

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 842 350**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/26 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014** **PCT/EP2014/054721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14146933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014** **E 14708915 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2020** **EP 2976418**

54 Título: **Un procedimiento para la producción de un producto (por ejemplo, polipéptido) en un proceso de fermentación de cultivo celular continuo**

30 Prioridad:

19.03.2013 EP 13160023

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2021

73 Titular/es:

CMC BIOLOGICS A/S (100.0%)
Vandtaarnsvej 83
2860 Søborg (Copenhagen), DK

72 Inventor/es:

LAUSTSEN, MADS

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 842 350 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

Un procedimiento para la producción de un producto (por ejemplo, polipéptido) en un proceso de fermentación de cultivo celular continuo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la productividad en un proceso de fermentación en quimiostato continuo.

Antecedentes de la invención

Tradicionalmente, las células bacterianas, de levadura y de mamífero se cultivan principalmente como cultivos en suspensión en biorreactores, que también se denominan fermentadores. En tales biorreactores, las condiciones ambientales pueden ser controladas con precisión manipulando el suministro de nutrientes a las células y la eliminación de materiales de desecho, y un medio de agitación puede mover el medio de cultivo en el interior del reactor proporcionando una distribución homogénea de las células.

El biorreactor puede ser operado como un sistema cerrado, como un sistema por lotes o alimentado por lotes, o como un sistema continuo, como un sistema de perfusión o un sistema de quimiostato. En una operación por lotes, el reactor funciona de manera discontinua. Al comienzo de un lote, el medio de cultivo usualmente contiene un medio con los nutrientes necesarios, por ejemplo, glucosa, vitaminas, aminoácidos y minerales. Durante la fermentación, estos se consumen de modo que el medio se priva cada vez más de nutrientes. Al mismo tiempo, aumenta la concentración de productos de desecho, lo que finalmente resulta en una prevención del crecimiento celular. La densidad de células viables alcanza un valor máximo y luego vuelve a disminuir. Por consiguiente, el cultivo normalmente se interrumpe cuando se alcanza la densidad celular máxima o se alcanza la viabilidad celular mínima. El contenido del reactor se transfiere a continuación para un procesamiento aguas abajo.

A este respecto, el denominado "proceso de alimentación por lotes (también denominado alimentado por lotes)" es un proceso en el que, durante el procedimiento de fermentación, se suministra (alimenta) medio de cultivo fresco al biorreactor para suministrar más nutrientes como aquellos que se consumen durante el proceso del biorreactor. Sin embargo, en la práctica, este proceso tiene limitaciones en cuanto al volumen que se puede agregar y no prevé la eliminación de productos de desecho que podrían dañar el crecimiento y la productividad celular. Por lo tanto, un proceso de alimentación por lotes no proporciona ninguna ventaja sustancial debido a un aumento de los materiales de desecho.

El biorreactor también puede ser operado como un sistema continuo, como en un sistema de perfusión o un sistema de quimiostato. En un sistema de perfusión, los desechos/impurezas en el medio se eliminan continuamente del cultivo y el medio desplazado se repone con medio fresco. La adición constante de medio fresco y la eliminación de productos de desecho proporciona a las células el entorno que necesitan para alcanzar concentraciones celulares elevadas y con ello una mayor productividad. Por lo tanto, es posible alcanzar un estado de equilibrio en el que se mantengan la concentración celular y la productividad. El producto puede recogerse continuamente sacando medio (con células y producto).

Un sistema de quimiostato es operado con una entrada continua de medio y una salida de células y productos que mantienen constante el volumen de cultivo. Una de las características más importantes de los sistemas de quimiostato es que los microorganismos se pueden cultivar en un estado estable fisiológico. En estado estable, el crecimiento se produce a un ritmo constante y todos los parámetros de cultivo permanecen constantes. Normalmente, en los sistemas de quimiostato, no existe un dispositivo de retención celular, de modo que la concentración de células en el biorreactor y la concentración de células en el sobrenadante recogido del biorreactor son sustancialmente idénticas. Típicamente, el medio de cultivo se alimenta al reactor a una velocidad constante y predeterminada, manteniendo una baja tasa de dilución del cultivo. Para evitar el lavado de las células, la tasa de dilución generalmente se elige para que sea menor que, ya veces igual, la tasa máxima de crecimiento específico de las células. Los fluidos de cultivo que contienen células, productos celulares, subproductos, productos de desecho, etc., se eliminan a través de una salida común a la misma velocidad, o sustancialmente a la misma velocidad. En comparación con el sistema de perfusión, el sistema de quimiostato típicamente da como resultado densidades celulares más bajas y una desventaja inherente de los sistemas de quimiostato es que la alimentación de los nutrientes no se puede controlar independientemente del producto y/o el flujo de recolección de células, lo que conduce a una baja productividad y altos costes de fabricación de los productos.

El documento de patente WO2011012725 describe una estrategia de cultivo celular continuo para la producción de polipéptidos o virus de interés en cultivos celulares de mamíferos en la que el sistema de cultivo celular comprende un dispositivo de retención celular que consiste en un microportador macroporoso de manera que el cultivo se pueda mantener durante un período de tiempo prolongado. Sin embargo, WO2011012725 no describe

un procedimiento para la producción de un producto en un proceso de fermentación en quimiostato, en el que el biorreactor comprende una salida que tiene un dispositivo de separación que permite eliminar las impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto, y el medio y otra salida independiente para eliminación de producto, células, productos celulares, subproductos, productos de desecho, etc.

El documento de patente EP2014760A1 divulga un procedimiento para la producción de un biopolímero en un proceso de fermentación de perfusión continua, en el que el biorreactor comprende una unidad de filtro de impurezas. Sin embargo, EP2014760A1 no divulga ni enseña un proceso de fermentación en quimiostato de alta densidad que proporcione una productividad incrementada por litro de medio gastado. El documento de patente WO2005/083052A1 está dirigido a un procedimiento y dispositivo para el cultivo continuo de organismos que puede ser operado ya sea como un quimiostato o un turbidostato, al tiempo que evita los peligros y dificultades asociados con la esterilización y el enjuague. Sin embargo, WO2005/083052A1 no enseña ni divulga un proceso de fermentación en quimiostato de alta densidad. Stark y Stockar (Stark, D y von Stockar, U.: "In Situ Product Removal (ISPR) in Whole Cell Biotechnology During the last Twenty Years (Eliminación de productos *in situ* (ISPR) en biotecnología de células completas durante los últimos veinte años"); Avances en Ingeniería Bioquímica, Biotecnología; Vol. 80, 1 de enero de 2003; págs. 149 -175; Springer, Berlín) divulgan el uso de membranas, centrifugadoras y filtros para la eliminación de productos *in situ* en bioprocesos. Sin embargo, Stark y Stocker no enseñan ni divulgan un proceso de fermentación en quimiostato de alta densidad.

En la Figura 1A de la presente memoria, se muestra un reactor típico de la técnica anterior que tiene una entrada para agregar medio y una salida para recolectar el producto de interés junto con los fluidos de cultivo que contienen células, productos celulares, subproductos, productos de desecho, etc. En otras palabras, la estrategia de cultivo celular continuo descrita en, por ejemplo, WO2011012725 carece de la posibilidad de eliminar subproductos, productos de desecho e impurezas a través de una salida y recolectar el producto de interés a través de una segunda salida.

Sumario de la invención

El problema a resolver por la presente invención es proporcionar un proceso de fermentación en quimiostato continuo para mejorar las densidades celulares y, por ende, aumentar la productividad de un biorreactor y la concentración del producto en el medio recolectado, donde la productividad de un producto (por ejemplo, un polipéptido) se puede mejorar debido, por ejemplo, a condiciones optimizadas para el crecimiento celular.

La solución está basada en que el inventor de la presente ha descubierto que, al tener una primera salida en un biorreactor equipado con un dispositivo de separación (por ejemplo, una unidad de filtro de impurezas) que permite eliminar impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto y un medio con un caudal y una segunda salida para recolectar el producto de interés junto con el fluido de cultivo que contiene células, productos celulares, subproductos y productos de desecho utilizando el mismo caudal o uno diferente, se puede obtener una mayor densidad celular en el reactor durante el proceso de fermentación y, en particular, se puede obtener una concentración significativamente mayor del producto de interés en el medio recolectado, así como una productividad incrementada por litro de medio gastado.

Como se ilustra en la Figura 1B y C de la presente memoria, la solución de la presente invención, en la que el biorreactor comprende un dispositivo de separación para permitir que las impurezas sean eliminadas por una salida mientras que las células y/o el producto se eliminan por otra salida independiente, permite separar la alimentación en una fracción de residuos que pasa por un dispositivo de separación y una fracción de recolección que pasa por un módulo de recolección de producto. El experto en la técnica conoce varios dispositivos de separación adecuados, por ejemplo, filtros de membrana (a continuación, se proporcionan más detalles).

Al separar el flujo de salida en una fracción de recolección que contiene producto y/o células y una fracción de residuos que contiene impurezas y medios gastados, una mayor concentración de componentes de medios de alto valor tales como, por ejemplo, los factores de crecimiento se pueden lograr dentro del biorreactor durante un tiempo prolongado mientras se mantiene un bajo nivel de impurezas. Además, el flujo de producto y/o células que salen del biorreactor también puede controlarse ajustando el caudal a través del módulo de recolección de producto y puede obtenerse una concentración significativamente mayor del producto de interés y una productividad incrementada por litro de medio gastado.

Esto se ilustra en los ejemplos de trabajo 1 y 2 en la presente memoria. En el ejemplo de trabajo 1, ningún dispositivo de separación está operativo y toda la solución de alimentación se dirige a través de la salida de recolección de producto. En el ejemplo de trabajo 2, el biorreactor tiene una salida equipada con un dispositivo de separación que permite eliminar las impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto y el medio, y una segunda salida para recolectar el producto, es decir, el anticuerpo. El biorreactor se alimenta con 7,5 l/día donde 5 l/día se dirigen a través de la unidad de filtro de impurezas y 2,5 l/día se dirigen a través de la salida de recolección. Esto proporciona una mejora significativa en comparación con el ejemplo 1, y la productividad se

incrementa en un factor de 3 (0,69 g/l día en comparación con 0,22 g/l día), y la concentración de recolección con un factor de 5 (1,38 g/l en comparación con 0,27 g/l). Es notable que esto se logra mientras que al mismo tiempo se reduce significativamente el consumo de medios por gramo de producto.

5 Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un producto seleccionado de un biopolímero expresado por una célula, un producto intracelular o extracelular producido por una célula o un microorganismo, un producto periplasmático producido por una célula o un microorganismo, una célula o un microorganismo en un biorreactor en un proceso de fermentación en quimiostato, en el que dicho biorreactor comprende:

- 10 i) una primera salida que tiene un dispositivo de separación que permite eliminar impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto y un medio mientras se retiene el producto en el biorreactor;
- (ii) una segunda salida que tiene un módulo de recolección de producto que permite eliminar el producto, las células, las impurezas y el medio; y
- 15 (iii) una entrada para agregar un medio;

en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 20 (a) fermentar la célula que expresa el biopolímero, la célula o el microorganismo que produce el producto intracelular, la célula o el microorganismo que produce el producto periplasmático, la célula o el microorganismo en el biorreactor en un medio adecuado en condiciones adecuadas, en el que durante la fermentación las impurezas y el medio se eliminan a través del dispositivo de separación, el producto, las células, las impurezas y el medio se eliminan a través del módulo de recolección de producto y se agrega un nuevo medio para reponer los nutrientes consumidos por las células o microorganismos y para equilibrar el medio eliminado durante la eliminación de impurezas y recolectar el producto; y
- 25 (b) el producto se aísla del medio recolectado; y

en el que la densidad celular en el biorreactor durante la fermentación alcanza al menos 5 millones de células por ml de medio.

30 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una recolección que comprende un producto seleccionado de un biopolímero expresado por una célula, un producto intracelular, tal como un cuerpo de inclusión, producido por una célula o un microorganismo, un producto periplasmático, tal como un producto precipitado en forma sólida, producido por una célula o un microorganismo, una célula o un microorganismo en un biorreactor en un proceso de fermentación en quimiostato, en el que dicho biorreactor comprende:

- 40 i) una primera salida que tiene un dispositivo de separación (por ejemplo, una unidad de filtro de impurezas) que permite que se eliminen impurezas con un tamaño, como el peso molecular (MW), inferior al tamaño (por ejemplo, MW) del producto y un medio mientras se retiene el producto en el biorreactor;
- (ii) una segunda salida que tiene un módulo de recolección de producto que permite eliminar el producto, las células, las impurezas y el medio; y
- (iii) una entrada para agregar un medio;

45 en el que el procedimiento comprende la siguiente etapa:

- 50 fermentar la célula que expresa el biopolímero, la célula o el microorganismo que produce el producto intracelular, tal como los cuerpos de inclusión, la célula o el microorganismo que expresa el producto periplasmático, la célula o el microorganismo en el biorreactor en un medio adecuado en condiciones adecuadas, en el que durante la fermentación las impurezas y el medio se eliminan a través del dispositivo de separación, el producto, las células, las impurezas y el medio se eliminan a través del módulo de recolección de producto y se agrega un nuevo medio para reponer los nutrientes consumidos por las células o microorganismos y para equilibrar el medio eliminado durante la eliminación de impurezas y la recolección del producto; y
- 55 en el que la densidad celular en el biorreactor durante la fermentación alcanza al menos 5 millones de células por ml de medio.

60 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un aparato de quimiostato de alta densidad que comprende un biorreactor para fermentar una célula que expresa el biopolímero, una célula o un microorganismo que produce un producto intracelular, como cuerpos de inclusión, una célula o un microorganismo que expresa un producto periplasmático, una célula o un microorganismo que tiene:

- 65 i) una primera salida que tiene un dispositivo de separación que permite eliminar las impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto mientras se retiene el producto en el biorreactor;
- (ii) una segunda salida que tiene un módulo de recolección de producto que permite eliminar el producto,

las células, las impurezas y el medio;
 (iii) una primera entrada para agregar un medio.

En algunos casos, si el polipéptido de interés tiene una estabilidad limitada o exhibe efectos tóxicos sobre la célula huésped, puede ser conveniente expresarlo bajo el control de un promotor inducible de tal manera que las células crezcan primero hasta una densidad celular deseada y luego la expresión del polipéptido se induce añadiendo un inductor o cambiando la temperatura y/o el pH del medio.

Por consiguiente, un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un producto seleccionado de un biopolímero expresado por una célula, un producto intracelular o extracelular producido por una célula o un microorganismo, un producto periplasmático producido por una célula o un microorganismo, en un primer y segundo biorreactor en un proceso de fermentación en quimiostato, en el que dicho primer biorreactor comprende:

- i) opcionalmente una primera salida que tiene un dispositivo de separación que permite eliminar impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto y un medio mientras se retiene el producto en el biorreactor;
- (ii) una segunda salida que tiene un módulo de recolección de producto que permite eliminar el producto, las células, las impurezas y el medio; y
- (iii) una entrada para agregar un medio;

en el que dicho segundo biorreactor comprende:

- (iv) una tercera salida que tiene un dispositivo de separación que permite eliminar impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto y un medio mientras se retiene el producto en el biorreactor;
- (v) una cuarta salida que tiene un módulo de recolección de producto que permite eliminar el producto, las impurezas y el medio; y
- (vi) una entrada para agregar un medio;
- (vii) una entrada para agregar células y un medio del primer biorreactor;

en el que el primer biorreactor es para el crecimiento de células o microorganismos y el segundo biorreactor es para la inducción de la producción del biopolímero, el producto intracelular o extracelular o el producto periplasmático, y en el que el primer y segundo biorreactor operan en serie, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (a) hacer crecer y opcionalmente fermentar la célula que expresa el biopolímero, la célula o el microorganismo que produce el producto intracelular o extracelular, la célula o el microorganismo que produce el producto periplasmático, la célula o el microorganismo en el primer biorreactor en un medio adecuado en condiciones adecuadas, en el que durante el crecimiento y opcionalmente la fermentación las impurezas y el medio se eliminan a través del dispositivo de separación, el producto, las células, las impurezas y el medio se eliminan a través del módulo de recolección de producto y se agrega un nuevo medio para reponer los nutrientes consumidos por las células o microorganismos y para equilibrar el medio eliminado durante la eliminación de impurezas y la recolección del producto; y
- (b) transportar el producto, las impurezas y el medio eliminado a través del módulo de recolección de producto al segundo biorreactor, la inducción de la producción del biopolímero, el producto intracelular o extracelular o el producto periplasmático, en el que durante la producción las impurezas y el medio se eliminan a través del dispositivo de separación, el producto, las células, las impurezas y el medio se eliminan a través del módulo de recolección de producto y se agrega un nuevo medio para reponer los nutrientes consumidos por las células o microorganismos y para equilibrar el medio eliminado durante la eliminación de impurezas y la recolección del producto.
- (c) el producto se aísla del medio recolectado; y

en el que la densidad celular en el biorreactor durante la fermentación alcanza al menos 5 millones de células por ml de medio.

Definiciones

Antes de realizar una discusión de las realizaciones detalladas de la invención, se proporciona una definición de términos específicos relacionados con los principales aspectos y realizaciones de la invención. Todos los términos se definen de acuerdo con la comprensión normal de los términos por parte del experto en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, el término "un proceso de fermentación en quimiostato" pretende significar un proceso de fermentación que tiene lugar en un biorreactor en un sistema de quimiostato. El sistema de quimiostato para los procesos de fermentación se opera con una entrada continua de medio que comprende nutrientes y una salida de medio de cultivo que comprende células, productos, productos de desecho, medios usados, etc. En el sistema de quimiostato, no hay un dispositivo de retención celular, de modo que la

concentración de células en el biorreactor y la concentración de células en el sobrenadante recolectado del biorreactor son sustancialmente idénticas. Usualmente, el medio de cultivo se alimenta al reactor a una velocidad constante y predeterminada, manteniendo una tasa de dilución baja del cultivo (típicamente de $0,2 \text{ d}^{-1}$ a $1,0 \text{ d}^{-1}$). Para evitar el lavado de las células, la tasa de dilución generalmente se elige para que sea menor, y a veces igual, que la tasa máxima de crecimiento específico de las células. Los fluidos de cultivo que contienen células, productos celulares, subproductos, productos de desecho, etc., se eliminan a la misma velocidad, o sustancialmente a la misma velocidad. Los sistemas de quimiostato proporcionan típicamente un alto grado de control, ya que los cultivos pueden equilibrarse, es decir, alcanzar un estado estable a una tasa de crecimiento específica equivalente a la tasa de dilución. Este equilibrio es determinante de la concentración de las células, metabolitos, productos de desecho, productos expresados (por ejemplo, proteínas secretadas), etc. Las tasas de crecimiento específicas en los sistemas de quimiostato son típicamente más bajas que la tasa de crecimiento máxima debido a al menos un sustrato limitante. En algunos sistemas, sin embargo, los estados estables se pueden mantener a las tasas máximas de crecimiento específico controlando y ajustando la biomasa, por ejemplo, en sistemas de turbidostato de cultivos de quimiostato. Usualmente, dichos cultivos de quimiostato contienen una distribución homogénea de células (por ejemplo, suspensiones de células individuales) en todo el biorreactor. Sin embargo, en comparación con el sistema de perfusión, el sistema de quimiostato típicamente resulta en densidades celulares más bajas.

Como se usa en la presente memoria, el término "un aparato quimiostato" pretende significar un aparato que comprende un biorreactor para operar en un modo quimiostático. Por lo tanto, en el proceso de fermentación en quimiostato se utiliza un aparato de quimiostato para alojar y fermentar las células y los microorganismos en un medio.

Como se usa en la presente memoria, el término "biorreactor" se refiere a cualquier dispositivo o sistema que soporte un entorno biológicamente activo. En un caso, pero no limitado al mismo, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Los biorreactores son comúnmente cilíndricos, varían en tamaño desde algunos litros hasta metros cúbicos, y a menudo están hechos de acero inoxidable, pero también podrían estar hechos de otros materiales, como materiales desechables.

Un biorreactor también puede referirse a un dispositivo o sistema destinado a hacer crecer células o tejidos en el contexto del cultivo celular. Sobre la base del modo de operación, un biorreactor puede clasificarse como por lotes, alimentado por lotes o continuo (por ejemplo, un modelo de reactor de tanque agitado continuo). Un ejemplo de biorreactor es el quimiostato. El biorreactor puede estar equipado con una o más entradas para suministrar nuevo medio fresco o concentrado a las células, y con una o más salidas para recolectar el producto o vaciar el biorreactor. Además, el biorreactor puede estar equipado con al menos una salida construida de tal manera que se pueda conectar un dispositivo de separación al biorreactor. Por lo general, las condiciones ambientales del biorreactor, como los caudales de gas (es decir, aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono), la temperatura, el pH y los niveles de oxígeno disuelto, y la velocidad de agitación/velocidad de circulación, se pueden monitorear y controlar de cerca.

Como se usa en la presente memoria, los términos "una primera salida" y "una segunda salida" significan "una o más primeras salidas" y "una o más segundas salidas", y dichas primeras y segundas salidas pueden ser salidas diferentes e individuales conectadas directamente al biorreactor, o la primera y segunda salidas pueden estar en comunicación con el biorreactor a través de una única salida directamente acoplada al biorreactor, en el que la separación se produce fuera del biorreactor. Lo mismo se aplica a los términos "una tercera salida" y "una cuarta salida" en relación con el sistema de biorreactor adicional.

Las realizaciones de la presente invención se describen a continuación, únicamente a modo de ejemplo.

Dibujos

Figura 1: Esta Figura muestra un biorreactor quimiostato típico de la técnica anterior y ejemplos de biorreactores quimiostato novedosos, tal como se describe en la presente memoria.

La Figura 1A muestra un biorreactor quimiostato normal de la técnica anterior en el que toda la alimentación pasa a través del módulo de recolección de producto.

La Figura 1B muestra un novedoso biorreactor quimiostato que tiene una salida equipada con un dispositivo de separación para eliminar impurezas y una segunda salida para recolectar el producto.

La Figura 1C muestra una variante del biorreactor quimiostato de la Figura 1B en la que el dispositivo de separación y el módulo de recolección de producto se construyen en una unidad común colocada en una salida y en la que el efluente se divide en el dispositivo de separación y el módulo de recolección de producto fuera del biorreactor y el retenido se devuelve al biorreactor.

Descripción detallada de la invención

El inventor de la presente invención ha descubierto que al tener una salida en un biorreactor equipado con un dispositivo de separación (por ejemplo, una unidad de filtro de impurezas) que permite que las impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto y el medio se eliminan con un caudal y otra salida para recolectar el producto de interés junto con el fluido de cultivo que contiene células, productos celulares, subproductos y productos de desecho con el mismo o diferente caudal, se puede obtener una mayor densidad celular en el biorreactor durante un proceso de quimiostato y, en particular, se puede obtener una concentración significativamente mayor de producto de interés en el medio recolectado y así como una mayor productividad por litro de medio gastado. En la presente memoria, este proceso de quimiostato también se puede denominar quimiostato de alta densidad o simplemente quimiostato HD.

El producto de interés puede ser un biopolímero expresado por una célula, un producto intracelular o extracelular producido por una célula o un microorganismo, un producto periplasmático producido por una célula o un microorganismo, una célula o un microorganismo.

Como se usa en la presente memoria, los biopolímeros son una clase especial de polímeros producidos por organismos vivos. Los biopolímeros están hechos de unidades repetitivas llamadas monómeros. Los biopolímeros tienen intrínsecamente una estructura bien definida: la composición química exacta y la secuencia en la que se disponen estas unidades se denomina estructura primaria. Muchos biopolímeros se pliegan espontáneamente en formas compactas características, que determinan sus funciones biológicas. El almidón, las proteínas y los péptidos, el ADN y el ARN son todos ejemplos de biopolímeros, en los que las unidades monoméricas, respectivamente, son azúcares, aminoácidos y ácidos nucleicos.

En un ejemplo adecuado, el biopolímero de interés tiene un MW de al menos 2.000 kDa, o al menos 5.000 kDa, o al menos 15.000 kDa, o al menos 25.000 kDa, o al menos 50.000 kDa, o al menos 100.000 kDa, o al menos 150.000 kDa, o al menos 200.000 kDa, o al menos 250.000 kDa.

Los ejemplos adecuados de un biopolímero de interés incluyen un polipéptido, polisacárido, híbrido de polipéptido/polisacárido, polinucleótido, que son polímeros derivados de ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN), polihidroxibutirato, una clase de poliésteres producidos por ciertas bacterias, cis-1,4-poliisopreno el componente principal del látex del árbol del caucho.

Sin embargo, en un ejemplo adecuado, el polipéptido de interés tiene un MW de al menos 5.000 kDa, o al menos 15.000 kDa, o al menos 20.000 kDa o al menos 40.000 kDa o al menos 50.000 kDa, o al menos 100.000 kDa, o al menos 150.000 kDa, o al menos 200.000 kDa, o al menos 250.000 kDa, o al menos 500.000 kDa.

En una realización preferente de la presente invención, el producto se selecciona de un biopolímero, tal como un polipéptido o una proteína.

Los ejemplos adecuados de un polipéptido de interés incluyen un anticuerpo o fragmento del mismo, hormona del crecimiento humana, hormona estimulante del folículo, factor VIII, factor VII, factor IX eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), alfa-glactosidasa A, alfa-L-iduronidasa (rhIDU; laronidasa), N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (rhASB; galsulfasa), ADNsa, activador de plasminógeno tisular (TPA), glucocerebrosidasa, interferón (IF), insulina, derivado de insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 1, tenecteplasa, factor antihemofílico, factor de coagulación humano, Etanercept, Trastuzumab, Infliximab, Basiliximab, Belimumab, Daclizumab, Adalimumab, Abciximab, Afutuzumab, Alemtuzumab, Cetuximab, Daclizumab, Denosumab, Eculizumab, Eprexolomab, Golimumab, Ibritumomab tiuxetan, Mepolizumab, Motavizumab, Natalizumab, Ofatumumab, Omalizumab, Oregovomab, Palivizumab, Pentumomab, Pertuzumab, Ranibizumab, Rituximab, Tefibazumab y Zanolimumab. En una realización preferente de la presente invención, el producto es insulina, tal como insulina humana.

Las células que expresan un polipéptido pueden hacerlo bajo el control de un promotor constitutivo (es decir, un promotor no regulado que permite la transcripción continua de su gen asociado) o bajo el control de un promotor inducible (promotores inducidos por la presencia o ausencia de bióticos o factores abióticos). En algunos casos, si el polipéptido de interés tiene una estabilidad limitada o exhibe efectos tóxicos en la célula huésped, puede ser conveniente expresarlo bajo el control de un promotor inducible de modo que las células crezcan primero hasta una densidad celular deseada y luego la expresión del polipéptido se induce añadiendo un inductor o cambiando la temperatura y/o el pH del medio.

Como se usa en la presente memoria, "inducción de la producción del biopolímero, el producto intracelular o extracelular o el producto periplasmático" se refiere a cambiar el estado del biorreactor de manera que las células aumentan la producción del biopolímero, el producto intracelular o extracelular, o el producto periplasmático en comparación con el estado antes de la inducción de la producción del biopolímero, el producto intracelular o extracelular o el producto periplasmático. Esto puede iniciarse agregando un compuesto químico, por ejemplo, un

inductor del medio, cambiando la temperatura y/o el pH del medio o conduciendo más o menos oxígeno a través del biorreactor.

5 En una realización de la presente invención, la inducción de la producción del biopolímero, el producto intracelular o extracelular, o el producto periplasmático, se inicia cambiando la temperatura y/o el pH del medio o añadiendo un compuesto químico, tal como un inductor.

10 El experto en la técnica sabe cómo seleccionar un promotor constitutivo adecuado dependiendo de la célula huésped. Algunos promotores constitutivos de mamíferos bien conocidos son el promotor temprano del virus simio 40 (SV40), el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), el promotor de ubiquitina C humana (UBC), el promotor del factor de elongación humano 1 α (EF1A), el promotor de fosfoglicerato quinasa 1 de ratón (PGK) y el promotor de β -actina de pollo acoplado con el promotor del transposón copia del potenciador temprano de CMV (CAGG) (COPIA), el promotor de actina 5C (ACT5C) y el promotor alfa del factor de elongación 1 de hámster chino (CHEF1).

15 Los promotores inducibles son una herramienta muy poderosa en la ingeniería genética debido a que la expresión de genes ligados operativamente a los mismos puede activarse o desactivarse en determinadas etapas. El experto en la técnica sabe cómo seleccionar un promotor constitutivo adecuado en función de la célula huésped y del tipo de inductor. Los promotores inducibles pueden estar regulados por factores bióticos o abióticos. Ejemplos de promotor inducible regulado por factores abióticos, como el calor, es el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF1) y ejemplos de promotor inducible regulado por factores bióticos (por ejemplo, inductores químicos) son el Sistema T-REx™; un sistema de expresión de mamíferos regulado por tetraciclina que utiliza elementos reguladores del operón de resistencia a la tetraciclina (Tet) codificada por Tn10 de *E. coli*, el sistema de expresión inducible por ecdisona que puede ser inducido por una hormona esteroidea.

25 El biopolímero aislado (por ejemplo, polipéptido) de interés normalmente se purifica y se formula en una composición final comercial relevante de interés (por ejemplo, una composición farmacéutica de interés). Además, normalmente se envasa en un recipiente adecuado. Por lo tanto, en una realización, el polipéptido aislado se formula en una composición farmacéutica.

30 Un producto intracelular puede ser, en general, cualquier compuesto intracelular localizado, como un orgánulo encerrado en su propia bicapa lipídica, como un cuerpo de inclusión, un virus o un biopolímero como se describió anteriormente, una vitamina, un ácido graso, un alcohol o cualquier otro compuesto orgánico de bajo peso molecular producido por una célula.

35 En una realización preferente de la presente invención, el producto intracelular es un cuerpo de inclusión.

40 En general, un producto extracelular puede ser cualquier compuesto que haya sido producido o sintetizado por una célula y exportado activa o pasivamente fuera de la célula. Ejemplos de producto extracelular pueden ser biopolímeros, hormonas, factores de crecimiento, enzimas, proteinasas, citocinas, quimioquinas u otros compuestos que se transportan fuera de la célula. En general, es más fácil purificar un producto extracelular que un producto intracelular localizado, ya que no es necesario romper la pared celular y aislar el producto de la composición celular compleja alterada.

45 El producto también puede ser un producto periplasmático producido por una célula o un microorganismo. Como se usa en la presente memoria, el periplasma es un espacio bordeado por dos barreras permeables selectivas, es decir, membranas biológicas, que son la membrana interna (es decir, la membrana citoplasmática) y la membrana externa en bacterias Gram-negativas. Los productos de interés pueden localizarse naturalmente en el periplasma o genéticamente equipados con péptidos de señal relevantes para el transporte activo al periplasma. La purificación de proteínas del extracto de periplasma es relativamente fácil porque el nivel de proteínas impuras es menor que en los procedimientos de expresión intracelular.

50 En una realización, el producto se selecciona de un producto periplasmático, tal como un producto precipitado en forma sólida y en una realización adicional el producto periplasmático es un producto precipitado en forma sólida, tal como en forma cristalina, amorfa o desnaturalizada.

55 Como se usa en la presente memoria, el producto también puede ser una célula. La célula es la unidad estructural y funcional básica de todos los organismos vivos conocidos. Hay dos tipos de células: eucariotas y procariotas. Las células procariotas suelen ser independientes, mientras que las células eucariotas pueden existir como un organismo unicelular o encontrarse en organismos multicelulares. La célula procariota es más simple, y por lo tanto más pequeña, que una célula eucariota, carece de núcleo y la mayoría de los otros orgánulos de eucariotas. Hay dos tipos de procariotas: bacterias y arqueas; estos comparten una estructura similar. Las plantas, los animales, los hongos, los mohos limosos, los protozoos y las algas son eucariotas. La principal diferencia entre procariotas y eucariotas es que las células eucariotas contienen compartimentos unidos a la membrana en los que tienen lugar actividades metabólicas específicas. El más importante de ellos es el núcleo

celular, un compartimento delineado por una membrana que alberga el ADN de la célula eucariota.

En una realización, el producto se selecciona de una célula, tal como una célula de mamífero.

5 En una realización adicional, la célula que expresa el polipéptido es al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en *E. coli*, *Bacillus*, levadura del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, célula CHO (ovario de hámster chino), hibridomas, célula BHK (Baby Hamster Kidney), célula de mieloma, célula HEK-293, célula linfoblastoide humana, una célula humana como la célula humana PER.C6® y una célula de ratón.

10 En otra realización adicional, la célula se selecciona de una línea celular de mamífero tal como CHO, NSO, Perc6, BHK o HEK. En una realización preferente, la célula es una célula de mamífero.

15 Como se usa en la presente memoria, un microorganismo incluye todos los procariotas, a saber, las bacterias y arqueas; y diversas formas de eucariotas, que comprenden los protozoos, hongos, algas, plantas microscópicas (algas verdes) y animales como rotíferos planarios y también virus. En una realización de la invención, el microorganismo se selecciona de hongos, levaduras, humícolas, *saccharomyces*, *aspergillus*, *bacillus*, *lactobacillus*.

20 Como se usa en la presente memoria, el producto puede ser un producto intracelular tal como un virus. Un virus es un pequeño agente infeccioso que solo se replica dentro de las células vivas de un organismo. Los virus pueden infectar todo tipo de organismos, desde animales y plantas hasta bacterias y arqueas. Las poblaciones virales no crecen por división celular, porque son acelulares. En cambio, usan la maquinaria y el metabolismo de una célula huésped para producir múltiples copias de sí mismos y se ensamblan dentro de la célula. La
25 vacunación puede ser una forma eficaz de prevenir infecciones por virus. Las vacunas pueden consistir en virus vivos atenuados o muertos, o proteínas virales (antígenos). Las vacunas vivas contienen formas debilitadas del virus, que no causan la enfermedad, no obstante, confieren inmunidad. Estos virus se denominan atenuados. Se utilizan técnicas de biotecnología e ingeniería genética para producir vacunas de subunidades. Estas vacunas utilizan solo las proteínas de la cápside del virus. La vacuna contra la hepatitis B es un ejemplo de este tipo de
30 vacuna. En una realización de la presente invención, el producto es un virus o parte de un virus.

En una realización preferente, el producto se selecciona de un microorganismo, como levaduras, virus y bacterias.

35 Como se usa en la presente memoria, un biorreactor es cualquier dispositivo o sistema que soporta un entorno biológicamente activo. En un caso, pero no limitado a, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Los biorreactores son comúnmente cilíndricos, varían en tamaño desde algunos litros hasta metros cúbicos, y a menudo están hechos de acero inoxidable, pero
40 también podrían estar hechos de otros materiales, como materiales desechables. El biorreactor puede ser un biorreactor de un solo uso o un biorreactor desechable. Los biorreactores desechables son bien conocidos en la técnica. En lugar de un recipiente de cultivo de acero inoxidable o vidrio, un biorreactor de un solo uso está equipado con una bolsa desechable. La bolsa desechable puede estar hecha de una lámina de plástico de tres capas. Una capa está hecha de polietileno tereftalato o LDPE para proporcionar estabilidad mecánica. Una
45 segunda capa hecha con PVA o PVC actúa como barrera de gas. Finalmente, una capa de contacto está hecha de PVA o PP. En general, existen dos enfoques diferentes para construir biorreactores de un solo uso, que se diferencian en los medios utilizados para agitar el medio de cultivo.

Algunos biorreactores de un solo uso utilizan agitadores como los biorreactores convencionales, pero con
50 agitadores integrados en la bolsa de plástico. La bolsa cerrada y el agitador están preesterilizados. En uso, la bolsa se monta en el biorreactor y el agitador se conecta a un impulsor de manera mecánica o magnética. Otros biorreactores de un solo uso se agitan mediante un movimiento oscilante. Este tipo de biorreactor no necesita ningún agitador mecánico dentro de la bolsa de un solo uso. Los biorreactores de un solo uso con agitación y movimiento oscilante se utilizan hasta una escala de volumen de 2000 a 5000 litros. En comparación con los
55 sistemas de biorreactores convencionales, la solución de un solo uso tiene algunas ventajas. La aplicación de tecnologías de un solo uso reduce las demandas de limpieza y esterilización. Algunas estimaciones muestran ahorros de costos de más del 60% con sistemas de un solo uso en comparación con los biorreactores de acero inoxidable de activos fijos. En la producción farmacéutica, los procedimientos complejos de calificación y validación pueden facilitarse y, finalmente, conducirán a importantes reducciones de costos. La aplicación de
60 biorreactores de un solo uso reduce el riesgo de contaminación cruzada y mejora la seguridad biológica y del proceso. Las aplicaciones de un solo uso son especialmente adecuadas para cualquier tipo de producto biofarmacéutico. Además, los biorreactores de un solo uso contienen menos piezas en comparación con los biorreactores convencionales, por lo que se reducen los costes iniciales y de mantenimiento. En una realización de la presente invención, el biorreactor es un biorreactor de un solo uso, tal como un biorreactor desechable.

65

Un biorreactor también puede referirse a un dispositivo o sistema destinado a hacer crecer células o tejidos en el contexto del cultivo celular. Con base en el modo de operación, un biorreactor puede clasificarse como por lotes, alimentado por lotes o continuo (por ejemplo, modelo de reactor de tanque agitado continuo). Un ejemplo de biorreactor es el quimiostato. El biorreactor puede estar equipado con una o más entradas para suministrar nuevo medio fresco o concentrado a las células y una o más salidas para recolectar producto o vaciar el biorreactor construido de tal manera que un dispositivo de separación se pueda conectar al biorreactor.

En una realización preferente, el biorreactor tiene un volumen de al menos 50 l, más preferentemente al menos 100 l, incluso más preferentemente al menos 250 l y lo más preferentemente al menos 500 l.

Como se usa en la presente memoria, un dispositivo de separación puede ser una unidad de filtro de impurezas, tal como un filtro de membrana o una unidad de separación gravitacional o una unidad de separación centrífuga.

Se han desarrollado varios filtros y procedimientos de filtración especializados para separar materiales de acuerdo con sus propiedades químicas y físicas. Los filtros, que se han desarrollado en la técnica, incluyen filtros de superficie plana, filtros plisados, casetes de unidades múltiples y formas tubulares tales como fibras huecas. Para la invención descrita en la presente memoria se puede aplicar cualquier sistema de tecnología de ultrafiltración siempre que se pueda garantizar la esterilidad. Ejemplos de sistemas de filtración aplicables para uso en la producción de polipéptidos y eliminación de impurezas como se describe en la presente memoria son sistemas como: sistemas de cartucho, placa y marco y sistemas de fibra hueca. Los sistemas se pueden operar bombeando líquido sobre la membrana, por vibración (como la suministrada por PallSep) o por flujo tangencial alterno (ATF) y tanto las membranas poliméricas como las cerámicas son adecuadas para el proceso de filtración. Un experto en la técnica sabe seleccionar una membrana con las propiedades adecuadas.

Las membranas de fibra hueca han sido empleadas con éxito en una amplia variedad de industrias que incluyen alimentos, jugos, farmacéutica, metalurgia, lácteos, vino y, más recientemente, agua potable municipal. Dependiendo de la aplicación, las membranas de fibra hueca pueden ser alternativas muy prácticas y rentables a los procesos de separación físicos y químicos convencionales. Las membranas de fibra hueca ofrecen los beneficios únicos de las altas densidades de empaque de la membrana, los diseños sanitarios y, debido a su integridad estructural y construcción, pueden soportar la contrapresión del permeado, lo que permite flexibilidad en el diseño y la operación del sistema. Los cartuchos de fibra hueca pueden operar desde el interior hacia el exterior durante la filtración. Esto significa que el fluido de proceso (retenido) fluye a través del centro de la fibra hueca y el permeado pasa a través de la pared de la fibra hacia el exterior de la fibra de la membrana. El flujo tangencial puede ayudar a limitar el ensuciamiento de la membrana. Otras técnicas operativas que se pueden emplear con sistemas de membranas de fibra hueca incluyen el lavado a contracorriente con flujo inverso de permeado y retenido.

Por consiguiente, el filtro puede estar ubicado en un módulo de filtro externo unido al biorreactor. Alternativamente, el filtro de impurezas puede ubicarse dentro del biorreactor. La unidad de filtro también puede contener bombas o sistemas para prevenir el ensuciamiento del filtro, como el sistema ATF descrito anteriormente o el sistema Pallsep, donde una oscilación horizontal controlada mueve los elementos de la membrana a través del fluido de alimentación. La oscilación genera energía vibratoria en la superficie de la membrana, lo que produce un cizallamiento (más alto que el que se genera típicamente en los sistemas convencionales de Filtración de Flujo Tangencial) que se limita a una pequeña capa límite por encima de la superficie de la membrana y que no se aplica a la mayor parte del fluido. Esto asegura que incluso en corrientes de alimentación con alto contenido de sólidos, las membranas no se apelmacen con las especies retenidas. Los fluidos se procesan de manera muy suave a través de una ruta de flujo abierta con una caída de presión mínima e incluso una distribución de presión transmembrana.

El sistema puede depender de los metabolitos necesarios para eliminarlos del proceso y el producto en cuestión puede estar equipado con membranas con un valor de corte molecular de unos pocos cientos a decenas de miles. A menudo se utilizan membranas con un corte entre 1.000 y 20.000. El beneficio de usar una membrana con un corte de 10.000 o menos preferentemente alrededor de 5.000 es que los factores de crecimiento como la insulina y el IGF-1 se retendrán en el biorreactor.

Además, durante un ciclo prolongado, se puede cambiar un filtro y reesterilizar el sistema sin terminar la fermentación.

El experto en la técnica sabe cuál podría ser un tipo de filtro adecuado para la eliminación de impurezas y un tamaño de poro de corte de peso molecular nominal (NMWC) de membrana adecuado con respecto a permitir que las impurezas se perfundan fuera del filtro de impurezas y recolecten el polipéptido de interés a través de la salida de recolección de producto.

En una realización, el dispositivo de separación se selecciona de una unidad de filtro de impurezas, tal como un filtro de membrana o una unidad de separación gravitacional o una unidad de separación centrífuga.

El filtro de impurezas se selecciona a menudo en el intervalo de 1000 a 30.000 NMWC como, por ejemplo, en el intervalo de 2000 a 20.000 NMWC o en el intervalo de 2000 a 15.000 NMWC. Sin embargo, si el producto es una celda, el filtro de impurezas puede seleccionarse en el intervalo de 1000 a 500.000 NMWC, pero normalmente se prefiere que el filtro de impurezas tenga un límite de menos de 20.000 NMWC. Por lo tanto, en una realización, la unidad de filtro de impurezas es un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro de corte de peso molecular nominal (NMWC) de al menos 1000 NMWC, tal como dentro del intervalo de 2000 a 15.000 NMWC.

En una realización preferente, la unidad de filtro de impurezas es un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro de corte de peso molecular (NMWC) de un máximo de 80% del MW del producto (por ejemplo, polipéptido) de interés. Por ejemplo, si el MW del polipéptido de interés es 100.000, el corte máximo preferido del filtro de impurezas es 80.000 NMWC. Incluso más preferentemente, el filtro de impurezas tiene un tamaño de poro de corte de peso molecular (NMWC) de un máximo de 50% del MW del polipéptido de interés. Por lo tanto, en una realización, el filtro de impurezas tiene un tamaño de poro de corte de peso molecular (NMWC) de un máximo de 80% del MW del biopolímero.

Puede ser una ventaja que el NMWC del filtro de impurezas sea relativamente bajo si el medio comprende compuestos útiles tales como por ejemplo insulina, que tiene un MW de aproximadamente 6 kDa. Por consiguiente, si, por ejemplo, la insulina está presente en el medio, el NMWC del filtro de impurezas es preferentemente 10.000 o menos.

Como se usa en la presente memoria, un módulo de recolección de producto es, en su forma más simple, simplemente una salida que conduce a un recipiente o bolsa adecuada para recolectar el producto con células, impurezas y medio para almacenamiento o procesamiento posterior aguas abajo. También puede ser un dispositivo de separación capaz de, por ejemplo, separar polipéptidos de células, restos celulares o impurezas más grandes que el producto de interés.

En general, hay dos clases principales de técnicas para la separación de células del medio en los biorreactores de quimioestado, a saber, por sedimentación gravitacional o centrífuga, y por filtración (por ejemplo, filtración tangencial como la filtración por rotación axial o como filtros de rotación o filtración por flujo cruzado).

Una separación gravitacional es un procedimiento industrial para separar dos componentes, ya sea una suspensión o una mezcla granular seca en el que es práctico separar los componentes por gravedad. Este procedimiento se puede utilizar para separar sólidos de una mezcla líquida, si los sólidos no son solubles en el líquido. La persona experta en la técnica sabe cómo unir dispositivos de separación gravitacional adecuados a un biorreactor.

La separación centrífuga es otra técnica bien conocida para separar partículas en suspensión. Los separadores disponibles comercialmente que utilizan fuerza centrífuga para la separación se clasifican en una de dos categorías, centrífugas rotativas o hidrociclones. En las centrífugas, la fuerza centrífuga se genera mecánicamente girando el equipo que contiene el fluido en una trayectoria circular que hace que los fluidos se separen. Se ha utilizado principalmente para separar fluidos en estado estático, es decir, volúmenes específicos, que debían separarse. Los hidrociclones funcionan creando un vórtice físico dentro de un recipiente cilíndrico que genera fuerza centrífuga. La fase más pesada se fuerza hacia la parte exterior del fluido y el fluido más ligero permanece en el interior como un núcleo. A medida que el fluido continúa fluyendo, las porciones separadas se dirigen a diferentes salidas. La persona experta en la técnica sabe cómo unir dispositivos de separación centrífuga adecuados a un biorreactor.

En una realización, el módulo de recolección de producto es un dispositivo de separación basado en sedimentación gravitacional o centrífuga.

En una realización adicional, el módulo de recolección de producto es una unidad de filtro. En tal caso, el módulo de recolección de producto puede denominarse, en la presente memoria, filtro de producto.

En ciertos casos, el dispositivo de separación y el módulo de recolección de producto pueden integrarse en una unidad común instalada en una salida. En tal sistema, el efluente se divide en el dispositivo de separación y el módulo de recolección de producto fuera del biorreactor y el retenido se devuelve al biorreactor.

Por lo tanto, en una realización, el dispositivo de separación y el módulo de recolección de producto están integrados en una unidad común montada en una única salida. En otra realización, el dispositivo de separación y el módulo de recolección de producto son diferentes y tienen salidas individuales instaladas en el biorreactor.

En una realización preferente, la salida tiene un dispositivo de separación que permite eliminar las impurezas con un tamaño por debajo del tamaño del producto y el medio mientras se retiene el producto en el biorreactor y la salida tiene un módulo de recolección de producto que permite que el producto, las células, las impurezas y el medio a eliminar son diferentes e independientes.

Como se usa en la presente memoria, "medio" se refiere generalmente a un medio de cultivo celular, que puede comprender sales, aminoácidos, vitaminas, lípidos, detergentes, tampones, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, oligoelementos y carbohidratos. Los ejemplos de sales incluyen sales de magnesio, por ejemplo, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ y sales de hierro, por ejemplo, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, sales de potasio, por ejemplo, KH_2PO_4 , KCl ; sales de sodio, por ejemplo, NaH_2PO_4 o Na_2HPO_4 y sales de calcio, por ejemplo, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Ejemplos de aminoácidos son los 20 aminoácidos proteinogénicos conocidos, por ejemplo, histidina, glutamina, treonina, serina, metionina. Los ejemplos de vitaminas incluyen: ascorbato, biotina, colina, mioinositol y D-pantotenato, riboflavina. Los ejemplos de lípidos incluyen: ácidos grasos, por ejemplo, ácido linoleico y ácido oleico; peptona de soja y etanol amina. Los ejemplos de detergentes incluyen Tween 80 y Pluronic F68. Un ejemplo de tampón es HEPES. Los ejemplos de factores de crecimiento/hormonas/citocinas incluyen IGF, hidrocortisona e insulina (recombinante). Los expertos en la técnica conocen ejemplos de oligoelementos e incluyen Zn, Mg y Se. Los ejemplos de carbohidratos incluyen glucosa, fructosa, galactosa y piruvato. Sin embargo, para la fabricación de productos industriales de bajo costo, el medio también podría incluir componentes complejos de bajo costo como almidón y fuentes de proteínas de existencias de alimentos, etc. El experto en la técnica sabe cuál podría ser el medio adecuado y las condiciones adecuadas con respecto a células de expresión específicas y polipéptidos de interés.

El pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad del medio de cultivo celular dependen del tipo de célula elegida. Preferentemente, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad se eligen de manera que sea óptimo para el crecimiento y la productividad de las células. El experto en la técnica sabe cómo encontrar el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad óptimos para el cultivo del quimiostato. Por lo general, el pH óptimo para las células de mamíferos está entre 6,6 y 7,6, la temperatura óptima entre 30 y 39 °C, la osmolaridad óptima entre 260 y 400mOsm/kg. Alternativamente, pueden añadirse al medio antiespumantes y desespumantes a base de silicio o tensioactivos no iónicos tales como polímeros cobloque de monómeros de óxido de etileno/óxido de propileno al medio durante la fermentación. Un ejemplo de un medio sin suero comercial adecuado es el medio sin suero EX-CELL® 293 de Sigma-Aldrich. En casos especiales, el medio también puede ser agua. Para los sistemas microbianos, el pH podría ser de 3 a 8 y la temperatura de 20 a 45 °C. El experto en la técnica sabe cómo encontrar las condiciones de crecimiento adecuadas para la célula o el microorganismo elegido.

El experto en la técnica conoce numerosas células de expresión adecuadas. En una realización preferente, la célula que expresa el biopolímero (por ejemplo, polipéptido) de interés es al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en *E. coli*, *Bacillus*, levadura del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, célula CHO (Ovario de hámster chino), hibridomas, célula BHK (Riñón de hámster bebé), célula de mieloma, célula HEK-293, célula linfoblastoide humana y una célula de ratón, por ejemplo, una célula NSO.

Como se usa en la presente memoria, se entiende por impurezas los compuestos químicos o biológicos producidos por las células presentes en el biorreactor, que limitan el crecimiento de las células. Las impurezas también pueden surgir de células que mueren o se rompen durante el proceso de fermentación. Las impurezas pueden comprender alcohol etílico, alcohol butílico, ácido láctico, acetona etanol, compuestos gaseosos, péptidos, lípidos, amoníaco, compuestos aromáticos y fragmentos de ADN y ARN.

Cuando las células presentes en el biorreactor alcanzan una densidad celular satisfactoria o cuando hay suficiente producto presente en el flujo de salida a través de la salida de recolección. Esto se puede determinar midiendo la densidad celular, por ejemplo, usando un espectrofotómetro o midiendo la cantidad del polipéptido de interés mediante radioinmunoensayo u otros procedimientos de ensayo de proteínas adecuados. La persona experta en la técnica sabe cómo medir el producto de interés. El experto en la técnica sabrá cómo medir la presencia del producto de interés en la corriente de recolección.

Dado que la invención tal como se describe en la presente memoria da como resultado una alta densidad celular, se puede usar ventajosamente el medio con alta densidad celular para reiniciar (por ejemplo, sembrar) una nueva fermentación.

Las células que son sometidas ventajosamente al proceso de la invención pueden ser cualquier tipo de célula que se beneficie de este proceso, es decir, cultivar hasta una densidad celular viable alta.

De acuerdo con el proceso de la invención, una densidad de células viables alta es preferentemente una densidad de al menos 15 mil células/ml, preferentemente al menos 20 mil células/ml, más preferentemente al menos 25 mil células/ml, incluso más preferentemente al menos 30 mil células/ml y lo más preferentemente al menos 50 mil células/ml.

En un ejemplo adecuado, el biorreactor que contiene una salida que tiene un dispositivo de separación que permite eliminar las impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto, y el medio para eliminar mientras retiene el producto en el biorreactor y la salida que tiene un módulo de recolección de producto que permite que el producto, las impurezas y el medio a eliminar pueden regularse de manera que cantidades iguales o diferentes de líquido puedan pasar a través de las dos salidas. Esto brinda la posibilidad de concentrar el producto de

interés (por ejemplo, polipéptido o células) en el biorreactor en comparación con una situación en la que el biorreactor funciona sin tener una salida que tenga un dispositivo de separación que permita eliminar las impurezas mientras se retiene el producto en el biorreactor (como se ejemplifica con los ejemplos de trabajo 1 y 2). En muchos casos, puede ser favorable operar el biorreactor de manera que el flujo de salida a través de la salida que tiene un dispositivo de separación y el flujo de salida a través de la salida que tiene un módulo de recolección de producto sean diferentes. En una realización de la presente invención, las impurezas se eliminan mediante el dispositivo de separación mediante un caudal de medio a través del dispositivo de separación que es al menos del 25%, tal como al menos el 50%, por ejemplo, tal como al menos el 75% del caudal de medio a través del módulo de recolección de producto.

En una realización preferente de la presente invención, las impurezas se eliminan a través del dispositivo de separación (por ejemplo, la unidad de filtro de impurezas) mediante un primer caudal a través del dispositivo de separación (por ejemplo, la unidad de filtro de impurezas) y el producto se recolecta mediante el módulo de recolección de producto por un segundo caudal a través del módulo de recolección de producto, en el que la relación entre el primer caudal y el segundo caudal sea de 1:1 a 9:1.

En algunos casos, puede ser conveniente cultivar células a una densidad celular deseada en un biorreactor y luego transferir las células a un segundo biorreactor para inducir la expresión del polipéptido agregando un inductor o cambiando la temperatura y o el pH del medio. En tal caso, las impurezas también pueden eliminarse mediante el dispositivo de separación del primer biorreactor con un caudal deseado y mediante el dispositivo de separación del segundo biorreactor con un caudal deseado igual o distinto.

En una realización preferente de la presente invención, las impurezas se eliminan a través del dispositivo de separación del primer biorreactor mediante un caudal de medio a través del dispositivo de separación que es al menos el 25% del caudal de medio a través del módulo de recolección de producto de la etapa (a del cuarto aspecto), y en el que las impurezas se eliminan a través del dispositivo de separación del segundo biorreactor mediante un caudal de medio a través del dispositivo de separación que es al menos el 25% del caudal de medio a través del módulo de recolección de producto de la etapa (b del cuarto aspecto).

Esto se ilustra en los ejemplos de trabajo 1 y 2 en la presente memoria. En el ejemplo de trabajo 1, el parámetro de flujo de salida de líquido se ajusta de modo que 4 l/h se perfunden a través del módulo de recolección de producto. En el ejemplo 2, se repite el ejemplo 1 con la diferencia de que el biorreactor está equipado con una salida que contiene un dispositivo de separación y una segunda salida para recolectar el producto. El día 10, cuando la densidad celular alcanza los 30 millones de células/ml, se inicia la operación del quimiostato y la alimentación se divide entre la recolección y el desecho. Los parámetros optimizados se establecen a una tasa de alimentación de 7,5 l/día con 5 l/día de perfusión a través del dispositivo de separación y 2,5 litros de perfusión a través de la salida de recolección y con una temperatura del biorreactor de 36,5 °C. El quimiostato HD se ejecuta durante una semana en este modo y los resultados muestran que la concentración de producto aumenta de 0,27 g/l a 1,38 g/l y la productividad específica aumenta de 0,27 g/l a 0,46 g/l por litro de medio gastado.

Durante el inicio de la fermentación, cuando el nivel de producto e impurezas es bajo, el dispositivo de separación y el módulo de recolección de producto pueden cerrarse de manera que no pase líquido a través de estas unidades. Cuando la densidad celular aumenta y, por lo tanto, también los niveles de impurezas, se puede iniciar la perfusión de líquido a través del dispositivo de separación, así como se puede suministrar medio fresco con la misma velocidad para reponer los nutrientes consumidos y el medio expulsado.

Cuando se alcanzan los criterios de inicio para la recolección, se inicia el flujo de salida a través del módulo de recolección de producto y el sistema se reajusta de manera que el medio fresco se alimenta con una tasa correspondiente a la suma del flujo de salida a través del dispositivo de separación y el módulo de recolección de producto. De esta manera, el flujo de salida de impurezas a través del dispositivo de separación se puede ajustar de acuerdo con la velocidad a la que se acumulan dichas impurezas. De la misma forma, el flujo de salida de producto por la salida de producto puede ajustarse de acuerdo con la velocidad a la que se acumula el producto y, por consiguiente, se alimenta medio fresco con una tasa correspondiente a la suma de la salida a través del dispositivo de separación y el módulo de recolección de producto.

Por consiguiente, podría ser beneficioso hacer funcionar el sistema con una tasa de flujo de salida más baja a través del módulo de recolección de producto que a través del dispositivo de separación, de modo que el producto se obtenga en una solución más concentrada. En muchos casos, esto facilitará el procesamiento aguas abajo y el costo involucrado.

Otra ventaja es, por ejemplo, que los polipéptidos inestables que pueden inactivarse o degradarse durante un tiempo prolongado en el biorreactor pueden recolectarse ya a una densidad celular baja a través del módulo de recolección de producto a una tasa de flujo de salida baja mientras se hace funcionar el dispositivo de separación a una alta tasa de flujo de salida. De manera similar, los productos, que solo se expresan en bajos niveles,

también se pueden concentrar hacia arriba mediante el módulo de recolección de productos, de modo que el costo de la purificación aguas abajo se puede optimizar significativamente. Además, el cultivo de quimioestado también se puede ejecutar a una tasa de crecimiento más baja y aun manteniendo alta la productividad, ya que cuando se opera el dispositivo de separación se mantiene una mayor proporción de células en el biorreactor.

En una serie de situaciones, se puede añadir ventajosamente más medio nuevo, tal como, por ejemplo, al menos 1 vez el volumen del biorreactor al día.

En la presente memoria, todos los títulos y subtítulos se utilizan sólo por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

La invención abarca cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de los mismos, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente.

Los términos "un", "uno", "una", "el", "la" y referencias similares como se usan en el contexto de la descripción de la invención deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente.

La recitación de los intervalos de valores en la presente memoria solo tiene la intención de servir como un procedimiento abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si fuera recitado individualmente en la presente. A menos que se indique lo contrario, todos los valores exactos proporcionados en la presente memoria son representativos de los valores aproximados correspondientes (por ejemplo, se puede considerar que todos los valores ejemplares exactos proporcionados con respecto a un factor o medida en particular también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", donde corresponda).

Todos los procedimientos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente.

La descripción en la presente memoria de cualquier aspecto o realización de la invención utilizando términos como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos está destinada a proporcionar soporte para un aspecto similar o realización de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos en particular, a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente (por ejemplo, debe entenderse que una composición descrita en la presente memoria comprende un elemento particular como también describir una composición que consta de ese elemento, a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente).

La presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto mencionada en las reivindicaciones que se presentan en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Se inicia un quimioestado de volumen de trabajo de 5 l de acuerdo con lo siguiente: se inoculan células CHO que expresan un anticuerpo de IgG con una productividad específica de 20 PCD (medida en un lote de alimentación estándar de 10 días) en medio de células Ex. Se ejecuta como un lote de alimentación con una alimentación de aproximadamente 0,20 l/día durante 7 días hasta que alcanza una densidad celular de 12 millones de células/ml. A continuación, se inicia la operación del quimioestado y se optimiza la temperatura de alimentación y del biorreactor para garantizar una densidad celular bajo la operación del quimioestado. El flujo de alimentación optimizado se establece en 4 l/día y las células se cultivan a 37,0 °C. El quimioestado se hace funcionar durante una semana en este modo en el que después se miden la concentración y la productividad del producto.

Los resultados muestran una concentración de producto de 0,27 g/l y una productividad por volumen de biorreactor de 0,22 g/l día. La productividad específica es de 18 PCD y la productividad por litro de medio gastado es de 0,27 g/l.

Ejemplo 2:

El Ejemplo 1 anterior se repite en un biorreactor equipado con una salida que contiene un dispositivo de separación que permite eliminar las impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto, y el medio mientras se retiene el producto en el biorreactor y una segunda salida para recolectar el producto. El biorreactor

se hace funcionar durante 5 días, después de que se activa el dispositivo de separación y se continúa con el lote de alimentación hasta el día 10, donde alcanza una densidad celular de 30 millones de células/ml. A partir de entonces, se inicia la operación del quimiostato HD y la alimentación se divide entre la recolección y el desecho, y la temperatura del biorreactor se optimizó para garantizar una densidad celular constante. Los parámetros optimizados se determinan a una tasa de alimentación de 7,5 l/día con 5 l/día descargados a través del dispositivo de separación y 2,5 l/día a través de la salida de recolección y con una temperatura del biorreactor de 36,5 °C. El quimiostato HD se procesa durante una semana en este modo en el que se miden después la concentración y la productividad del producto.

Los resultados muestran una concentración de producto de 1,38 g/l y una productividad por volumen de biorreactor de 0,69 g/l día. La productividad específica es de 23 PCD y la productividad por litro de medio gastado es de 0,46 g/l.

Conclusión de resultados

Por lo tanto, al hacer crecer las células en condiciones estándar de quimiostato, se puede alcanzar una concentración de producto de 0,27 g/l y una productividad por volumen de biorreactor de 0,22 g/l día. Sin embargo, al dividir la alimentación del quimiostato en una fracción de residuos de 5 l/día que pasa a través del dispositivo de separación y una fracción de recolección de 2,5 l/día que pasa por la salida de recolección, se obtiene una productividad y concentración de producto mucho más altas. De esta forma, se obtiene una concentración de producto de 1,38 g/l y una productividad por volumen de biorreactor de 0,69 g/l día frente a una concentración de producto de 0,27 g/l y una productividad por volumen de biorreactor de 0,22 g/l día en condiciones estándar del quimiostato.

Esto se debe a que la alimentación de nutrientes frescos se puede incrementar en un biorreactor que tenga un dispositivo de separación, reduciendo así la cantidad de impurezas y mejorando la relación entre el crecimiento celular y la expresión del producto. Además, como el flujo de salida se separa en una fracción de producto que contiene células y/o producto y una fracción de desecho que contiene impurezas y medios gastados que no permiten que los componentes de medios de alto valor, como factores de crecimiento, salgan del biorreactor, es posible obtener mejores condiciones de productividad con la oportunidad para mantener estos valiosos componentes en el tanque durante un tiempo prolongado mientras se mantiene bajo el nivel de impurezas y para controlar el flujo de células y productos que salen del biorreactor. Además, dado que menos células salen del biorreactor cuando el flujo de salida se separa en una fracción de producto y una fracción de desecho, la tasa de crecimiento de las células se puede reducir disminuyendo la temperatura o regulando los caudales del gas (es decir, aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono), los niveles de oxígeno disuelto o la velocidad de agitación/velocidad de circulación que pueden ser beneficiosos para la estabilidad o la calidad del producto.

También es posible mantener una densidad celular significativamente mayor y obtener un producto más concentrado en la recolección, mientras que la productividad del biorreactor muestra una productividad aumentada en un factor de 3 (0,69 g/l día en comparación con 0,22 g/l día), y la concentración de recolección con un factor de 5 (1,38 g/l en comparación con 0,27 g/l). Es notable que esto se logra mientras que al mismo tiempo se reduce significativamente el consumo de medios por gramo de producto.

En conclusión, es evidente que la tecnología HD es una mejora notable de la tecnología de quimiostato actual.

Referencias

1: WO2011012725A1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un producto seleccionado de un biopolímero expresado por una célula, un producto intracelular o extracelular producido por una célula o un microorganismo, un producto periplasmático producido por una célula o un microorganismo, una célula o un microorganismo en un biorreactor en un proceso de fermentación en quimiostato de alta densidad, en el que dicho biorreactor comprende:
 - i) una primera salida que tiene un dispositivo de separación que permite eliminar impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto y un medio mientras se retiene el producto en el biorreactor;
 - (ii) una segunda salida que tiene un módulo de recolección de producto que permite eliminar el producto, las células, las impurezas y el medio; y
 - (iii) una entrada para agregar un medio;
 en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:
 - (a) fermentar la célula que expresa el biopolímero, la célula o el microorganismo que produce el producto intracelular, la célula o el microorganismo que produce el producto periplasmático, la célula o el microorganismo en el biorreactor en un medio adecuado en condiciones adecuadas, en el que durante la fermentación las impurezas y el medio se eliminan a través del dispositivo de separación, el producto, las células, las impurezas y el medio se eliminan a través del módulo de recolección de producto y se agrega un nuevo medio para reponer los nutrientes consumidos por las células o microorganismos y para equilibrar el medio eliminado durante la eliminación de impurezas y la recolección del producto; y
 - (b) el producto se aísla del medio recolectado; y
 en el que la densidad celular en el biorreactor durante la fermentación alcanza al menos 5 millones de células por ml de medio.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el producto se selecciona de un biopolímero, tal como un polipéptido o proteína.
3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto se selecciona de un producto intracelular, tal como un cuerpo de inclusión o de un producto periplasmático, tal como un producto precipitado en forma sólida, tal como en forma cristalina, amorfa o desnaturalizada.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto se selecciona de un microorganismo, tal como levadura, virus y bacterias, o de una célula, tal como una célula de mamífero.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la densidad celular en el biorreactor durante la fermentación alcanza al menos 10 millones de células por ml de medio, tal como al menos 20 millones de células por ml de medio, tal como al menos 30 millones de células por ml medio.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las impurezas se eliminan a través del dispositivo de separación (por ejemplo, la unidad de filtro de impurezas) mediante un caudal a través del dispositivo de separación (por ejemplo, la unidad de filtro de impurezas) y el producto se recolección a través del módulo de recolección de producto por un segundo caudal a través del módulo de recolección de producto, en el que la relación entre el primer caudal y el segundo caudal es de 1:1 a 9:1.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el dispositivo de separación se selecciona de una unidad de filtro de impurezas, tal como un filtro de membrana o una unidad de separación gravitacional o una unidad de separación centrífuga.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el biorreactor tiene un volumen de al menos 50 l, tal como al menos 500 l.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la unidad de filtro de impurezas es un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro de corte de peso molecular nominal (NMWC) de al menos 1000 NMWC, como dentro del intervalo de 2000 a 15.000 NMWC.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la unidad de filtro de impurezas es un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro de corte de peso molecular nominal (NMWC) de un máximo de 80% del MW del producto.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 2-10, en el que el polipéptido es

un anticuerpo o fragmento del mismo, hormona del crecimiento humana, hormona estimulante del folículo, factor VIII, factor VII, factor IX, eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), alfa-glactosidasa A, alfa-L-iduronidasa (rhIDU; laronidasa), N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (rhASB; galsulfasa), ADNsa, activador de plasminógeno tisular (TPA), glucocerebrosidasa, interferón (IF), insulina, derivado de insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 1, tenecteplasa, factor antihemofílico, factor de coagulación humano, Etanercept, Trastuzumab, Infliximab, Basiliximab, Belimumab, Daclizumab, Adalimumab, Abciximab, Afutuzumab, Alemtuzumab, Cetuximab, Daclizumab, Denosumab, Eculizumab, Edrecolomab, Golimumab, Ibritumomab tiuxetan, Mepolizumab, Motavizumab, Natalizumab, Ofatumumab, Omalizumab, Oregovomab, Palivizumab, Pentumomab, Pertuzumab, Ranibizumab, Rituximab, Tefibazumab y Zanolimumab.

12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula que expresa el polipéptido es al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en *E. coli*, *Bacillus*, levadura del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, Célula CHO (ovario de hámster chino), hibridomas, célula BHK (riñón de hámster bebé), célula de mieloma, célula HEK-293, célula linfoblastoide humana, una célula humana tal como la célula humana PER.C6® y una célula de ratón.

13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido aislado se formula en una composición farmacéutica.

14. Un procedimiento para la producción de un producto seleccionado de un biopolímero expresado por una célula, un producto intracelular o extracelular producido por una célula o un microorganismo, un producto periplasmático producido por una célula o un microorganismo, en un primer y segundo biorreactor en un proceso de fermentación en quimiostato de alta densidad, en el que dicho primer biorreactor comprende:

i) opcionalmente una primera salida que tiene un dispositivo de separación que permite eliminar impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto y un medio mientras se retiene el producto en el biorreactor;

(ii) una segunda salida que tiene un módulo de recolección de producto que permite eliminar el producto, las células, las impurezas y el medio; y

(iii) una entrada para agregar un medio;

en el que dicho segundo biorreactor comprende:

(iv) una tercera salida que tiene un dispositivo de separación que permite eliminar impurezas con un tamaño inferior al tamaño del producto y un medio mientras se retiene el producto en el biorreactor;

(v) una cuarta salida que tiene un módulo de recolección de producto que permite eliminar el producto, las impurezas y el medio; y

(vi) una entrada para agregar un medio;

(vii) una entrada para agregar células y un medio del primer biorreactor;

en el que el primer biorreactor es para el crecimiento de células o microorganismos y el segundo biorreactor es para la inducción de la producción del biopolímero, el producto intracelular o extracelular, o el producto periplasmático, y en el que el primer y segundo biorreactor operan en serie,

en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) hacer crecer y opcionalmente fermentar la célula que expresa el biopolímero, la célula o el microorganismo que produce el producto intracelular o extracelular, la célula o el microorganismo que produce el producto periplasmático, la célula o el microorganismo en el primer biorreactor en un medio adecuado en condiciones adecuadas, en el que durante el crecimiento y opcionalmente la fermentación las impurezas y el medio se eliminan a través del dispositivo de separación, el producto, las impurezas y el medio se eliminan a través del módulo de recolección de producto y se agrega un nuevo medio para reponer los nutrientes consumidos por las células o microorganismos y equilibrar el medio eliminado durante la eliminación de impurezas y la recolección del producto;

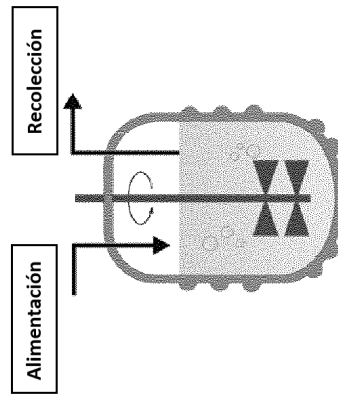
(b) transportar el producto, las impurezas y el medio eliminado a través del módulo de recolección de producto al segundo biorreactor, la inducción de la producción del biopolímero, el producto intracelular o extracelular o el producto periplasmático, en el que durante la producción las impurezas y el medio se eliminan a través del dispositivo de separación, el producto, las impurezas y el medio se eliminan a través del módulo de recolección de producto y se agrega un nuevo medio para reponer los nutrientes consumidos por las células o microorganismos y para equilibrar el medio eliminado durante la eliminación de impurezas y la recolección del producto;

(c) el producto se aísla del medio recolectado; y

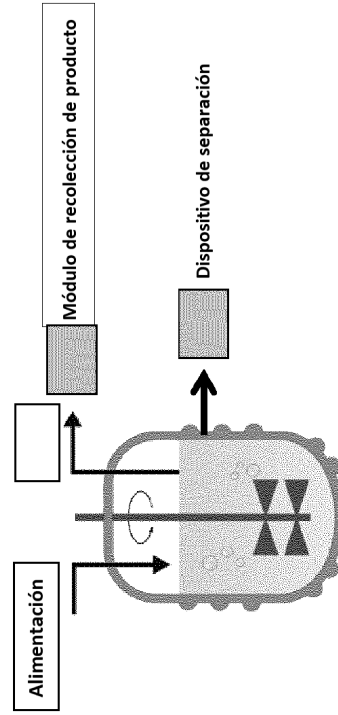
en el que la densidad celular en el biorreactor durante la fermentación alcanza al menos 5 millones de células por ml de medio.

Figura 1

A. Quimiostato de la técnica anterior



B. Quimiostato HD



C. Quimiostato HD con salida única

