadas con el crecimiento de algas, que incluyen *Euglena* sp., y específicamente *Euglena gracilis*. La *Euglena* se puede cultivar heterotróficamente hasta densidades celulares similares o superiores a 20 a 60 gramos de biomasa en peso seco por litro de medio de crecimiento. El cultivo de *Euglena* a tales densidades puede ser más económico para la producción comercial de beta glucano y harina de algas que contiene beta glucano que los métodos fotosintéticos de cultivo de *Euglena*. A diferencia del beta glucano derivado de la levadura, *Euglena* produce beta glucano que contiene casi por completo enlaces beta-1,3, donde el beta glucano está fácilmente biodisponible con poco o ningún procesamiento de la célula de *Euglena*, y donde el beta glucano también se puede extraer y purificar fácilmente, si se desea. La biomasa de *Euglena* (harina de algas) o los productos de beta glucano derivados de *Euglena* producidos usando los métodos y sistemas actuales demuestran resultados sorprendentes e inesperados en la modulación del sistema inmunitario de los animales.

La estructura del beta glucano derivado de *Euglena* es diferente de los beta glucanos de otros organismos. Una diferencia importante es que mientras otros organismos producen beta glucanos incorporados en su pared celular, el género de protistas conocido como *Euglena* puede producir beta glucano, incluida una forma particulada de beta glucano, conocido como paramilón, que no se incorpora a la estructura de la pared celular. Por el contrario, *Euglena* acumula beta glucano como un gránulo insoluble en agua en el citoplasma y utiliza esta forma de beta glucano como una forma de almacenamiento de energía mediante carbohidratos.

Varios aspectos de la presente tecnología incluyen el cultivo, la concentración y el secado de células enteras de microorganismos de *Euglena* sp. para su uso como aditivos en alimentos y piensos. Opcionalmente, el paramilón puede extraerse de *Euglena* mediante un proceso de separación física y química que tiene ciertas ventajas sobre otros procesos. Mientras que varias sustancias como el alfa tocoferol, la astaxantina o el paramilón pueden extraerse de *Euglena*, la presente tecnología proporciona una plataforma eficiente y rentable para el cultivo de células completas de *Euglena* (harina de algas) para usar como ingrediente alimentario o como materia prima para la extracción adicional de paramilón altamente purificado. La harina de algas y el beta glucano extraído también proporcionan propiedades especiales, incluida la capacidad de modular el sistema inmunitario de un animal, como se describe más adelante en este documento.

La reducción del coste de producción de *Euglena* y paramilón derivado de *Euglena* convierte a *Euglena* en un organismo adecuado para la producción comercial a gran escala de compuestos valiosos. Por ejemplo, se ha sugerido que *Euglena* puede ser una fuente natural para producir alfa tocoferol asequible, una forma valiosa de vitamina E (véase Ogbonna et al.; Journal of Applied Phycology 10: 67-74, 1998). *Euglena* también es una fuente de beta-1,3-glucano o paramilón, un polisacárido con aplicaciones como inmunomodulador en productos alimenticios, nutracéuticos, cosméticos, bebidas y piensos para animales. Se sabe que el beta-1,3-glucano de levadura mejora la actividad del sistema inmunitario innato en animales y humanos (por ejemplo, publicación del documento de Estados Unidos No. 2006/0009419 de Ross et al.). Existen diferentes formas de beta-1,3-glucanos, incluidas las variaciones en la ramificación, la solubilidad y el peso molecular que afectan la afinidad y la eficacia de unión final en los sujetos. El beta-1,3-glucano de *Euglena* puede ser una fuente rentable de beta-1,3-glucano cuando se produce a mayor escala. *Euglena* puede acumular beta-1,3-glucano como gránulos citoplasmáticos que juntos representan entre el 30 y el 90% de la masa celular total. Los glucanos a base de levadura, por el contrario, típicamente comprenden menos del 15% de la masa total del organismo y están unidos a la pared celular, lo que requiere una extracción adicional para alcanzar una actividad biológica comparable cuando se administra por vía oral o intravenosa a los animales. El resultado es que los glucanos a base de levadura generalmente pueden variar en precio de \$ 50 a más de \$ 300 por kilogramo. Al mismo tiempo, el paramilón altamente purificado de *Euglena* está disponible, pero solo en pequeñas cantidades y a precios altos; por ejemplo, más de \$ 50.000 por kilogramo (véase el catálogo de Sigma Aldrich en línea en www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/89862?lang=en@ion=US).

Los intentos de cultivar *Euglena* incluyen métodos de fermentación a escala de laboratorio, métodos que utilizan la

fotosíntesis como al menos parte del proceso de crecimiento y métodos que optimizan la producción y extracción de vitamina E o paramilón. Sin embargo, al escalar un proceso para el crecimiento de *Euglena*, se deben considerar ciertos problemas de contaminación y transferencia de oxígeno, que generalmente no son problemas que se enfrentan en la escala de laboratorio. Los medios para reducir el coste del cultivo de *Euglena* pueden incluir aumentar aún más la tasa de crecimiento, aumentar la eficiencia de conversión de una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar) a biomasa, aumentar la densidad del cultivo, aumentar la duración de la longitud del lote y aumentar el tamaño de los recipientes en los que se cultiva *Euglena* como un medio para reducir los costos de mano de obra.

El paramilón, por lo tanto, no se produce comercialmente porque no se han desarrollado técnicas de producción rentables para *Euglena*. Al reducir el coste de producción, las aplicaciones para los beta glucanos pueden expandirse dramáticamente. Por ejemplo, los beta glucanos pueden incorporarse como un ingrediente alimentario o de bebida que estimula el sistema inmunitario, como un nutracéutico de bajo coste, o como un aditivo para piensos para animales o acuicultura, donde los beta glucanos pueden incluso usarse como un reemplazo de antibióticos. La capacidad de suplementar o reemplazar antibióticos es particularmente interesante porque el uso de antibióticos en la producción animal como mecanismo de prevención de infecciones es cada vez más criticado por el papel que puede desempeñar en la creación de "superbacterias" resistentes a los antibióticos, como el MRSA. El beta-1,3-glucano derivado de *Euglena* también se puede usar como ingrediente cosmético, apósito para heridas o incluso un ingrediente farmacológico inmunoestimulante o precursor de un fármaco que se utilizará para proporcionar una mejor defensa del sistema inmunitario innato. Un sistema inmunitario activado requiere un gasto calórico adicional, y el beta-1,3-glucano, por lo tanto, incluso se puede usar para reforzar simultáneamente la actividad del sistema inmunitario innato y al mismo tiempo aumentar el metabolismo general en las aplicaciones para perder peso. Hay muchas aplicaciones y personas que pueden beneficiarse del acceso a una forma más asequible de beta glucano que la que está disponible comercialmente.

Los esfuerzos para cultivar *Euglena* han dado como resultado densidades celulares que varían de aproximadamente 0,5 a 50 gramos por litro. Por ejemplo, el método de crecimiento de *Euglena* descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.084.386 reivindica una fuente de carbono especificada de 4 g/L a 16 g/L de carbono. La concentración total de todos los componentes disueltos mencionados en las especificaciones fue inferior a 45 g/L. Por lo tanto, hubiera sido muy improbable que esta técnica de crecimiento produjera una concentración de *Euglena* superior a 45 g/L. En realidad, la concentración de biomasa de *Euglena* que se cultivó probablemente fue mucho menor dada la eficiencia de conversión de la fuente de carbono (glucosa) a biomasa de *Euglena*, que generalmente es de aproximadamente 0,5 a 0,9 gramos de biomasa por gramo de glucosa consumida.

Otros esfuerzos para cultivar *Euglena gracilis* han dado como resultado concentraciones de beta-1,3-glucano de hasta el 70%, medido por la proporción en peso seco de beta-1,3-glucano en relación con el peso seco de la biomasa total, a mayores densidades y tiempos de duplicación celular que los descritos anteriormente. Este es un desarrollo importante para aplicaciones industriales. Por ejemplo, Santek et al., produjeron *Euglena* a densidades de 13-14 g/L con fracciones de masa de paramilón de 50-60% g/L en un solo lote utilizando un medio sintético que contenía 15 g/L de glucosa como fuente principal de carbono (Engineering Life Sci. 2009, 9, N° 1, 23-28). Santek et al., también lograron una densidad de biomasa de aproximadamente 20 g/L utilizando un método de cultivo por lotes repetido con aguas residuales de procesamiento de patata como ingrediente principal del medio; se obtuvo una fracción de masa de paramilón de aproximadamente el 75% (Engineering Life Sci. 2012, 12). Rodríguez-Zavala et al., produjeron *Euglena* en un solo lote a densidades de 10,8 g/L después de experimentar con varias fuentes de carbono (Journal of Applied Microbiology 109, 2160-2172). Ogonna logró 39,5 g/L de *Euglena* mediante el uso de un aparato de fermentación de jarra de una sola etapa, aunque esto no se realizó a escala comercial o con un sistema de biorreactor de etapas múltiples (Journal of Applied Phycology 10: 67-74, 1998). Ogonna estaba más interesado en la producción de α -tocoferol por *Euglena* y no midió la fracción de masa de beta glucano en la biomasa. Sin embargo, ninguno de estos esfuerzos empleó un proceso de biorreactor de etapas múltiples o continuo para cultivar *Euglena* a escalas comerciales, y ninguno ha alcanzado una densidad de producción económica superior a 50 gramos por litro. Finalmente, ninguno ha usado una formulación de medios simple y de bajo coste que pueda prepararse de manera reproducible y consistente (a diferencia del agua residual de patata utilizada por Santek et al.).

Los esfuerzos adicionales no lograron cultivar *Euglena gracilis* a densidades más altas porque utilizaron procesos de un solo lote donde todos los nutrientes y fuentes de carbono se agregaron durante el comienzo de la etapa de crecimiento, antes o inmediatamente después de la inoculación (por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.084.386). Estos esfuerzos también utilizaron un biorreactor de una etapa. Además, estos esfuerzos utilizaron pequeñas cámaras de reacción de menos de 100 litros de volumen que no eran capaces de producir volúmenes económicamente significativos de *Euglena* y que no enfrentaban muchos de los problemas más difíciles para escalamiento a un bioproceso industrial, como la optimización de la compensación entre la maximización de las tasas de transferencia de oxígeno y la minimización de los efectos nocivos del esfuerzo cortante que ocurren con la agitación mecánica de células grandes y sensibles como *Euglena*. Finalmente, se determinó que estos esfuerzos no agregaron suficientes fuentes de carbono o concentraciones de nutrientes para alcanzar densidades de *Euglena* superiores a 40 gramos por litro.

Euglena tiene un tiempo de división celular lento en relación con algunos otros microorganismos. Por ejemplo, el tiempo de generación de *Euglena* en condiciones óptimas puede ser de aproximadamente 12 horas. En contraste, el tiempo de generación de bacterias cultivadas en condiciones óptimas puede ser tan rápido como 20 minutos. Sin un

método de producción industrial que se pueda utilizar para gestionar la capacidad de los organismos contaminantes indeseables de crecimiento más rápido, *Euglena* no se ha cultivado en volúmenes lo suficientemente grandes y concentraciones lo suficientemente altas para ser económicamente viable.

5 Las algas en general se han cultivado en condiciones fototróficas y heterotróficas. Sin embargo, la gran mayoría de las algas cultivadas heterotróficamente han sido especies ricas en aceites, y las condiciones de crecimiento del proceso circundante se adaptaron para producir grandes cantidades de aceites, tales como aceites Omega 3 u otros aceites que se pueden quemar como biocombustibles líquidos. Algunas algas pueden producir aceite en cantidades superiores al 80%, medido por la proporción de aceite con respecto al peso seco de la biomasa de algas. *Euglena*, por el contrario, es una especie pobre en aceites, con generalmente menos del 15% de la biomasa total compuesta de aceites u otros lípidos.

10 Aunque otros han explorado la producción de *Euglena* a un nivel muy básico, esta producción ha sido a escala de laboratorio en recipientes de crecimiento de una sola etapa, generalmente en pequeños matraces o garrafones en un solo lote. Como resultado, *Euglena* no se ha producido en grandes cantidades que la hagan útil para aplicaciones comerciales. Además, gran parte de la investigación con respecto al cultivo de *Euglena* ha utilizado *Euglena* como fuente de alfa tocoferol. Las condiciones óptimas de crecimiento para la producción de estos compuestos no son necesariamente las mismas condiciones óptimas para la producción y la extracción potencial de beta glucano de *Euglena*,

15 La presente tecnología incluye métodos para cultivar *Euglena* (por ejemplo, *Euglena gracilis*) usando un proceso heterotrófico de etapas múltiples en biorreactores de más de 500 litros de volumen y con densidades mayores de 20-60 gramos por litro y hasta más de 200 gramos por litro. Al aplicar los procesos de extracción y llenado de múltiples etapas, alimentación por lotes y repetición descritos para el cultivo de *Euglena* a esta escala, se puede lograr una economía de producción para beta glucanos derivados de *Euglena* que es superior a la economía de producción para beta glucanos derivados de levadura purificados y extraídos de manera comparable.

20 La presente tecnología incluye métodos para cultivar células de *Euglena* en la oscuridad usando procesos heterotróficos que contienen una fuente de carbono suficiente para producir biomasa en concentraciones mayores de 20 a 60 g/L en peso seco. Esto se logra agregando la fuente de carbono a lo largo del tiempo, de modo que la concentración de la fuente de carbono disponible en los medios nunca exceda los 30 g/L. La fuente de carbono se puede agregar al menos tres veces por lote y se puede agregar de manera periódica o continua.

25 Otros métodos de crecimiento para *Euglena* no proporcionan un medio para prevenir la contaminación de *Euglena* a escala industrial. La contaminación por células extrañas no siempre es un problema crítico en períodos de crecimiento más cortos, como en un matraz o biorreactor escala de laboratorio. Los niveles bajos de pH descritos en otros métodos de crecimiento probablemente fueron suficientes para mantener a raya cierta contaminación. Sin embargo, la falta de protección adecuada contra la contaminación a escala industrial es un problema crítico que puede evitar producciones a escala económica y por lotes. Además, la levadura y otros organismos contaminantes pueden evolucionar y son capaces de superar a *Euglena*, incluso en condiciones de crecimiento de pH bajo, si no se toman precauciones adicionales. Para evitar la contaminación de la población de *Euglena* con organismos de crecimiento más rápido como la levadura o las bacterias, se puede emplear un filtro estéril para la adición de los medios o los medios se pueden esterilizar con vapor. Este medio puede prepararse en forma líquida y almacenarse en uno o más tanques. Los diferentes componentes de los medios también pueden almacenarse en diferentes tanques para evitar la contaminación por organismos externos. Los medios se pueden esterilizar con calor antes de filtrarlos y combinarlos, con cuidado de no sobrecalentar los medios que contienen azúcar para evitar la caramelización.

30 Aunque los aspectos de la presente tecnología se pueden realizar en un solo biorreactor que es al menos un tanque de 1000 L, el medio preferido es un proceso de múltiples etapas, donde se usan múltiples biorreactores en secuencia, y donde cada biorreactor tiene un mayor volumen que el biorreactor en la etapa anterior. Los diagramas de flujo de ciertos métodos para cultivar *Euglena* se muestran en las Figuras 1, 2, 3 y 4 y los esquemas de ciertos sistemas para cultivar *Euglena* se muestran en las Figuras 5, 6 y 7. Por ejemplo, una primera etapa del biorreactor puede consistir en un matraz de estilo Erlenmeyer u otro que se oxigene a través de la difusión superficial en una superficie agitadora giratoria o barra de agitación magnética. Este biorreactor puede calentarse como a través de una superficie calentada o en una atmósfera con ambiente controlado, generalmente dentro de un dispositivo de incubadora cubierto. Una superficie de agitación con calentamiento como la incubadora de mesa con calentamiento Innova 4000 de New Brunswick Scientific es un ejemplo de un dispositivo que combina el calentamiento y la capacidad de oxigenar el matraz al proporcionar suficiente movimiento para agitar la superficie del medio de crecimiento.

35 Una segunda etapa del biorreactor puede usar una cámara de biorreactor que es hasta 100 veces más grande que la primera, a la que se transfieren los contenidos de la primera etapa del biorreactor y posteriormente se diluyen de manera que la concentración inicial de *Euglena* esté en el intervalo de 0,1 a 10 gramos por litro. Los contenidos de la primera etapa del biorreactor pueden filtrarse o bien la *Euglena* puede concentrarse antes de transferirla a la segunda etapa, pero esto es opcional. Este biorreactor está cerrado a la atmósfera durante la operación con la excepción de desfogues controlados, una entrada para aireación u oxigenación y un tubo o tubería de entrada para bombear en los medios disueltos. Las entradas para bombear medios disueltos también pueden incluir un filtro estéril, típicamente con un tamaño de poro de menos de 0,2 micras, para evitar que entren en la cámara microorganismos no deseados

diferentes a *Euglena*. El tanque en la segunda etapa del biorreactor generalmente está hecho de metal o vidrio, y se limpia y desinfecta entre lotes utilizando vapor, calor o un desinfectante como etanol, lejía u otro químico. Esta etapa del biorreactor generalmente recibe oxígeno adicional desde el exterior del tanque, ya sea por aireación o al recibir líquido adicional por el cual el oxígeno presurizado se ha disuelto previamente en el líquido. El aire también puede enriquecerse con oxígeno antes de ser bombeado al tanque. Este biorreactor también puede tener un mecanismo para proporcionar agitación y/o mezcla de la biomasa de algas dentro del tanque.

Se puede recolectar *Euglena* de la segunda etapa del biorreactor. Sin embargo, el contenido de la segunda etapa del biorreactor también puede transferirse a una tercera etapa del biorreactor con un volumen que varía de 1 a 100 veces mayor que la segunda etapa del biorreactor. Esta tercera etapa del biorreactor se puede llevar a cabo en un tanque con un volumen que varía de 1.000 litros a 100.000 litros. Este biorreactor generalmente está cerrado a la atmósfera durante la operación, con la excepción de desfuegos controlados, una entrada para aireación u oxigenación y un tubo o tubería de entrada para bombear en los medios disueltos. Las entradas para bombear medios disueltos también pueden incluir un filtro estéril, típicamente con un tamaño de poro de menos de 0,2 micras, para evitar que entren en la cámara microorganismos no deseados diferentes a *Euglena*. El tanque en la tercera etapa del biorreactor generalmente está hecho de metal o vidrio, y se limpia y desinfecta entre lotes usando vapor, calor o un desinfectante como etanol, lejía u otro químico. Esta etapa del biorreactor generalmente recibe oxígeno adicional desde el exterior del tanque, ya sea por aireación o al recibir líquido adicional por el cual el oxígeno presurizado se ha disuelto previamente en el líquido. El aire también puede enriquecerse con oxígeno antes de ser bombeado al tanque. Este biorreactor también puede tener un mecanismo para proporcionar agitación y/o mezcla de la biomasa de algas dentro del tanque.

Se puede recolectar *Euglena* directamente de la tercera etapa del biorreactor. Sin embargo, el contenido de la tercera etapa del biorreactor también puede transferirse a una cuarta etapa del biorreactor con un volumen que varía de 5 veces a 100 veces mayor que la segunda etapa del biorreactor. Es probable que esta cuarta etapa del biorreactor se lleve a cabo en un tanque con un volumen que varía de 10.000 litros a 1.000.000 litros. Este biorreactor generalmente está cerrado a la atmósfera durante la operación, con la excepción de desfuegos controlados, una entrada para aireación u oxigenación y un tubo o tubería de entrada para bombear en los medios disueltos. Las entradas para bombear medios disueltos también pueden incluir un filtro estéril, típicamente con un tamaño de poro de menos de 0,2 micrones, para evitar la entrada de microorganismos no deseados diferentes a *Euglena* en la cámara. El tanque en la cuarta etapa del biorreactor generalmente está hecho de metal o vidrio, y se limpia y desinfecta entre lotes usando vapor, calor o un desinfectante tal como etanol, lejía u otro químico. Esta etapa del biorreactor generalmente recibe oxígeno adicional desde el exterior del tanque, ya sea por aireación o al recibir líquido adicional por el cual el oxígeno presurizado se ha disuelto previamente en el líquido. El aire también puede enriquecerse con oxígeno antes de ser bombeado al tanque. Este biorreactor también puede tener un mecanismo para proporcionar agitación y/o mezcla de la biomasa de algas dentro del tanque.

Después de la transferencia a la última etapa del biorreactor, se cultiva un lote de *Euglena* durante un período de tiempo que varía de 36 a 120 horas antes de que se coseche una porción importante de la biomasa. En una realización, todo el contenido del biorreactor se recolecta después de este período de tiempo. En esta realización, se recolecta un único lote de la última etapa del biorreactor para cada inoculante que recibe de la etapa del biorreactor anterior.

En cada una de las etapas del biorreactor hay un nivel de pH deseable que varía de 2 a 6, con el nivel más deseable que varía de 3 a 4. Este pH es favorable para *Euglena*, pero es más bajo que las condiciones óptimas de crecimiento para la mayoría de las bacterias. El nivel de pH deseable se puede lograr de varias maneras. Primero, el pH puede controlarse manualmente y el ácido o la base pueden agregarse periódicamente manualmente para alcanzar el pH deseado. En segundo lugar, el pH se puede medir en tiempo real con un sensor de pH que está en conexión fluida con un sistema de control automatizado, donde el sistema de control automatizado controla bombas, tolvas u otros dispositivos que pueden agregar automáticamente ácido o base para alcanzar el nivel deseado de pH programado en el sistema de control automatizado. Tercero, en algunos casos puede no ser necesario agregar ácido o base adicional durante el transcurso de la reacción. En este caso, los procesos metabólicos de *Euglena* pueden reducir suficientemente el pH al intervalo deseado. Cuarto, se puede usar un sistema regulador ácido-base conjugado para ayudar a mantener el pH en el intervalo objetivo. Aunque hay muchos sistemas reguladores ácido-base conjugados que pueden funcionar adecuadamente en el intervalo objetivo, un ejemplo de un sistema de regulador ácido que puede considerarse más favorable mantiene un intervalo de pH entre 2 y 5. Un ejemplo de dicho sistema regulador es el sistema regulador de citrato. El sistema regulador se puede agregar al comienzo de la reacción en cantidad suficiente para que los procesos metabólicos u otros productos químicos producidos en el transcurso del período de crecimiento biológico no alteren el pH fuera del intervalo del sistema regulador conjugado.

Una o más de las etapas del biorreactor también pueden incluir un sistema de columna de burbuja o neumático para mezclar biomasa y aireación. En la Figura 7 se muestran ejemplos de un sistema para cultivar *Euglena* con un sistema neumático y en los ejemplos de reactores neumáticos particulares se muestran en las Figuras 8 y 9. Se sabe que los reactores neumáticos proporcionan una adecuada mezcla y aireación con menos esfuerzo cortante en las células.

Sin embargo, muchos biorreactores a escala industrial utilizan un aparato de agitación mecánica para mezclar y airear el cultivo para proporcionar una mezcla radial y/o axial como se muestra en la Figura 10. Un aparato de mezcla mecánica es adecuado para mezclar bacterias o fermentaciones de levadura, incluidas bacterias cultivadas para

producir proteínas recombinantes. La fermentación de levaduras y bacterias constituye actualmente la gran mayoría de las fermentaciones a escala industrial. Sin embargo, las bacterias y la levaduras son más pequeñas que las células de *Euglena* y son más tolerantes al corte. Ciertos tipos de diseños de agitación mecánica pueden ser perjudiciales para el crecimiento de las células de *Euglena* e incluso pueden lisar las células cuando se usan a altas velocidades. Además, las células de *Euglena* que crecen usando los métodos actuales se hinchan, en parte debido a la cantidad de paramilón que se almacena dentro de cada célula. Un aparato de agitación mecánica puede destruir una gran cantidad de estas células y puede no ser preferible. En los reactores donde está presente un agitador mecánico, es preferible una cuchilla de bajo corte, como una cuchilla marina o una cuchilla de ángulo fijo. En la Figura 11 se muestran ejemplos de tales cuchillas de bajo corte.

Otra versión del proceso de biorreactor de etapas múltiples es un método discontinuo repetido para recolectar y/o transferir la biomasa desde cualquier etapa del biorreactor. Esto también puede denominarse operación en un modo repetido de retirar y llenar. En la Figura 12 se muestra un ejemplo de una recolección repetida por lotes del crecimiento de *Euglena* en función del tiempo. Otro ejemplo de un método repetido por lotes se muestra en la Figura 22, donde se muestra beta glucano, densidad de biomasa de *Euglena*, tiempo de eliminación y reabastecimiento de medios de crecimiento, y glucosa residual en los medios de crecimiento. Se pueden recolectar y/o transferir uno o más lotes desde una etapa del biorreactor cada vez que se inocula en una etapa previa del biorreactor. Una porción de la biomasa también se puede recolectar y/o transferir de una etapa del biorreactor y otra parte se deja en la etapa del biorreactor. Después de esta recolección parcial y/o transferencia, se agregan medios de crecimiento frescos adicionales al tanque. El proceso puede continuar hasta que se alcance la cantidad deseada de producción de *Euglena* o hasta que un organismo contaminante finalmente comprenda una porción lo suficientemente significativa del biorreactor para justificar el vaciado del biorreactor y desinfectarlo.

Otra versión del método de crecimiento en el biorreactor de múltiples etapas que es preferible es un proceso continuo que puede mantener una cierta cantidad de *Euglena* después de un crecimiento inicial por lotes. La Figura 13 representa gráficamente una fase discontinua seguida de una fase continua donde el cultivo de *Euglena* se recolección continuamente y se reemplaza con medios de crecimiento frescos. Cuando se usa para producir *Euglena* con > 30% de beta-1,3-glucano, la utilización de un modo de crecimiento continuo para producir *Euglena*, especialmente en el biorreactor más grande en el tren de biorreactores, puede dar como resultado un nivel de producción altamente económico. El empleo de un proceso continuo requiere equilibrar la tasa de extracción con el aporte de nutrientes cruciales, así como un monitoreo rápido de los niveles de energía disponibles, tal como con un HPLC o con otras medidas espectrofotométricas de monitoreo de carbohidratos. Se prefiere incorporar un sistema de controles con retroalimentación de información suministrada por pH, oxígeno disuelto y otros sensores para ayudar a garantizar que el proceso continuo se mantenga equilibrado.

Un método repetido por lotes de acuerdo con la presente tecnología puede incluir los siguientes aspectos. *Euglena* se cultiva en un biorreactor de 50.000 litros hasta que la concentración de *Euglena* alcance al menos 20-60 gramos por litro y el volumen del tanque que se está llenando alcance los 40.000 litros. Luego se recolectan 30.000 litros de los 40.000 litros. Luego, el tanque se rellena gradualmente con medios, que incluyen la fuente de carbono y los nutrientes necesarios, y se airea y mezcla hasta que el tanque se llena nuevamente hasta 40.000 litros con una concentración de *Euglena* de 20-60 gramos por litro.

Después de completar la etapa del biorreactor de etapas múltiples, la biomasa de *Euglena* se separa del componente líquido para alcanzar al menos 20% de sólidos mediante el uso de un dispositivo tal como una centrífuga, filtración de flujo tangencial, prensa de filtro, prensa de correa u otro dispositivo de separación de sólido-líquido.

Después de este primer proceso de deshidratación, se utiliza un proceso de secado adicional para alcanzar una concentración de sólidos de al menos el 85% mediante el uso de un proceso tal como un secador de correa, secador por atomización, secador de tambor, horno o esparciendo la biomasa sobre una gran área superficial y secado por evaporación. Se puede proporcionar calor adicional en esta etapa. El proceso de secado también puede llevarse a cabo utilizando un entorno de vacío o vacío parcial (menos de 1 atmósfera de presión) para reducir la cantidad de tiempo necesario para secar el producto de la biomasa.

Se puede incluir una etapa de proceso adicional para separar el beta-1,3-glucano de la biomasa restante. El paramilón (beta glucano derivado de *Euglena*) es una partícula de beta glucano insoluble en agua formada naturalmente por *Euglena* sp. como un compuesto de almacenamiento de energía. Los gránulos de paramilón suelen tener un tamaño de 0,5 a 2 micras y se encuentran dentro de las células de *Euglena*. Los gránulos de paramilón se pueden extraer de las células simplemente lisando las células y aislando los gránulos mediante filtración o separación por gravedad (por ejemplo, sedimentación por gravedad, centrifugación). La lisis de las células se puede lograr de varias maneras, que incluyen sonicación, homogeneización a alta presión (por ejemplo, prensa francesa), con o sin la ayuda de productos químicos y/o calentamiento. La lisis se puede ayudar mediante la adición de ciertos productos químicos como detergentes (por ejemplo, dodecil sulfato de sodio), enzimas o bases (por ejemplo, hidróxido de sodio) y ácidos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido acético). Los gránulos de paramilón aislados pueden purificarse y lavarse adicionalmente de restos celulares y productos químicos de lisis mediante lavados con agua y/o alcoholes. En una realización, el proceso de lisis ocurre en un tanque separado después de que la biomasa ha sido deshidratada. En otra realización, el proceso de lisis puede ocurrir directamente dentro del biorreactor. Además de los métodos descritos para la lisis celular, las células de *Euglena* pueden ser inducidas a autólisis dadas ciertas condiciones ambientales.

Un método preferido para la extracción es calentar las células de *Euglena* en una solución de dodecil sulfato de sodio al 1%, centrifugar la solución y lavar el sedimento con agua y etanol. A escala de laboratorio, el proceso de extracción de paramilón se puede lograr de la siguiente manera. Aproximadamente una parte de la biomasa de *Euglena* (en peso seco) se suspende en 5 partes de solución de dodecil sulfato de sodio al 1% (p/v). Esta solución se mezcló vigorosamente y luego se calentó a 100 °C durante 30 minutos. La solución se enfrió y se centrifuga a > 500 RCF durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó por resuspensión en 10 partes de agua, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a > 500 RCF durante 5 minutos. El proceso de lavado se puede repetir dos veces más con 10 partes de etanol al 95%, para obtener un sedimento de beta glucano del 95% de pureza. El sedimento se puede secar más hasta un polvo blanco/marrón.

Estos métodos pueden dar como resultado niveles de pureza de beta glucano superiores al 99% cuando se combinan con *Euglena* altamente rica en beta glucano cultivada usando un proceso de crecimiento de *Euglena* de acuerdo con la presente tecnología. Los métodos descritos en el presente documento también son menos tóxicos que algunos de los métodos anteriores descritos para extraer paramilón, lo que puede haber añadido el beneficio de recibir certificaciones de seguridad y productos totalmente naturales necesarios para producir un producto de grado alimenticio o nutracéutico. Los productos a base de levadura comúnmente extraídos generalmente tienen niveles de pureza de no más de 80% de beta glucano en peso seco en varios productos comerciales. Aunque se han descrito otras técnicas de crecimiento de etapas múltiples que pueden dar como resultado concentraciones de paramilón de 95% a 97% de pureza (por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.084.386), tales técnicas no son factibles a escala comercial e involucran solventes peligrosos (por ejemplo, metanol y cloroformo). Los niveles elevados de pureza de beta-1,3-glucano son valiosos en productos inmunoestimulantes que requieren niveles más altos de pureza, tales como aplicaciones para humanos y productos inyectables de beta glucano, tales como adyuvantes para vacunas. Los niveles de pureza más altos de beta-1,3-glucano también son útiles cuando el paramilón extraído se usa como un precursor o unidad de carbohidratos base para etapas de procesamiento adicionales que aumentan la afinidad de unión biológica, la solubilidad u otras propiedades biológicas deseadas del compuesto de beta glucano, tales como etapas adicionales de aminación o sulfatación que se describen adicionalmente en este documento.

El paramilón extraído de los procesos descritos en el presente documento puede someterse a etapas de proceso adicionales para aumentar la afinidad de unión a los receptores del sistema inmunitario, como la Dectina-1, una proteína que se ha identificado como un receptor de beta glucano. Por ejemplo, se ha demostrado que los polisacáridos sulfatados muestran actividad contra el VIH (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.861.383). También se puede demostrar que los derivados sulfatados de paramilón muestran actividad contra el VIH. Un método para preparar sulfato de paramilón sódico es disolver el paramilón en dimetil sulfóxido, agregar en él una mezcla de piridina seca y ácido clorosulfónico, calentar la mezcla de reacción y decantar el sobrenadante. Después de esto, se puede agregar agua destilada y metanol para precipitar el sulfato de paramilón piridinio, que luego se puede recolectar por filtración. Agregar solución de NaCl y elevar el pH a 9 puede precipitar el sulfato de paramilón sódico en una solución de acetona (Sakagami et al.; In vivo 3: 243-248 (1989)). Esta etapa del proceso puede ocurrir en la misma instalación o en comunicación fluida con el proceso de etapas múltiples descrito anteriormente, aunque también puede ocurrir en una instalación diferente después de que se envíe la *Euglena* seca. Este proceso también se puede llevar a cabo sin pasar por las etapas de proceso de separación o secado de líquidos-sólidos descritas anteriormente, aunque estas etapas se pueden implementar. En algunos casos, esta etapa también puede llevarse a cabo en el último recipiente del biorreactor.

El paramilón producido en el proceso de etapas múltiples descrito anteriormente puede ser más activo biológicamente como inmunomodulador cuando recibe un procesamiento adicional para que tenga carga positiva (Sakagami et al.; Antiviral Research, 21: 1-14 (1993)). El DMAE-paramilón puede ser más efectivo ya que puede causar una mayor afinidad de unión con los receptores beta-1,3-glucano, tal como la Dectina-1 y el receptor del complemento 3. Sin embargo, se pueden usar varios procesos diferentes para cargar positivamente el paramilón producido en el proceso de etapas múltiples para la producción de paramilón de *Euglena* para ser utilizado en aplicaciones inmunomoduladoras. Sin embargo, un proceso para producir paramilón cargado positivamente puede ser hacer reaccionar el paramilón con N,N-dimetilaminoetilo (DMAE). En este proceso, el paramilón se puede disolver en una solución base, como una que se puede preparar mediante la adición de NaOH. La solución de clorhidrato de cloruro de DMAE se puede agregar en forma de solución como un polvo seco para que ocurra la reacción. Este proceso puede realizarse en la misma instalación o en una instalación separada. Además, se puede realizar en un producto de paramilón extraído producido usando los procesos del biorreactor de etapas múltiples descritos en el presente documento. Alternativamente, este proceso se puede realizar en una sola etapa para separar simultáneamente el paramilón de la biomasa de *Euglena* y hacerlo reaccionar con DMAE para que se cargue positivamente para una mayor actividad inmunoestimulante. Al realizar la extracción de paramilón a partir de la biomasa y la activación de DMAE en una sola etapa, el coste del paramilón activado por DMAE y el coste neto por dosis pueden reducirse a menudo por un factor.

El cultivo de *Euglena* de acuerdo con la presente tecnología puede incluir además los siguientes aspectos. Los medios de crecimiento para *Euglena* pueden incluir: fosfato de potasio de 0,25 a 5 g/L; sulfato de magnesio de 0,25 a 5 g/L; cloruro de calcio de 0,005 a 0,5 g/L; y una solución madre de trazas de metales que contiene varios micronutrientes (por ejemplo, Fe y Zn), cada uno a razón de 0,1 a 500 mg/L. Opcionalmente, se puede incluir un regulador en los medios para ayudar a reducir la necesidad de productos químicos de control de pH. La dextrosa se puede suministrar en los medios de crecimiento iniciales, así como de forma semicontinua o continua durante todo el cultivo, de modo

que su concentración esté entre 0,5 y 30 g/L.

Como fuente primaria de nitrógeno, se usa hidróxido de amonio, donde se puede proporcionar gas amoníaco en los medios acuosos para formar hidróxido de amonio. Esto contrasta con otros medios de crecimiento de *Euglena* que usan sales de amonio (por ejemplo, sulfato de amonio) y aminoácidos como el glutamato como fuente primaria de nitrógeno. Se pueden usar niveles bajos de sulfato de amonio (0,1-2 g/L) en los medios de crecimiento de *Euglena*, especialmente durante el cultivo a pequeña escala o en matraces, pero la mayoría del nitrógeno en la biomasa se deriva del hidróxido de amonio o gas de amoníaco a escala de producción. La temperatura de crecimiento puede ser de 30 grados C a 32 grados C. El pH de los medios de crecimiento puede ser de 3,0 a 3,5, los niveles de oxígeno pueden mantenerse de 0,5 mg/L a aproximadamente 4 mg/L, donde en una realización el oxígeno se mantiene a 2 mg/L (es decir, 15-30% de saturación). Los medios de crecimiento también pueden incluir uno o más agentes antiespumantes.

Los lotes de *Euglena* se pueden escalar de la siguiente manera. Se puede usar un cultivo de 50 mL de *Euglena* para inocular 1 litro de medio de crecimiento, donde el cultivo de 1 litro se puede usar para inocular 10 litros de medio de crecimiento, donde el cultivo de 10 litros se puede usar para inocular 400 litros de medio de crecimiento, donde el cultivo de 400 litros se puede usar para inocular 10.000 litros o 38.000 litros de medio de crecimiento. Opcionalmente, se puede usar una etapa de crecimiento intermedio entre las etapas de 400 litros y 10.000 litros, y opcionalmente se puede realizar una etapa de crecimiento más grande después de la etapa de 10.000 litros o 38.000 litros (por ejemplo, una etapa de 250.000 litros). Los cultivos de 50 mL y 1 litro se pueden incubar en un agitador, el cultivo de 10 litros se puede incubar en un biorreactor agitado y los cultivos de 400 litros, 10.000 litros y 38.000 litros se pueden incubar en un puente aéreo o en un reactor de columna de burbujas. Los cultivos de 400 litros, 10.000 litros y 38.000 litros se pueden mantener en forma continua o de lotes de repetición, donde una porción del cultivo se elimina y se reemplaza con medios de crecimiento frescos en un proceso continuo o en lotes, respectivamente. Esto también podría describirse como una operación repetida de retirar y llenar. Las recolecciones continuas o repetidas de los cultivos de *Euglena* se pueden continuar durante días o semanas, siempre que la cantidad de microorganismos contaminantes (por ejemplo, levadura, bacterias) se suprima lo suficiente. Los lotes de *Euglena* pueden usar cepa Z de *Euglena gracilis*.

La *Euglena* se puede cultivar hasta una densidad de al menos 20-60 g/L, en la que el cultivo se puede mantener en o cerca de esta densidad de forma continua o una porción recolectada y el cultivo residual se reabastece con medios frescos y vuelve a crecer a esta densidad en uno o más lotes repetidos. En ciertas realizaciones, el cultivo de *Euglena* se puede cultivar hasta una densidad de al menos 80-120 g/L. La tasa de división celular de *Euglena* usando la presente tecnología puede ser de aproximadamente 24 horas o más rápida. El cultivo de *Euglena* recolectado puede proporcionar una producción de al menos aproximadamente 20 g de biomasa de *Euglena* por litro de cultivo por día cuando se promedia en el transcurso de muchos procesos sucesivos.

La *Euglena* cultivada de acuerdo con los presentes métodos tiene típicamente más del 30% de beta glucano y típicamente menos del 70% de beta glucano (es decir, $30\% < \text{beta glucano} < 70\%$). En ciertas realizaciones, la *Euglena* tiene $35\% < \text{beta glucano} < 65\%$. En otras realizaciones, la *Euglena* tiene $40\% < \text{beta glucano} < 60\%$. El contenido de beta glucano de *Euglena* puede verse afectado por los medios de crecimiento, la temperatura de fermentación y el tiempo de crecimiento. Sin embargo, a diferencia de otros métodos utilizados para cultivar *Euglena*, la presente tecnología no está dirigida a maximizar el contenido de beta glucano de *Euglena*, donde otros métodos han cultivado *Euglena* a más del 70% de beta glucano, incluido el $70\% < \text{beta glucano} < 90\%$. Cuando el crecimiento de *Euglena* no se dirige deliberadamente a maximizar la producción de beta glucano, una mayor parte de la fuente de carbono en los medios se puede convertir en otros componentes de la biomasa de *Euglena*. Sin estar obligado por la teoría, se cree que otros componentes de la biomasa de *Euglena* pueden actuar solos, en forma concertada o de manera sinérgica con el beta glucano para proporcionar una función inmunomoduladora en animales, incluidos los humanos. Los datos de respaldo se presentan en el presente documento.

Los métodos, sistemas y composiciones de crecimiento utilizados en la presente tecnología pueden incluir ciertas variaciones y aspectos adicionales. En algunas realizaciones, se proporciona un método de etapas múltiples para el cultivo de *Euglena* que incluye el cultivo de *Euglena* en una primera etapa del biorreactor. La *Euglena* se cultiva en una segunda etapa del biorreactor que se inocula desde la primera etapa del biorreactor, en la que la segunda etapa del biorreactor tiene un volumen mayor que la primera etapa del biorreactor. La *Euglena* puede crecer más en una tercera etapa del biorreactor que se inocula desde la segunda etapa del biorreactor, en la que la tercera etapa del biorreactor tiene un volumen mayor que la segunda etapa del biorreactor. El líquido se puede separar de la *Euglena* después de la tercera etapa del biorreactor.

Como se describe, la cepa Z de *Euglena* puede ser *Euglena gracilis*. Sin embargo, la *Euglena* puede ser cualquier especie del género *Euglena*, incluidas las cepas de *Euglena* que demuestran una producción reducida de clorofila o carecen de cloroplastos como resultado de presiones selectivas naturales o mutación. Los aspectos de la presente tecnología incluyen el cultivo de *Euglena* de manera que evite cualquier crecimiento fototrófico; por ejemplo, todos los cultivos se pueden mantener en la oscuridad. Los métodos y sistemas se pueden configurar para que el crecimiento de *Euglena* se lleve a cabo en condiciones predominantemente oscuras, de modo que más del 95% de la energía proporcionada para el crecimiento de *Euglena* esté en forma de fuentes de carbono orgánico disueltas en lugar de luz. El tiempo de duplicación de las células de *Euglena* se puede mantener en un intervalo de una división que ocurre entre

6 horas y 24 horas. *Euglena* se puede cultivar de esta manera a densidades mayores de 20-60 gramos por litro.

Las variaciones de los medios de crecimiento incluyen lo siguiente. El pH de los medios de crecimiento en una o más de las diversas etapas del biorreactor se puede mantener en un intervalo entre 2 y 6 mediante el uso de un sistema regulador. Puede usarse cualquier regulador adecuado capaz de mantener el pH dentro del intervalo de 2 a 6. El pH en al menos uno de las etapas de crecimiento puede mantenerse utilizando un sistema de control automatizado en comunicación fluida con al menos una de las etapas del biorreactor que está configurado para agregar ácido, base o un regulador para alcanzar un pH objetivo. Los medios de crecimiento también pueden incluir una fuente compleja de vitaminas, proteínas y nutrientes concentrados tal como licor de maíz, extracto de levadura o peptona. Se pueden agregar uno o más elementos de nitrógeno, hierro, magnesio y fósforo a una etapa del biorreactor en forma de una sal o una solución de medio para proporcionar los niveles de concentración descritos en el presente documento. En cierto aspecto, se agregan menos de 2 g de una fuente de carbono orgánico por cada 1 g de biomasa que se recolecta de una etapa final de biorreactor.

Ciertos aspectos del cultivo de *Euglena* se pueden automatizar. Por ejemplo, al menos una de las etapas del biorreactor puede agregar medios de crecimiento utilizando un sistema de control programable y sensores en comunicación electrónica con un sistema de control programable configurado para agregar uno o más componentes de medios en respuesta a la detección de uno o más parámetros de proceso. Las variables detectadas por los sensores pueden incluir uno o más de oxígeno disuelto en los medios de crecimiento, pH, presión, concentración de glucosa, concentración de ácido orgánico, densidad o turbidez celular, fósforo, nitrógeno, dióxido de carbono disuelto, concentración de dióxido de carbono en el gas de escape o concentración de oxígeno en el gas de escape. Uno o más de los biorreactores pueden controlar automáticamente la temperatura para que se mantenga entre veinte y treinta y cinco grados centígrados. Del mismo modo, el nivel de oxígeno disuelto se puede mantener entre 5 y 90 por ciento de los niveles de saturación.

Se pueden emplear diversos biorreactores. Los biorreactores pueden estar hechos de vidrio, plástico o acero inoxidable. Cuando se usa vidrio o plástico, el biorreactor puede ser opaco para evitar el crecimiento fototrófico de *Euglena* y mantener las condiciones de crecimiento heterotrófico. Los diversos biorreactores pueden esterilizarse entre lotes usando vapor, etanol, presión, UV, un desinfectante o una combinación de estos. El biorreactor puede diseñarse para soportar una presión interna de al menos 15 PSI cuando se usa esterilización por vapor a presión. El tanque del biorreactor también se puede esterilizar usando una solución concentrada de etanol. En ciertos aspectos, al menos una porción de la solución de etanol puede dejarse en el biorreactor para ser utilizada como fuente de carbono por *Euglena*.

Al menos uno de los biorreactores usados en los métodos y sistemas descritos en el presente documento puede estar en comunicación fluida con uno o más tanques que contienen los medios de crecimiento o componentes de medios de crecimiento como se describe. La comunicación fluida entre los diversos biorreactores y los medios de crecimiento puede estar separada por uno o más filtros estériles (por ejemplo, tamaño de poro inferior a aproximadamente 0,2 micras) para evitar que microorganismos no deseados ingresen al tanque del biorreactor. El biorreactor puede incluir un mecanismo de agitación mecánica o el biorreactor puede incluir un aparato neumático para mezclar la *Euglena* y los medios de crecimiento dentro del biorreactor. El mecanismo de agitación mecánica se puede configurar para proporcionar un esfuerzo cortante que sea menor que el requerido para lisar las células de *Euglena*.

En el escalado de los cultivos de *Euglena* y/o el mantenimiento de cultivos de *Euglena*, se pueden usar los siguientes aspectos. Una concentración de *Euglena* en un biorreactor inmediatamente después de la inoculación puede ser inferior a 10 gramos por litro. Una concentración de recolección de *Euglena* puede ser mayor de 20-60 gramos por litro, y puede ser mayor de 80-120 gramos por litro en algunos casos. Un volumen de una etapa sucesiva del biorreactor puede ser entre aproximadamente 5 veces y aproximadamente 200 veces mayor que una etapa anterior del biorreactor. Una de las etapas de biorreactor puede tener entre 10 litros y 250 litros de volumen y puede emplear un reactor tal como un biorreactor BioFlo 3000 o 4500 de New Brunswick.

En cierto aspecto, los medios de crecimiento frescos se pueden agregar continuamente a un cultivo de *Euglena* mientras que una parte del cultivo de *Euglena* se recolecta continuamente. Los medios de crecimiento frescos pueden ser medios completos o pueden incluir componentes individuales, mezclas de componentes, soluciones concentradas madre de componentes, componentes sólidos, granulados o en polvo, agua, etc. Algunos métodos y sistemas solo pueden usar un reactor donde los medios de crecimiento frescos son añadido de forma continua. Por ejemplo, *Euglena* se puede cultivar por lotes en una primera etapa del biorreactor y/o una segunda etapa del biorreactor para inocular una etapa posterior del biorreactor, donde la etapa posterior del biorreactor incluye un mayor volumen de cultivo que se reabastece continuamente con medios de crecimiento frescos mientras se recolecta el cultivo de *Euglena* continuamente. Un ejemplo incluye cuando la concentración de *Euglena* en un biorreactor es mayor de 20 gramos por litro cuando se inicia una fase de recolección continua, y donde la concentración de *Euglena* se mantiene a más de 20 gramos por litro durante la fase de recolección continua.

Otros aspectos incluyen donde al menos una etapa del biorreactor se opera en modo discontinuo; es decir, en cualquier lugar desde una porción hasta sustancialmente todo el cultivo de *Euglena* se recolecta o se usa para inocular otro biorreactor. El modo por lotes puede repetirse para que el biorreactor funcione en un modo por lotes repetido; es decir, donde se recolecta una porción del cultivo de *Euglena* y se reemplaza con una porción de medio de crecimiento fresco

y se continúa el crecimiento. En ciertas realizaciones, el modo de lotes repetidos consiste en eliminar entre el 99,5% y el 10% del volumen de cultivo de *Euglena* dentro del biorreactor y rellenar el tanque con una cantidad similar de medio de crecimiento esterilizado. El modo de lotes repetidos se puede hacer muchas veces. La contaminación de microorganismos no deseados se puede controlar para determinar cuándo se debe finalizar el modo de lotes repetidos y descartar el lote contaminado.

La *Euglena* recolectada se puede separar de los medios de crecimiento usando cualquier cantidad de técnicas de separación sólido-líquido. Los ejemplos de técnicas de separación sólido-líquido incluyen centrifugación, filtración, uso de una prensa de correa, secador por atomización, secador de correa y similares. La *Euglena* separada se puede preparar como un polvo, granulado, prensada en gránulos o extrudida en varias formas. Estas diversas formas se pueden denominar genéricamente como harina de algas.

En algunos aspectos, se puede extraer paramilón (es decir, beta glucano) de la *Euglena*. Por ejemplo, *Euglena* recolectada continuamente o la suma de las recolecciones de lotes repetidos se pueden recolectar y extraer simultáneamente o las recolecciones de lotes repetidos se pueden extraer en lotes separados. La concentración de paramilón en la recolección puede representar más del 40% de la biomasa total recolectada, medida por el peso seco. El proceso de extracción de paramilón puede incluir una etapa de lisis celular seguido de una etapa donde el paramilón se solubiliza en una solución de extracción y otra etapa en la que el paramilón solubilizado se precipita fuera de la solución de extracción. Ciertas realizaciones lisan las células de *Euglena* usando dodecil sulfato de sodio u otro detergente. Otros métodos incluyen la lisis de las células de *Euglena* usando un proceso físico como agitación mecánica, homogeneización a alta presión, calor directo o microondas. En algunos casos, las células de *Euglena* se lisan usando presión celular interna o externa resultante de un gradiente osmótico entre el contenido interno de la célula y los medios circundantes. Luego, el paramilón se puede separar de los desechos de las células de *Euglena* mediante un proceso que utiliza la mayor densidad de la molécula de paramilón, para permitir que el paramilón se sedimente en el fondo de un tanque en forma de cono o mediante el uso de una etapa de centrifugación. La etapa de lisis se puede acoplar con la separación sólido-líquido, tal como donde las células de *Euglena* se lisan en el tanque de biorreactor final antes de una etapa de deshidratación, como la centrifugación o el secado. El paramilón extraído puede tener una concentración de beta glucano superior al 90% en peso seco.

La harina de algas o el paramilón extraído producido usando los presentes métodos, sistema y composiciones demuestra propiedades sorprendentes y únicas con respecto a la modulación de la función inmune de un animal, incluido un humano. En particular, el beta glucano presente en *Euglena* proporciona un efecto sorprendente y único en la modulación de la función inmune de un animal, mientras que el resto de la masa celular de *Euglena* en la harina de algas proporciona un efecto que actúa en forma concertada o sinérgicamente con el beta glucano. Estos efectos se pueden observar administrando la harina de algas a una dosis diaria de entre 0,0001% y 0,1% del peso total del animal. En ciertos aspectos, el beta glucano en la harina de algas puede modificarse para incluir un grupo funcional amina, un grupo fosfato y/o un grupo sulfato. En ciertos aspectos, se puede agregar beta glucano modificado a la harina de algas que contiene beta glucano no modificado.

Los análisis de ejemplo de harina de algas producida de acuerdo con la presente tecnología se proporcionan a continuación en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Análisis de la harina de algas

Ensayo	Límite de reporte	Unidades	Lote 1		Lote 2	
			Como se recibió	Peso seco	Como se recibió	Peso seco
Humedad	0,01	%	7,92		6,53	
Materia seca	0,01	%	92,08		93,47	
Beta-1,3-glucano	0,1	%	46,0	50,0	45,7	48,9
Proteína (cruda)	0,2	%	33,0	35,8	32,7	35,0
Grasa (cruda)	0,1	%	3,17	3,44	3,46	3,70
Azufre (total)	0,01	%	0,41	0,45	0,44	0,47
Fósforo (total)	0,01	%	1,27	1,38	1,18	1,26

ES 2 743 428 T3

Ensayo	Límite de reporte	Unidades	Lote 1		Lote 2	
			Como se recibió	Peso seco	Como se recibió	Peso seco
Potasio (total)	0,01	%	0,46	0,50	0,42	0,45
Magnesio (total)	0,01	%	0,14	0,15	0,11	0,12
Calcio (total)	0,01	%	0,02	0,02	0,02	0,02
Sodio (total)	0,01	%	0,08	0,09	0,08	0,09
Hierro (total)	5	ppm	227	247	213	228
Manganeso (total)	1	ppm	19,2	20,9	16,1	17,2
Cobre (total)	1	ppm	14,4	15,6	13,9	14,9
Zinc (total)	1	ppm	72,7	79,0	65,5	70,1
E. coli (genérico)	10	ufc/g	n.d.		n.d.	
Coliformes totales	10	ufc/g	n.d.		n.d.	
Staphylococcus aureus	10	ufc/g	n.d.		n.d.	
Salmonela	1	org/25g	negativo		negativo	
Arsénico (total)	10,00	ppm	n.d.		n.d.	
Plomo (total)	5,00	ppm	n.d.		n.d.	
Cadmio (total)	0,50	ppm	n.d.		n.d.	
Antimonio (total)	5,00	ppm	n.d.		n.d.	
Mercurio (total)	0,05	ppm	n.d.		n.d.	

Tabla 2. Análisis especializado de harina de algas en un solo lote

Ensayo	Valor
Vitamina C (mg/100 g)	10,2
Vitamina E (IU/kg) como alfa tocoferol	34
Omega 3s (% de peso seco)	0,78
Omega 6s (% de peso seco)	0,82
DHA docosahexaenoico, % de peso seco	0,22

ES 2 743 428 T3

Ensayo	Valor
EPA eicosapentaenoico, % de peso seco	0,33
Aflatoxinas totales (incluidas B1,B2,G1,G2) (ppb)	<1
DON (Vomitoxina) ppm	<0,1
Fumonisina total (incluida B1, B2, B3) ppm	<0,1
Ocratoxina (ppb)	<1
Toxina T-2 (ppm)	<0,1
Zearalenona (ppb)	<50
Recuento de moho (ufc/g)	<10
Levadura (ufc/g)	<10
Salmonela (org/25g)	negativo
E. coli (ufc/g)	<10
Recuento en placa de aerobios (ufc/g)	<10.000
Coliformes totales (ufc/g)	<20
Staphylococcus aureus (ufc/g)	<10
Otras toxinas específicas de algas:	
microcistina, euglenoficina, cilindroespermopsina, saxitoxina, brevetoxina, intoxicación diarreica por mariscos, y envenenamiento amnésico por mariscos	Negativo
Otros carotenoides específicos de algas:	
luteína (ng/g en peso seco)	145.707
zeaxantina (ng/g en peso seco)	2.895
astaxantina (ng/g en peso seco)	7.597
beta-caroteno (ng/g en peso seco)	59.353
Productos de descomposición relacionados con carotenoides (ng/g en peso seco)	205.444

5 La harina de algas recolectada y el paramilón extraído (es decir, beta glucano) preparados de acuerdo con la presente tecnología se investigaron para determinar sus capacidades para modular el sistema inmunitario de los animales.

Los objetivos principales de estos experimentos fueron:

- 1) Determinar si la harina de algas y el beta glucano extraídos de *Euglena* estimularon el sistema inmunitario de los ratones cuando se administraron por vía oral midiendo la producción de anticuerpos, la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) y la actividad de la fagocitosis.
- 5 2) Compare los efectos de la harina de algas y el beta glucano extraído de *Euglena* con los productos de beta glucano derivados de la levadura que se usan actualmente como suplementos alimenticios para animales.
- 3) Evaluar la efectividad de la harina de algas (que contiene aproximadamente 50% de beta glucano) para purificar beta glucano de algas (> 90% puro).

Métodos:

10 Se cultivaron células de algas en un fermentador estéril como se describe. Dos muestras de biomasa de harina de algas, marcadas como WBG50A y WBG50B, se utilizaron en un estudio con ratones. La muestra de biomasa WBG50A se produjo usando glucosa como fuente de carbono orgánico, mientras que la biomasa para la muestra WBG50B se produjo usando etanol. Una vez que se alcanzó la densidad objetivo de biomasa en el fermentador, las células se centrifugaron y la pasta resultante se almacenó congelada a -20 °C. Para producir la muestra de harina de algas, la
 15 pasta congelada se descongeló, se secó a 65 °C hasta que se formó una hojuela seca, y luego se molió a un tamaño de partícula de menos de 1.000 micras a menos de 500 micras. La pasta de harina de algas centrifugada podría secarse opcionalmente inmediatamente en lugar de congelarse para su almacenamiento. La muestra purificada de beta glucano se produjo fraccionando las células de algas y aislando el beta glucano para producir > 90% de beta glucano que tiene un tamaño de partícula de menos de 500 micras. Dos productos de beta glucano derivados de levadura (YDBG), denominados YDBG-1 e YDBG-2, se obtuvieron de un distribuidor comercial y se usaron sin modificaciones adicionales. Cada uno de los productos secos se mezcló con solución salina regulada con fosfato (PBS) y se diluyó a las concentraciones apropiadas antes de ser dosificado por sonda a ratones a los niveles de dosificación prescritos.

25 Se asignaron tres ratones BALB/c a cada tratamiento y se les administraron niveles variables de beta glucano en un porcentaje en peso de su dieta base total que varía de menos de 0,001% a 0,25% de la ración de dieta de ratón. Para mayor claridad, solo los datos de los niveles de dosificación de 0,0035% y 0,035% están representados en las Figuras 14-17.

30 Se tomó sangre de cada ratón para medir la actividad no específica del sistema inmunitario. Los siguientes parámetros se evaluaron 48 horas después de una sola alimentación de cada producto de beta glucano: actividad de fagocitosis (la capacidad de los macrófagos para ingerir partículas extrañas), actividad de células asesinas naturales (NK) (la capacidad de las células NK para destruir células extrañas o infectadas) y concentraciones de citoquinas (IL-2). Para medir la capacidad de la respuesta inmune específica, se midió la formación de anticuerpos en respuesta a la ovoalbúmina a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando un adyuvante de Freund como control positivo y PBS como control negativo. A los ratones se les inyectó ovoalbúmina los días 0 y 14 y se les
 35 suministró una dosis específica de cada producto de beta glucano una vez al día desde el día 0 hasta el día 14. Los títulos de anticuerpos se midieron el día 21.

40 Todo el trabajo con animales se realizó en el laboratorio del Dr. Vaclav Vetvicka en el Departamento de Patología de la Universidad de Louisville. El Dr. Vetvicka es conocido por su investigación sobre los efectos fisiológicos del beta glucano y su laboratorio ha llevado a cabo numerosas comparaciones de productos de beta glucano en el mercado para determinar su efectividad potencial.

45 Exposición a la bacteria *E. coli*: Diez ratones BALB/c se asignaron a cada grupo de tratamiento y recibieron una dosis letal nominal de *E. coli* (3×10^7) mediante inyección intramuscular en el día 0. Se dosificaron productos de beta glucano (0,01% de la ración de alimentación diaria en peso) en forma oral mediante sonda a los ratones diariamente comenzando dos días antes de la inyección de *E. coli* (día -2) hasta dos días después de la inyección (día +2). El grupo control recibió solo una sonda con PBS, mientras que un grupo tratado con antibióticos recibió dosis orales de ampicilina (13 mg/kg) en los días 0, 1, 2, 3 y 4. Los ratones fueron evaluados diariamente hasta el día 10.

50 Títulos de anticuerpos: Se asignaron tres ratones BALB/c a cada grupo de tratamiento y recibieron una dosis oral diaria de productos de beta glucano equivalentes a 0,002, 0,005, 0,010 y 0,020% de su ración de alimentación diaria en peso a partir del día 0. El antígeno (ovoalbúmina) se administró mediante inyección intraperitoneal los días 3 y 16 y los títulos de anticuerpos se midieron el día 23 usando un ensayo de ELISA con un control de PBS como control negativo.

55 Actividad de citotoxicidad y fagocitosis de células NK: se asignaron nueve ratones BALB/c a cada grupo de tratamiento y se alimentaron con productos de beta glucano de la misma manera que el experimento de título de anticuerpos explicado anteriormente para medir la citotoxicidad de células asesinas naturales (NK) (la capacidad de las células NK para destruir células extrañas o infectadas) y la actividad de fagocitosis (la capacidad de los macrófagos para ingerir partículas extrañas). En los días 1, 7 y 14, se sacrificaron tres ratones de cada grupo de tratamiento para recolectar material para análisis. La actividad de las células NK (medida como citotoxicidad) es un índice de la capacidad de las

células NK aisladas del bazo para matar células objetivo (por ejemplo, células YAC-1 de una línea celular de linfoma T) durante una incubación de 4 horas. El índice de fagocitosis se mide como el porcentaje de células de neutrófilos que capturan y engloban activamente las partículas marcadas en un tiempo asignado.

Resultados:

5 La fagocitosis es una respuesta del sistema inmunitario para capturar y destruir partículas u organismos potencialmente dañinos. El índice de fagocitosis se mide como el porcentaje de células de neutrófilos que capturaron y envolvieron activamente las partículas marcadas. Los ratones que recibieron solo el control de PBS tenían un índice de fagocitosis del 30% (Figura 14). El índice más alto registrado (45%) se observó para los ratones alimentados con la dosis de 0,035% de WBG50B, que es un aumento del 50% sobre el tratamiento de control. En general, el tratamiento con WBG50B tuvo el índice de fagocitosis más alto de todos los tratamientos en cada uno de los dos niveles de dosificación y fue especialmente efectivo en comparación con todos los tratamientos en el nivel de dosificación más bajo (0,0035% de la dieta).

15 La actividad de las células NK es un índice de la capacidad de las células asesinas naturales aisladas (NK) del bazo para matar las células objetivo (por ejemplo, células YAC-1 de una línea celular de linfoma T) durante una incubación de 4 horas. Los ratones que fueron alimentados con el control de PBS mostraron un índice de citotoxicidad del 12%, mientras que los ratones alimentados con la dosis de 0,035% de WBG50B tuvieron un índice de citotoxicidad tres veces mayor (38,5%) (Figura 15). Tanto el WBG50B como los tratamientos con extracto superaron sustancialmente los productos de beta glucano derivados de la levadura en ambos niveles de dosificación y, en algunos casos, el tratamiento con WBG50B mostró casi el doble de citotoxicidad de YDBG-2 en los niveles de dosificación de 0,035% y 0,005%.

20 La interleuquina 2 (IL-2) es una molécula importante de mensajería de citoquinas que ayuda a regular la respuesta inmune a la infección microbiana. La producción de IL-2 se mide como la cantidad de IL-2 producida por las células del bazo recolectadas durante un período de incubación. La respuesta de IL-2 es una respuesta inmune más generalizada que la actividad de las células NK, la fagocitosis y la formación de anticuerpos. Como tal, muchos tipos diferentes de compuestos extraños, no solo beta glucano, pueden provocar un aumento en la producción de IL-2. Los ratones que fueron alimentados con el control de PBS no observaron un aumento en la producción de IL-2, mientras que todos los tratamientos con beta glucano produjeron una respuesta muy fuerte de IL-2 que se incrementó notablemente a la tasa de dosificación más alta (Figura 16). El tratamiento con extracto de beta glucano de algas resultó en la mayor producción de IL-2, seguido de los productos de beta glucano derivados de levadura y luego los productos WBG50.

25 La formación de anticuerpos indica la posibilidad de que un beta glucano sirva como adyuvante (potenciador) de las vacunas. En este caso, a los ratones se les inyectó ovoalbúmina, luego se les suministró diariamente productos con beta glucano durante 14 días y luego se midieron los anticuerpos contra la ovoalbúmina en el suero. Se usó adyuvante de Freund (una emulsión de células bacterianas inactivadas) como control positivo, ya que se reconoce como un estándar de la industria para inducir la formación de anticuerpos. Sin embargo, el adyuvante de Freund no se usa en muchos animales, incluidos los humanos, debido a su fuerte efecto de toxicidad. Como se esperaba, el adyuvante de Freund produjo un nivel muy alto de anticuerpos (Figura 17). Los tratamientos con WBG50B y extracto de beta glucano de algas también demostraron una alta formación de anticuerpos, especialmente al nivel de dosificación más alto (0,035% de la dieta). Los productos de beta glucano derivados de la levadura indujeron aproximadamente la mitad de la respuesta de anticuerpos que los tratamientos con WBG50B y extracto de beta glucano de algas a una tasa de dosificación de 0,035%.

30 Exposición a la bacteria *E. coli* (Figura 18): Todos los ratones en el grupo de control, que recibieron solo PBS, murieron dentro de los siete días de la inyección de *E. coli*. Por el contrario, la mortalidad en el día 10 disminuyó en todos los grupos de tratamiento en al menos un 40%. En particular, el 70% de los ratones que recibieron el producto beta glucano de algas purificado sobrevivieron 10 días después de la inyección de *E. coli*. Este grupo de tratamiento y el que recibió ampicilina mostraron tasas de supervivencia muy similares a lo largo del tiempo, lo que sugiere que el tratamiento con beta glucano derivado de algas proporcionó una protección similar contra la infección bacteriana que el antibiótico común ampicilina. Los ratones que recibieron harina de algas, que contiene aproximadamente 50% de beta glucano, también mostraron una disminución significativa en la mortalidad en comparación con el grupo de control. En este grupo de tratamiento, el 50% de los ratones sobrevivieron 10 días después de la inyección de *E. coli* en comparación con el 40% que sobrevivió en el grupo alimentado con un extracto de beta glucano derivado de levadura.

35 Títulos de anticuerpos (Figura 19): Los aumentos significativos en los títulos de anticuerpos indican la posibilidad de que productos como el beta glucano sirvan como adyuvante (potenciador) de las vacunas. Todos los grupos de tratamiento con beta glucano produjeron un aumento en la producción de anticuerpos en relación con el control negativo y este efecto se mejoró a dosis más altas. El tratamiento con beta glucano de algas purificado produjo la mayor cantidad de anticuerpos en cada uno de los niveles de tratamiento, seguido de cerca por el grupo de tratamiento con harina de algas. Los ratones alimentados con el producto de beta glucano derivado de levadura demostraron títulos de anticuerpos sustancialmente más bajos (entre 15 y 50% más bajos) en comparación con aquellos alimentados con beta glucano de algas purificado y harina de algas a niveles de dosificación moderados (0,005 y

0,010%) pero tenían títulos similares a los ratones alimentados con el tratamiento de harina de algas a la tasa de dosificación más alta.

Citotoxicidad de células NK (Figura 20): la citotoxicidad de células NK es un índice de la respuesta inmune no específica de las células NK para matar organismos potencialmente patógenos. Los ratones alimentados con el control de PBS mostraron un índice de citotoxicidad del 12%, mientras que los ratones alimentados con dosis tan bajas como el 0,005% de harina de algas o beta glucano de algas purificado demostraron un índice de citotoxicidad tres veces mayor (36 a 50%). A dosis de 0,005% y superiores, tanto la harina de algas como los tratamientos de beta glucano de algas purificados produjeron una respuesta de citotoxicidad más fuerte que el producto de beta glucano derivado de levadura.

Actividad de fagocitosis (Figura 21): la fagocitosis es otra respuesta inmune no específica para engullir organismos potencialmente patógenos. Los ratones que recibieron solo el control de PBS tenían un índice de fagocitosis del 30%, mientras que los ratones alimentados con la dosis más alta de beta glucano de algas purificado demostraron casi el doble de la actividad de fagocitosis (59%). Como se observa con la citotoxicidad de las células NK y los títulos de anticuerpos, el grupo de tratamiento con beta glucano de algas purificado demostró el mejor rendimiento en cada nivel de dosificación. Los ratones alimentados con harina de algas y beta glucano derivado de levadura demostraron una actividad de fagocitosis similar en los dos niveles de dosis más bajos, pero los ratones alimentados con beta glucano derivado de levadura en los dos niveles de dosis más altos tuvieron una actividad de fagocitosis ligeramente más alta.

Conclusiones:

1) Cada uno de los productos de beta glucano de Algal Scientific (WBG50A, WBG50B, beta glucano de algas) indujo aumentos significativos en cada una de las respuestas inmunes medidas (fagocitosis, actividad de células NK, producción de IL-2, producción de anticuerpos) en comparación con los controles. En particular, WBG50B (biomasa cultivada en etanol como fuente de carbono), demostró los niveles más altos medidos para tres de los cuatro índices de inmunidad (fagocitosis, actividad de células NK y formación de anticuerpos).

2) Para cada medida de respuesta inmune, los productos de beta glucano de Algal Scientific funcionaron tan bien y en muchos casos mejor que los productos de beta glucano derivados de levadura en el mercado hoy en día. En particular, la respuesta inmune en la actividad de las células NK y la fagocitosis para la dosis más baja de WBG50B fue mayor que la respuesta a la dosis más alta de los productos de beta glucano derivados de levadura, lo que sugiere la posibilidad de reducir los requisitos de dosificación de los productos de Algal Scientific.

3) En la mayoría de los casos, la respuesta inmune a la harina de algas o la biomasa de células enteras (por ejemplo, WBG50B) fue tan alta, si no más, que el beta glucano extraído solo. Esto sugiere que otros componentes de las células de algas (por ejemplo, ácidos grasos omega-3, vitamina E, metales traza) pueden actuar de forma complementaria al beta glucano para inducir una respuesta inmune más fuerte. Además, sugiere que la célula es fácilmente digerible y que el beta glucano está biodisponible.

4) En todos los casos, la respuesta inmune a los dos niveles de dosificación (0,0035% y 0,035%) no fue lineal (es decir, 10 veces mayor) y difirió entre los productos, lo que sugiere que la tasa de dosificación óptima para los productos de beta glucano es probablemente mucho más baja que el nivel de dosificación más alto (0,035%). Además, las tasas de dosificación podrían optimizarse para la respuesta a la fagocitosis, que es la primera línea de defensa contra los patógenos.

5) Cada uno de los productos de beta glucano (harina de algas de Algal Scientific, beta glucano de algas purificado de Algal Scientific y beta glucano derivado de levadura) aumentó la supervivencia de los ratones expuestos a una dosis letal de *E. coli*. En particular, el tratamiento con harina de algas aumentó la supervivencia en el día 10 del 0% en el grupo control hasta el 50%. El tratamiento con beta glucano de algas purificado aumentó la supervivencia hasta un 70%, que fue la misma respuesta que el tratamiento con antibióticos (ampicilina). Estos datos sugieren que el beta glucano derivado de algas tiene una potente actividad antibacteriana y que el beta glucano dentro de la harina de algas, que no ha sido extraído y purificado, está fácilmente biodisponible.

6) Tanto las respuestas inmunes específicas (es decir, la producción de anticuerpos) como las respuestas inmunes no específicas (citotoxicidad de células NK y actividad de fagocitosis) aumentaron significativamente para los grupos de tratamiento alimentados con cualquiera de los productos de beta glucano. Para todas las mediciones de inmunidad, el grupo de tratamiento con beta glucano de algas purificado obtuvo la respuesta inmunitaria más fuerte en todos los niveles de tratamiento.

7) Tanto la harina de algas de Algal Scientific como los productos de beta glucano de algas purificado produjeron una respuesta de anticuerpos muy fuerte que fue varias veces mayor que los títulos encontrados en el control negativo. Estos datos indican el potencial de estos productos para servir como adyuvantes.

8) El producto de harina de algas de Algal Scientific funcionó tan bien, si no mejor, que el producto de beta glucano derivado de levadura en casi todos los niveles de tratamiento tanto en la producción de anticuerpos como en los ensayos de citotoxicidad de células NK. En la mayoría de los casos, el producto de harina de algas indujo casi la misma o mejor respuesta en comparación con el producto derivado de levadura a solo un cuarto o la mitad del nivel

de dosificación.

5 9) El producto de beta glucano derivado de levadura provocó una respuesta de fagocitosis más baja que el producto de beta glucano de algas purificado, pero funcionó tan bien o mejor que el producto de harina de algas en esta categoría. En general, el impacto general de todos los productos de beta glucano en la fagocitosis es más moderado que la citotoxicidad de las células NK y la producción de anticuerpos.

10 Se proporcionan realizaciones de ejemplo para que esta divulgación sea exhaustiva y transmita completamente el alcance a los expertos en la materia. Se exponen numerosos detalles específicos, tales como ejemplos de componentes, dispositivos y métodos específicos, para proporcionar una comprensión exhaustiva de las realizaciones de la presente divulgación. Será evidente para los expertos en la técnica que no es necesario emplear detalles específicos, que las realizaciones de ejemplo pueden realizarse de muchas formas diferentes, y que ninguna de ellas debe interpretarse como una limitación del alcance de la divulgación. En algunas realizaciones de ejemplo, los procesos bien conocidos, las estructuras de dispositivos bien conocidas y las tecnologías bien conocidas no se describen en detalle. Se pueden realizar cambios equivalentes, modificaciones y variaciones de algunas realizaciones, materiales, composiciones y métodos dentro del alcance de la presente tecnología, con resultados sustancialmente
15 similares.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar *Euglena* que comprende:
 - (a) cultivar *Euglena* heterotróficamente en un medio de crecimiento en un biorreactor para formar un cultivo, en el que la *Euglena* se cultiva a una concentración de al menos 50 gramos de peso seco por litro y la *Euglena* tiene más de 30% en peso de beta glucano y menos de 70% en peso de beta glucano;
 - (b) eliminar una porción del cultivo del biorreactor para formar una porción eliminada; y
 - (c) reabastecer el cultivo restante en el biorreactor con medios de crecimiento frescos para formar un cultivo reabastecido;

en el que la productividad de *Euglena* cultivada por las etapas (a), (b) y (c) es de al menos 20 gramos de peso seco por litro de cultivo mantenido en el biorreactor por día, y en el que se agrega una fuente de carbono a los medios de crecimiento en las etapas (a) y (c) de modo que la concentración nunca exceda los 30 gramos por litro.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además cultivar *Euglena* en el cultivo reabastecido de la etapa (c) a una concentración de al menos aproximadamente 20 gramos de peso seco por litro.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
 - (d) eliminar una porción del cultivo reabastecido del biorreactor para formar una porción reabastecida eliminada.
4. El método de la reivindicación 3, que comprende además al menos uno de:
 - (e) reabastecer el cultivo restante en el biorreactor con medios de crecimiento frescos, y
 - (f) combinar las porciones eliminadas de las etapas (b) y (d).
5. El método de la reivindicación 3, que comprende además uno de: separar las porciones eliminadas combinadas en una porción sólida que comprende la *Euglena* y una porción líquida, y secar la porción sólida para formar una biomasa de algas; y extraer las porciones combinadas eliminadas para aislar el paramilón de la *Euglena*.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende además repetir las etapas (a), (b) y (c) una pluralidad de veces durante un período de hasta 25 días.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el biorreactor comprende un volumen de al menos 100 litros.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (a) usa un agitador o un reactor neumático o de columna de burbujas.
9. El método de la reivindicación 1, en el que los medios de crecimiento en las etapas (a) y (c) comprende hidróxido de amonio como fuente primaria de nitrógeno o un regulador de citrato-ácido cítrico o etanol como fuente de carbono.
10. El método de la reivindicación 1, en el que la porción eliminada de la etapa (b) comprende menos de 2 gramos de una fuente de carbono por cada 1 gramo de *Euglena*.
11. El método de la reivindicación 1, que comprende además separar la porción eliminada de la etapa (b) en una porción sólida que comprende la *Euglena* y una porción líquida, secar la porción sólida para formar una biomasa de algas; reducir el tamaño de partícula de la biomasa de algas a una de: 1.000 micras o menos, o 500 micras o menos; y opcionalmente que comprende además extraer la porción eliminada de la etapa (b) para aislar paramilón de la *Euglena*.
12. El método de la reivindicación 1, en el que el volumen de medios de crecimiento frescos en la etapa (c) es igual al volumen de la porción eliminada en la etapa (b).
13. El método de la reivindicación 1, en el que la tasa de duplicación de *Euglena* en la etapa (a) está entre 10 y 30 horas.

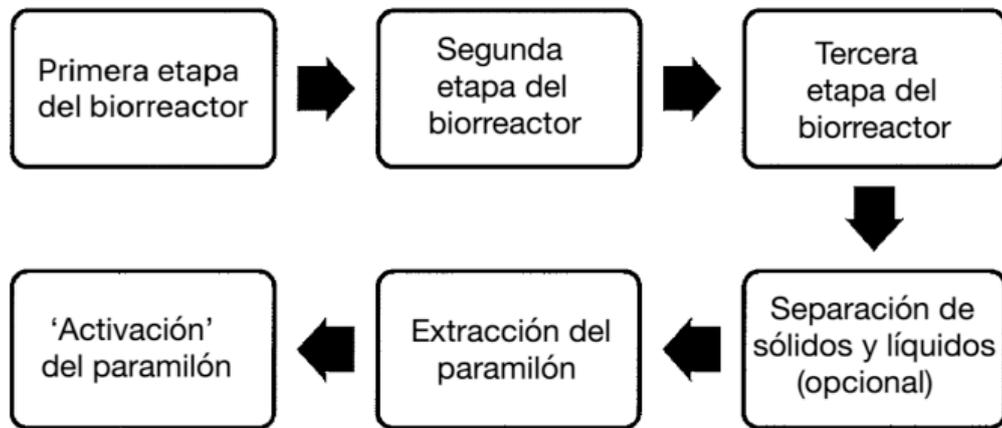


FIG. 1

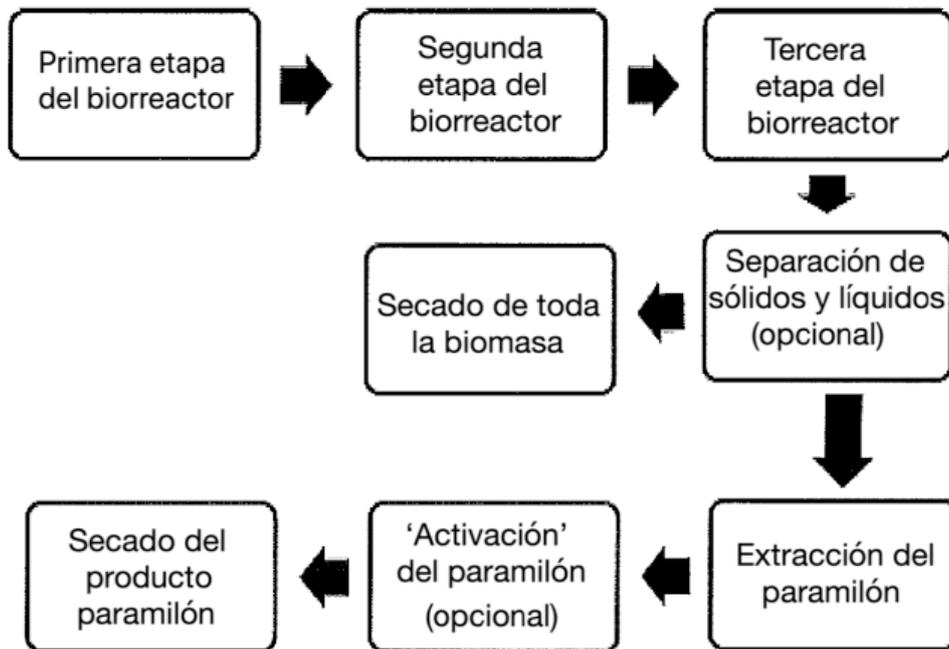


FIG. 2

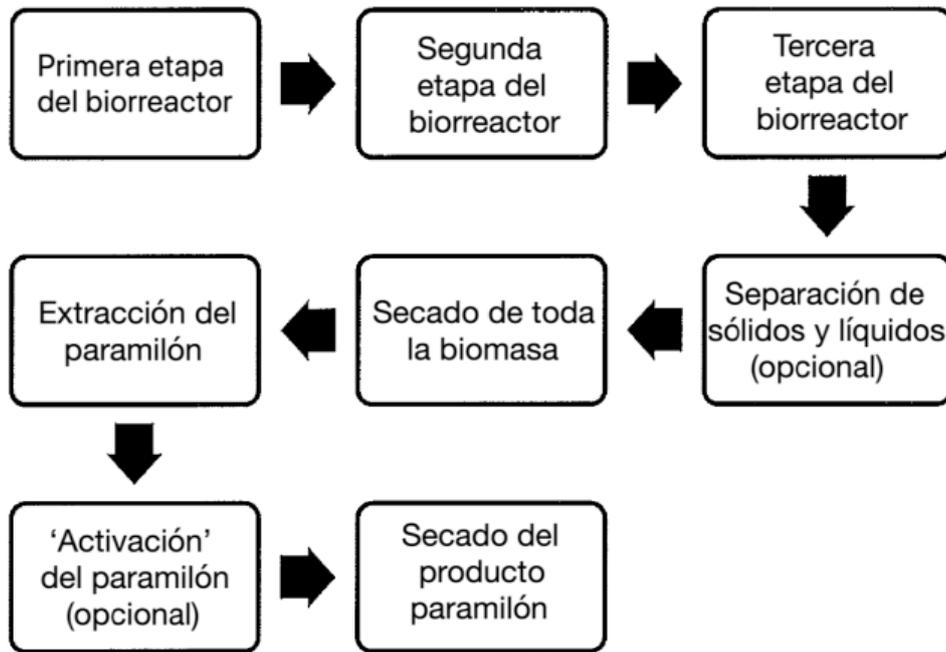


FIG. 3

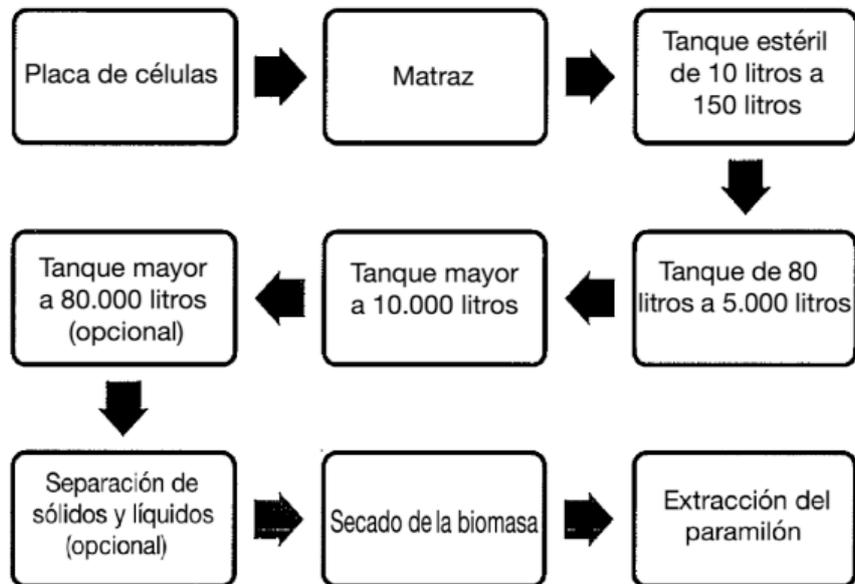


FIG. 4

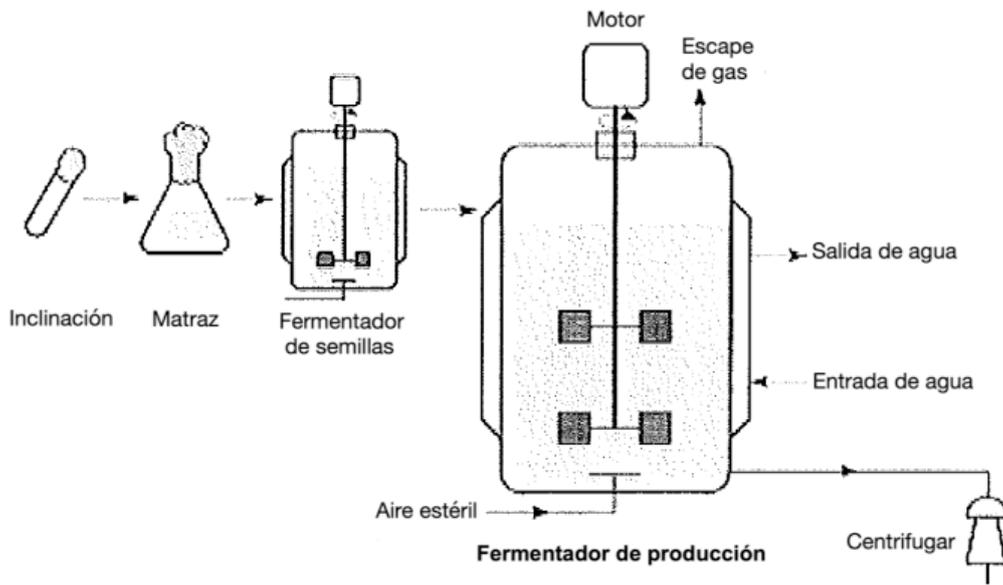


FIG. 5

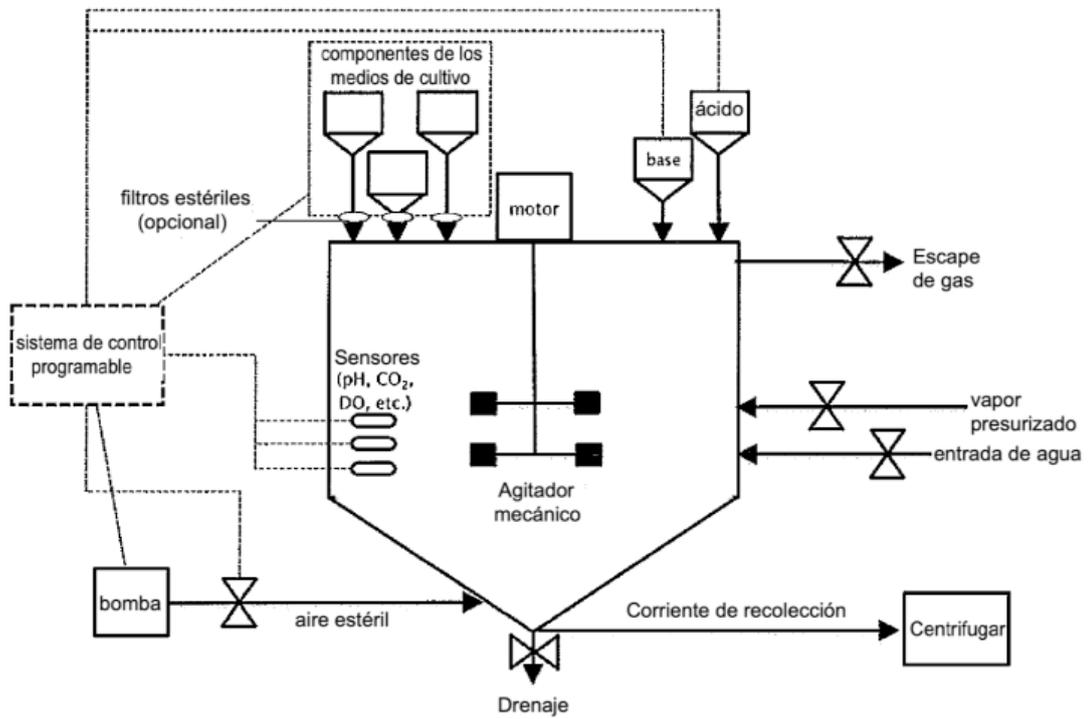


FIG. 6

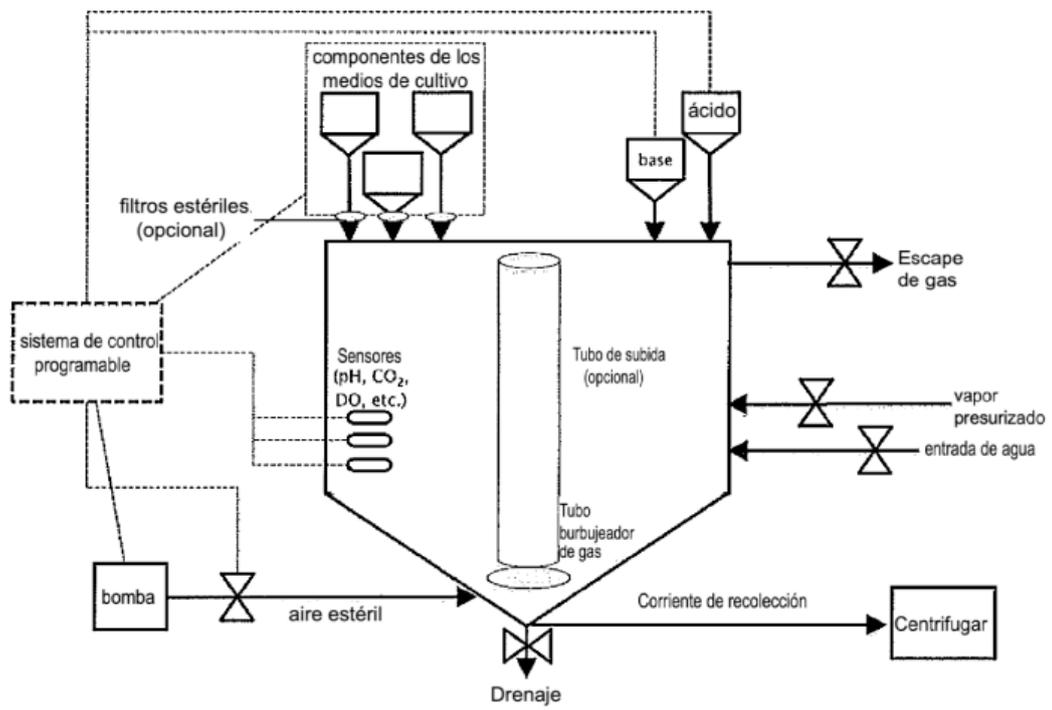


FIG. 7

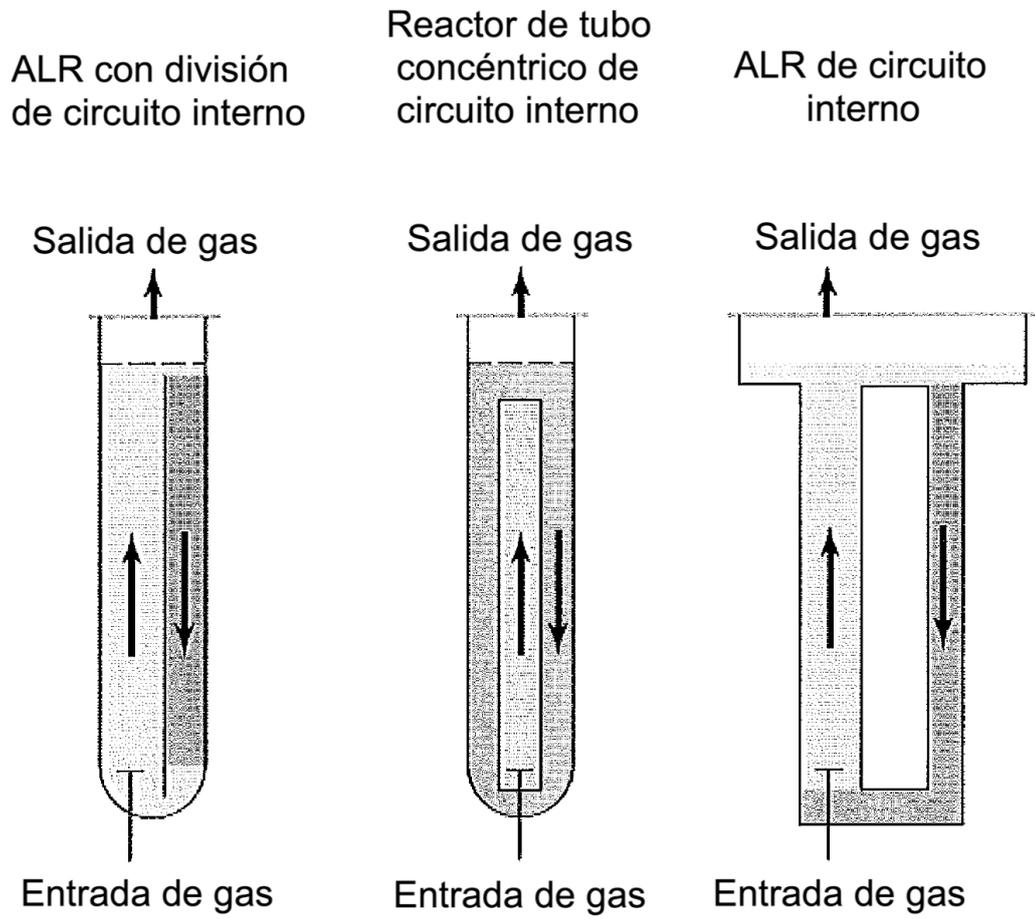
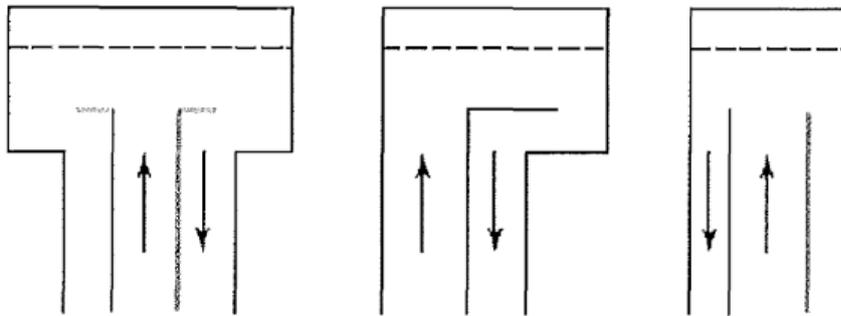
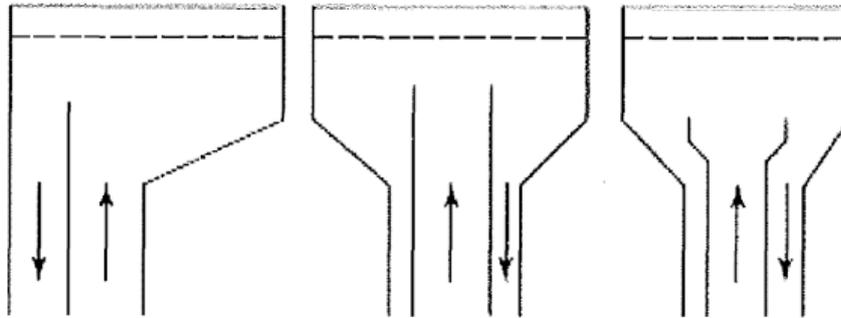


FIG. 8

Configuraciones del separador de gas de ALR de circuito interno



Configuraciones del separador de gas de ALR de circuito externo

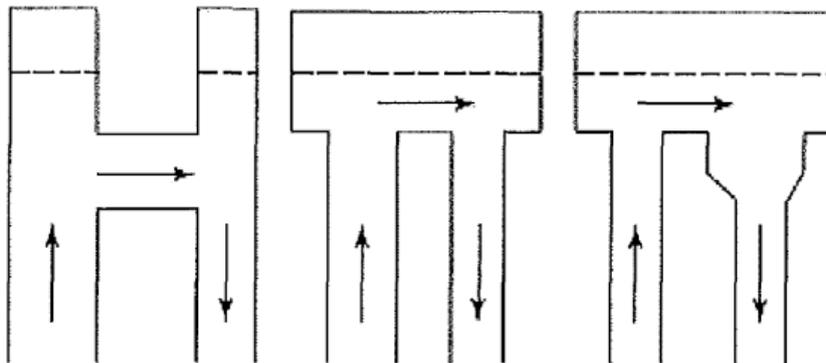


FIG. 9

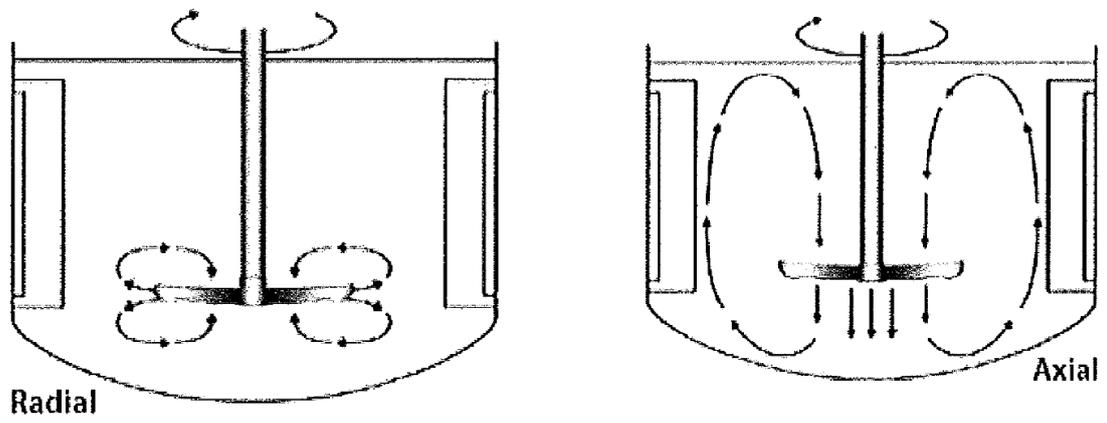


FIG. 10

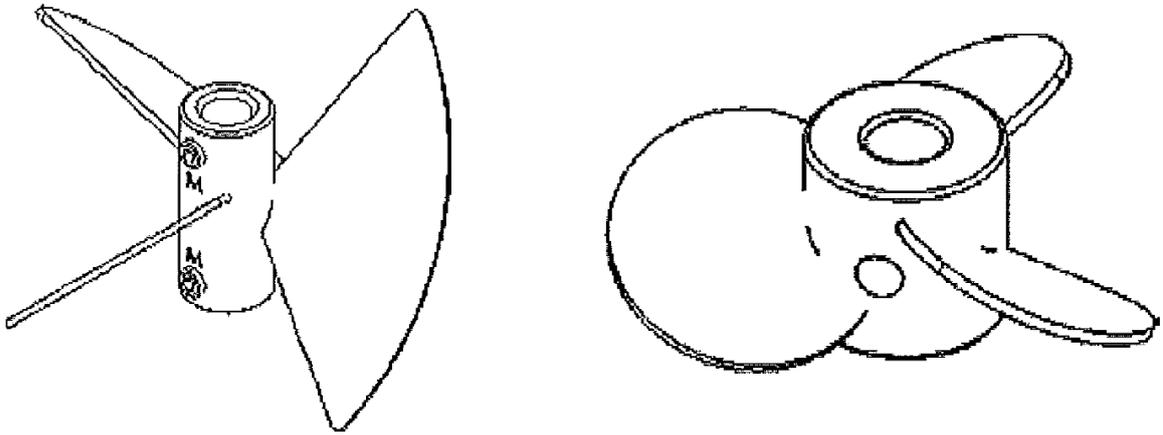


FIG. 11

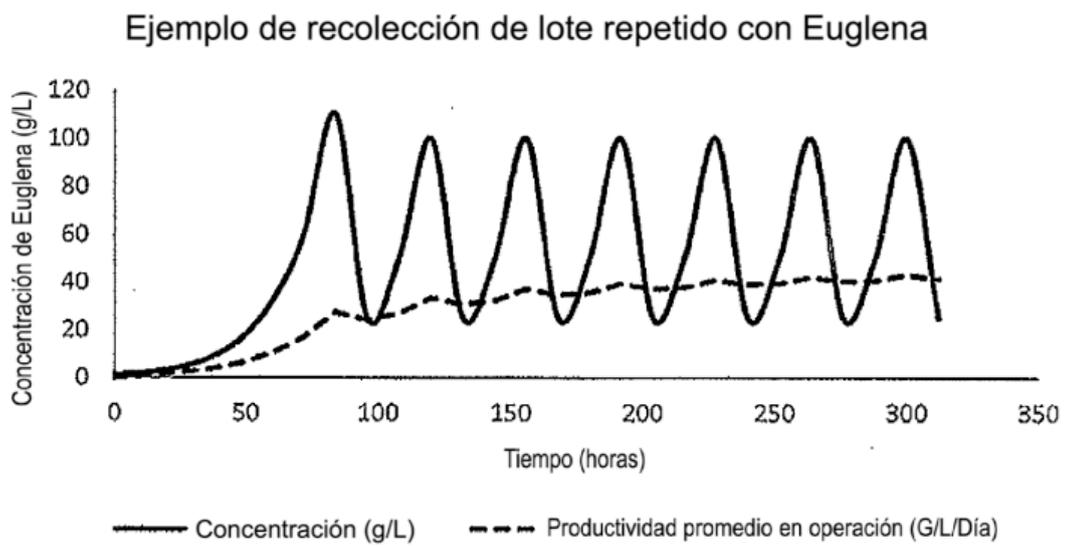


FIG. 12

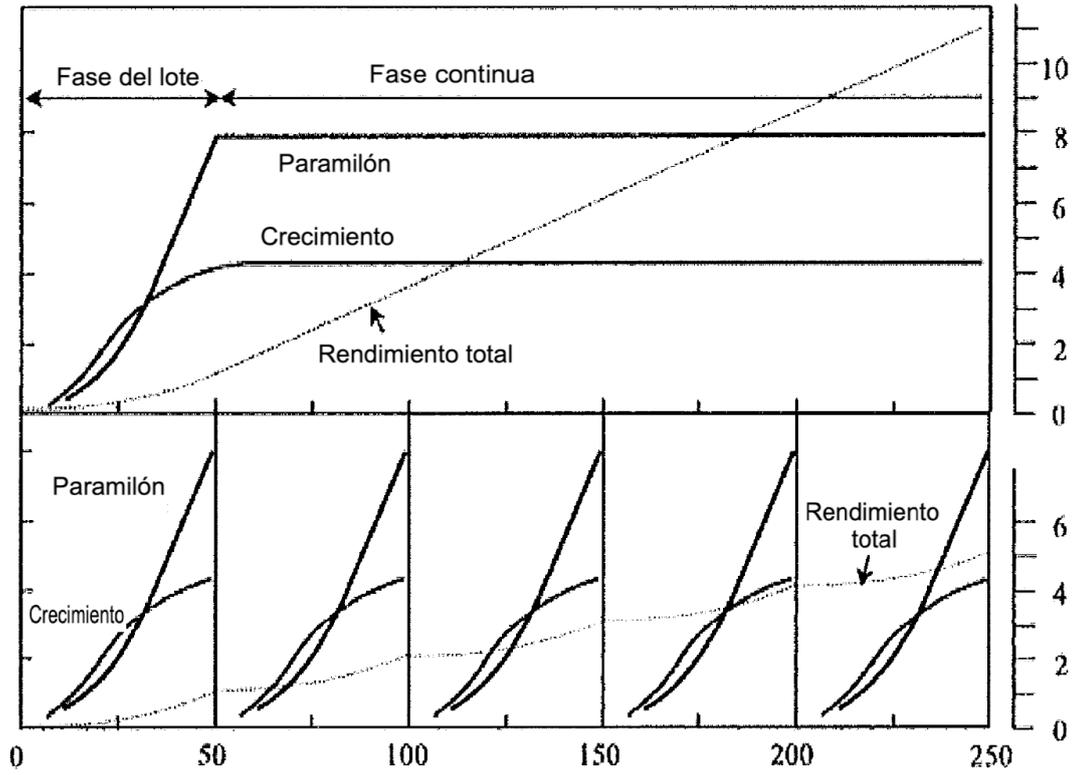


FIG. 13

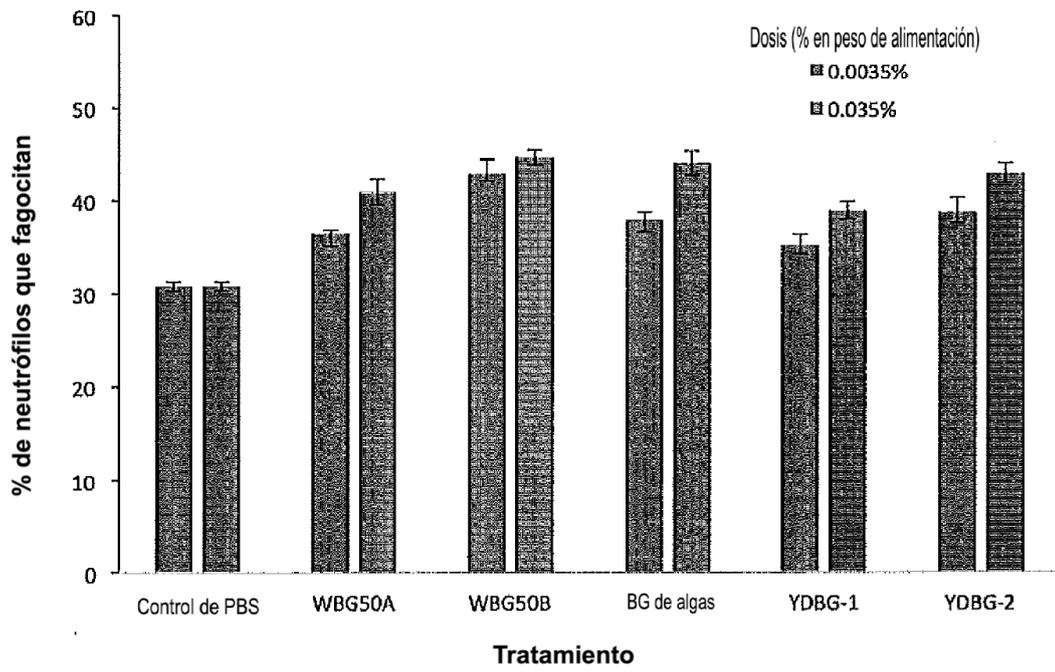


FIG. 14

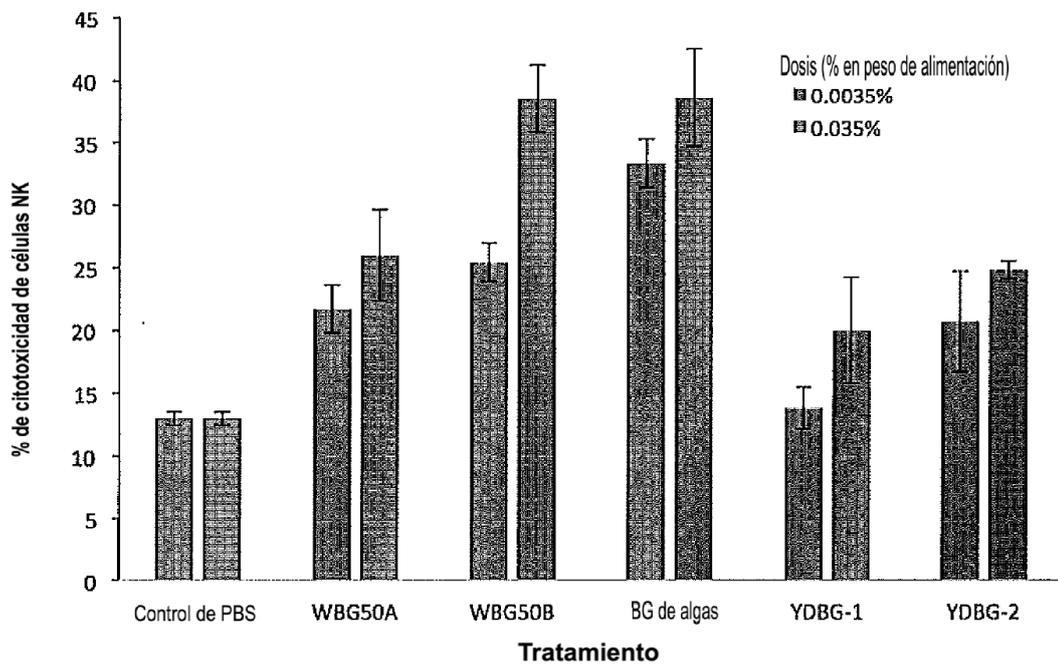


FIG. 15

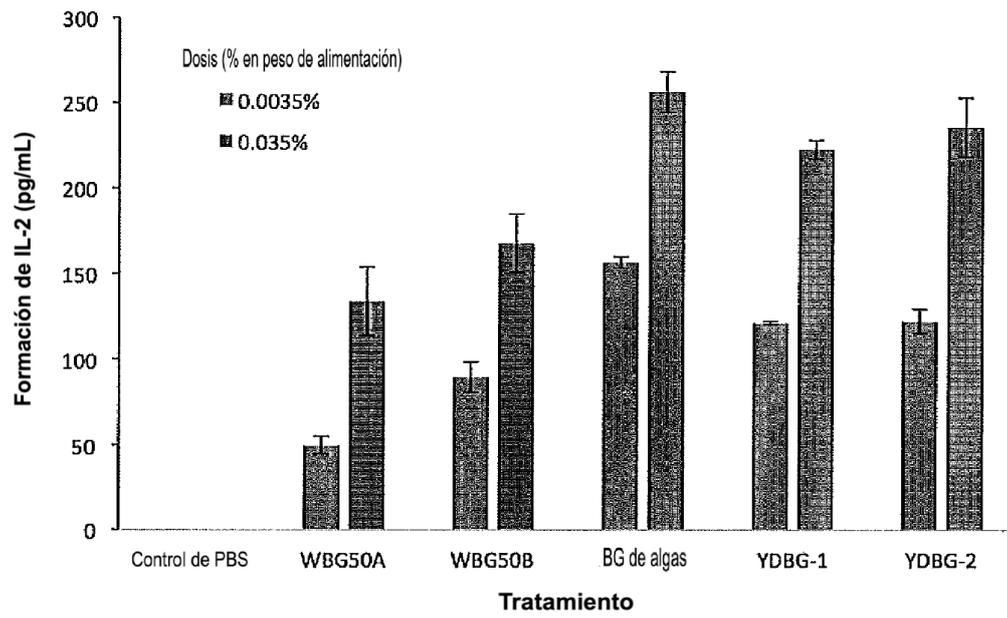


FIG. 16

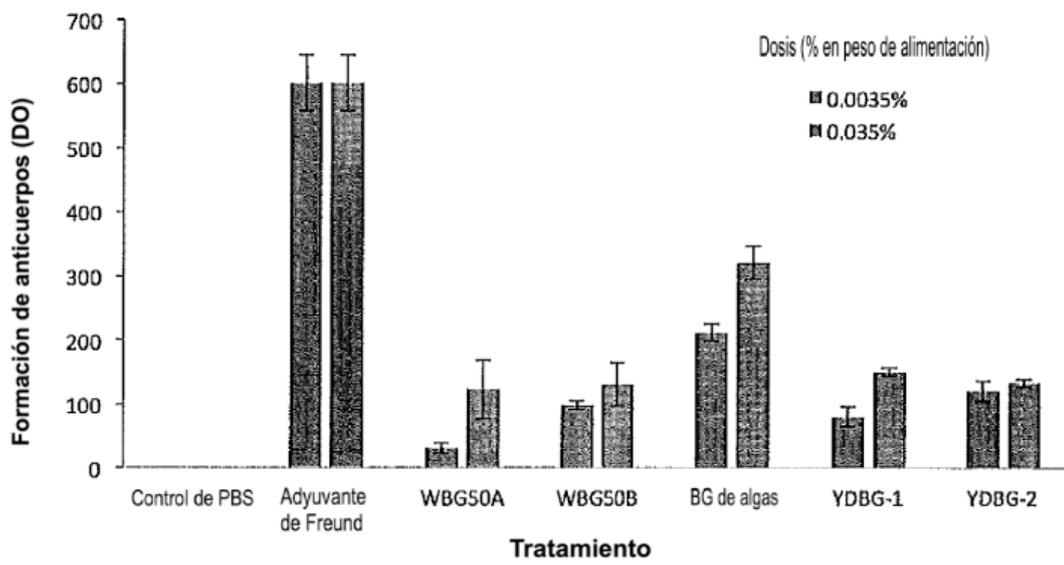


FIG. 17

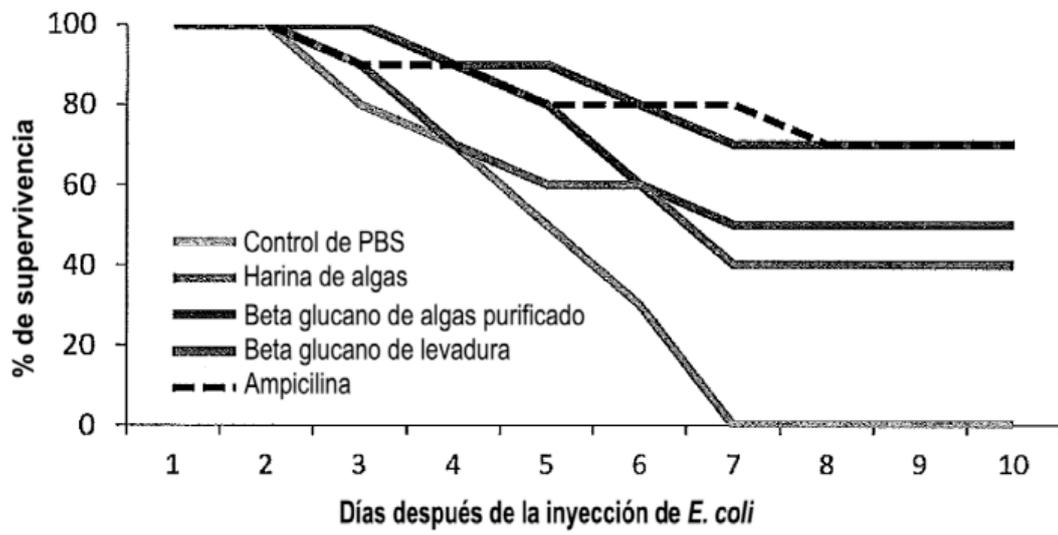


FIG. 18

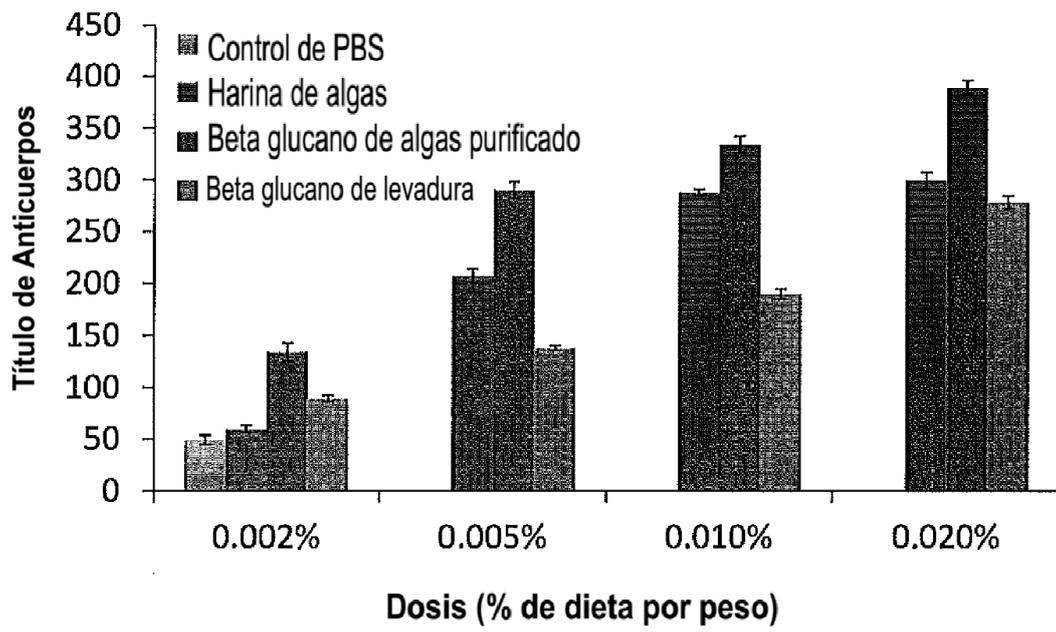


FIG. 19

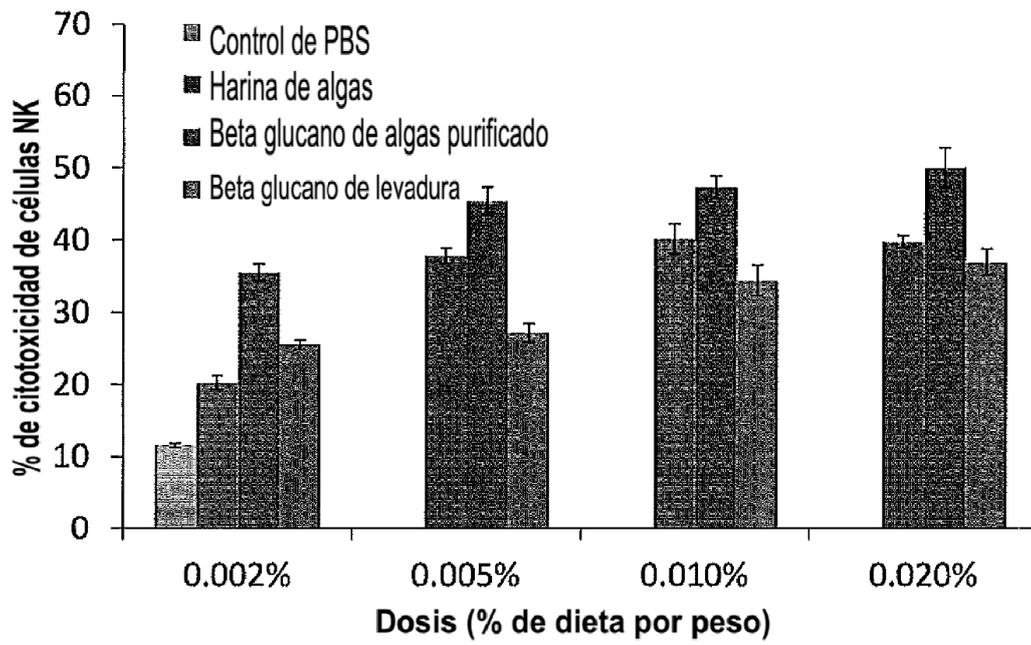


FIG. 20

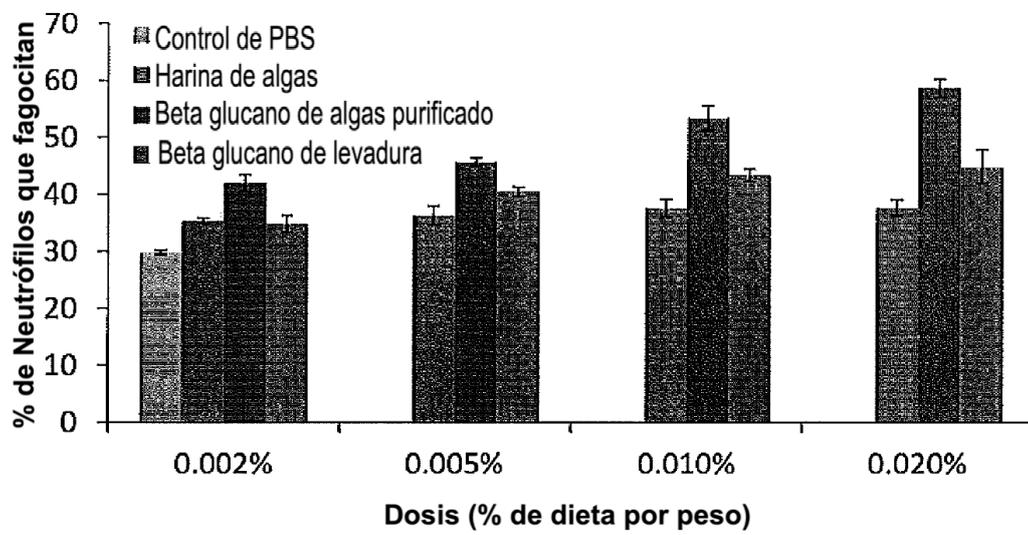


FIG. 21

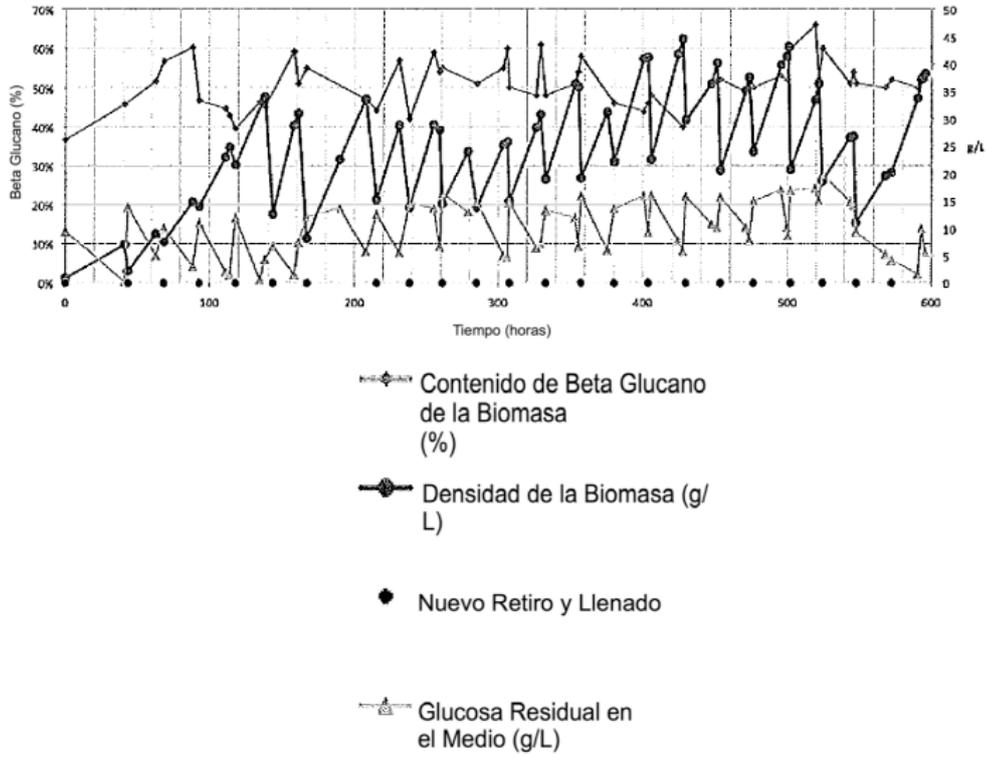


FIG. 22