



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 685**

51 Int. Cl.:
C12P 21/02 (2006.01)
C12M 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **99917898 .1**
86 Fecha de presentación : **27.03.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1068348**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2001**

54 Título: **Método de preparación de polipéptidos en un sistema libre de células y dispositivo para su realización.**

30 Prioridad: **31.03.1998 RU 98105294**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE
Institute of Protein Research

72 Inventor/es: **Biryukov, Sergey Vladimirovich;**
Simonenko, Peter Nikolayevich;
Shirokov, Vladimir Anatolievich;
Majorov, Sergey Gennadievich y
Spirin, Alexander Sergeyevich

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Método de preparación de polipéptidos en un sistema libre de células y dispositivo para su realización.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la biología molecular y a la biotecnología, es decir a los métodos y dispositivos para la síntesis de polipéptidos en un sistema de traslado libre de células.

Fundamento de la invención

Se conocen varios métodos de síntesis de polipéptidos en el sistema de traslado libre de células. Para la eliminación de las restricciones relacionadas con un rendimiento inferior de los polipéptidos de referencia y con un funcionamiento a corto plazo de los sistemas de transporte libres de células se sugería un método que se utiliza ampliamente en la actualidad (Spirin y cols., 1988). Este método está basado en el principio de una eliminación continuada de una mezcla de reacción de los productos de reacción y de una continua renovación de la concentración inicial de los componentes de bajo peso molecular durante la síntesis. Este método sirve de base o es la razón fundamental de varias invenciones relacionadas con su mejoría para aumentar la salida de producto sintetizado (Alakhov y cols., 1991; Baranov y cols., 1993; Alakhov y cols., 1995).

En función de la entrada de soluciones de alimentación y de la extracción de los productos de síntesis los métodos conocidos pueden clasificarse del modo siguiente: (a) métodos en los cuales la diálisis se utiliza para añadir componentes de la solución de alimentación a la mezcla de reacción y para eliminar los componentes de bajo peso molecular de la mezcla de reacción a través de la membrana de diálisis o bien para eliminar simultáneamente componentes de bajo y alto peso molecular de la mezcla de reacción; (b) métodos en los cuales la ultrafiltración continua se utiliza para una eliminación simultánea de componentes de alto y bajo peso molecular de los productos a través de la membrana y una entrada simultánea de soluciones de alimentación directamente en el volumen de mezcla de la reacción o a través de la membrana; c) métodos en los cuales se utilizan la entrada periódica de una solución de alimentación en la mezcla de reacción y la posterior eliminación de los componentes de bajo y alto peso molecular a través de la membrana. La entrada y salida de los flujos se realiza modificando la dirección de los fluidos a costa de la creación consecutiva de pulsos de presión positiva o negativa.

Se conoce el método (Mozayeny, 1995) en el cual la eliminación de los productos con elevado peso molecular mejora al incrementar el área de una membrana de ultrafiltración en relación con el volumen de la mezcla de reacción. Una de los principales inconvenientes de la mencionada invención es que durante la eliminación de los componentes de elevado peso molecular a través del área grande de la membrana con un tamaño de poro de 70 kD a 100 kD, se pierden junto al producto final los componentes de peso molecular de hasta 100 kD que trabajan de forma muy útil. Esto es un factor limitante para el funcionamiento del sistema libre de células. Cuanto mayor es el área de la membrana, mayor es la cantidad de componentes de elevado peso molecular del sistema libre de células eliminados del reactor a una velocidad de flujo elevada. Otro inconveniente es la necesidad de utilizar un bucle externo para la creación de un flujo tangencial

de la mezcla de reacción a lo largo de la superficie de la membrana. Durante el paso de la mezcla de reacción a través de las comunicaciones líquidas, tres factores influyen en el funcionamiento del sistema libre de células: (1) cuando la mezcla de reacción pasa a través del bucle la solución de alimentación no se añade a la parte del volumen externo de la mezcla de reacción, (2) los productos de poco peso que inhiben el sistema libre de células no son eliminados del volumen externo, (3) la comunicaciones y las bombas de líquido no son termoeestables y la mezcla de reacción cambia su temperatura dependiendo del entorno. Esto conduce a la irreproducibilidad de los resultados y limita el tiempo de vida del sistema libre de células.

Se conoce el método en el cual los autores ofrecen aplicar el pulso reiterado para la entrada de la solución de alimentación en el reactor y la eliminación de productos de síntesis de alto y bajo peso molecular del reactor a través de una membrana (Fischer y cols., 1990). Esto se lleva a cabo modificando la dirección del flujo a través de la membrana. Uno de los principales inconvenientes de la invención mencionada es que los componentes de síntesis de bajo peso molecular que inhiben el funcionamiento del sistema no son eliminados del reactor durante un periodo largo. El tiempo durante el cual la solución de alimentación pasa repetidamente a través de la membrana es igual al periodo de tiempo en que un volumen total de solución de alimentación a través de la membrana es igual al volumen completo de la mezcla de reacción. Con esta finalidad se forman N ciclos para crear presión positiva y negativa. Debido a la modulación de la presión los productos inhibidores vuelven al reactor junto con una parte regular de la solución de alimentación. Otro inconveniente del método es que con la formación de N ciclos los componentes de elevado peso molecular del sistema libre de células requeridos para una síntesis prolongada son eliminados de la mezcla de reacción. Por consiguiente, el retorno reiterado al reactor de los componentes de bajo peso molecular inhibiendo el funcionamiento del sistema y eliminando del reactor los componentes de alto peso molecular impone restricciones al funcionamiento del sistema.

El método (Choi, 1997) es conocido por que la síntesis de polipéptidos es llevada a cabo con la eliminación del un producto de referencia en una forma de diálisis. Con esta finalidad, una membrana divide el reactor en dos partes. La mezcla de reacción se coloca en un lado de la membrana y la solución de alimentación en el otro lado. La mezcla de reacción circula rápidamente a lo largo de la superficie de la membrana en dirección tangencial. Un inconveniente del método es que debido a un tamaño de poro grande los componentes del sistema son eliminados junto con los productos de referencia. Además, a pesar del hecho de que el proceso de diálisis es bastante eficaz debido al gran tamaño de poro, su alcance no es suficiente para el funcionamiento de sistemas libres de células de elevada eficacia.

Se conoce el método (Alakhov y cols., 1991) en el cual los aminoácidos, ATP, GTP en un tampón acuoso se añaden al reactor durante el funcionamiento del sistema y los componentes de bajo peso como el AMP, GDP, Pi formados durante la síntesis e inhibidores del sistema son eliminados a través de una membrana. Para lograr un funcionamiento más económico del sistema, se regeneran los productos de bajo peso molecu-

lar y vuelven al reactor a través de la membrana. Sin embargo a partir de la descripción y de la figura dada no queda realmente claro como los componentes de la síntesis de bajo y alto peso molecular son eliminados del reactor y de que forma la solución tampón es regenerado tras la eliminación de los polipéptidos. Teniendo en cuenta la descripción de los ejemplos, los componentes de alto y bajo peso molecular se eliminan del reactor a través de la membrana de ultrafiltración. El uso de una membrana de ultrafiltración se ha descrito en una serie de publicaciones (Spirin y cols., 1988; Takanori y cols., 1991; Spirin, 1992; Erdmann y cols., 1994). Un inconveniente de este método es el uso de grandes tamaños de recorte de membrana. En este caso, los componentes de elevado peso molecular de los sistemas necesarios para la síntesis son eliminados del reactor junto con los productos de referencia. El volumen de componentes de bajo peso molecular es igual al de los componentes eliminados, lo que resulta en un cierre rápido de los poros de la membrana de ultrafiltración.

Se conocen los métodos de adición de la solución de alimentación a la zona de reacción y de eliminación de la misma de los productos de reacción para diferentes tipos de reactores de membrana, en los cuales la zona de reacción se coloca entre dos membranas (Matson y cols., 1988; Wrasidlo y cols., 1990; Dziewulski y cols. 1992).

El método descrito en la patente (Alakhov y cols., 1995) es el prototipo del método que aquí se ha propuesto. Para la síntesis de polipéptidos en esta invención, la mezcla de reacción se colocará entre dos membranas lisas. Las membranas diferencian los flujos de los componentes de bajo peso molecular y de alto peso molecular y dividen el reactor en tres zonas: zona para entrada de solución de alimentación, zona de reacción, zona de eliminación del producto. El primer flujo bastante débil se forma en la zona de reacción. Garantiza el movimiento de la mezcla de reacción a lo largo de la parte interna de las barreras porosas, a través del cual se eliminan los componentes de elevado peso molecular (incluyendo polipéptidos sintetizados). El segundo flujo rápido se forma en la zona de entrada de la solución de alimentación. Garantiza la penetración de los componentes de bajo peso molecular a través de la membrana en el sistema de reacción. El flujo rápido de los componentes de bajo peso molecular y el flujo lento de los componentes de alto peso molecular se consigue creando un flujo tangencial a lo largo de la superficie externa de la primera barrera porosa y el proceso de diálisis para añadir la solución de alimentación a la zona de síntesis. Si los componentes de elevado peso molecular se eliminan del reactor, el tamaño del recorte se elige entre 50 y 100 kD (que es corroborado por el ejemplo 7).

La velocidad de penetración de los componentes de la solución de alimentación al reactor determinada por un alcance mayor por el proceso de diálisis es insuficiente para mantener el funcionamiento prolongado de sistemas libres de células altamente eficaces.

Los requisitos en cuanto a dispositivos para investigaciones científicas y para la síntesis de polipéptidos en cantidades preparatorias son diferentes. Para la síntesis de pequeñas cantidades de polipéptidos, entre 100 y 200 μg , es necesario tener un reactor simple y barato que pueda garantizar la síntesis durante 20-50 horas, sin la aplicación de un equipo caro y que permita la oportunidad de elegir velocidades de flujos

controladas o accionadas manualmente.

Durante la síntesis de polipéptidos en las cantidades necesarias, el dispositivo debería controlar el proceso: accionar velocidades de flujo dentro del reactor y dar una oportunidad para un funcionamiento prolongado (más de 50 horas) a expensas de una mezcla activa o bien otra acción que proteja del cierre de membranas o de fibras huecas, proporcione una adición eficaz de la solución de alimentación y de los componentes de peso molecular elevado a la mezcla de reacción y una eliminación eficaz de los componentes de bajo peso molecular en el reactor que inhiba la síntesis.

Se conoce el dispositivo (Mozayeny, 1995) que funciona en el modo de la síntesis continua de péptidos y es controlado por el ordenador. El sistema incluye un equipo caro y complicado (un muestreador automático, etc).

Se conocen dispositivos con un reactor de 1,0 ml (Spirin y cols., 1988) a 100,0 ml (Spirin, 1992). Utilizando el principio de dividir el volumen completo del reactor en varios reactores de volumen inferior es posible aplicar idénticas decisiones a los dispositivos propuestos para la síntesis de polipéptidos en las condiciones del laboratorio y para la síntesis de preparados. En este caso, las tecnologías de síntesis de polipéptidos rutinarias en pequeños volúmenes de la mezcla de reacción de 50 μl hasta 1-5 ml se pueden usar al trabajar con el volumen de hasta 100-200 ml mediante el escalado y aumento de la cantidad de módulos que trabaja en paralelo.

Se conocen dispositivos para el mantenimiento de la síntesis en las células (Puchinger y cols., 1980; Gebhard y cols., 1997; Hu y cols., 1977) utilizando el principio de escalado de módulos. En estos dispositivos, las entradas para el suministro de una solución de alimentación y las salidas para la eliminación de los productos están conectadas en paralelo para todos los reactores N. Los dispositivos conocidos han sido diseñados para el mantenimiento del crecimiento celular y no se pueden aplicar para la síntesis de polipéptidos, como cualquiera de los módulos de reacción N sirve para mantener la velocidad, presión y otros parámetros de flujo de las soluciones de alimentación y de los gases necesarios para el funcionamiento normal de las células.

Módulos conocidos para bioreactores basados en fibras huecas (Gebhard y cols., 1997; Hu y cols., 1997) no tienen en cuenta la especificidad del trabajo con el sistema libre de células. Las fibras utilizadas en los reactores tienen el mismo tamaño de un corte y su forma recuerda un haz colocado en un cilindro. Por tanto, una parte significativa de las superficies de las fibras huecas entra en contacto y reduce la superficie de trabajo.

Se conoce el dispositivo (Yagihashi y cols. 1996) cuya construcción representa dos capas de fibras huecas. Cada capa consiste en fibras huecas pegadas colocadas en paralelo. Ambas capas de fibras huecas tienen el mismo tamaño de un corte y una parte significativa de su superficie está en contacto.

Se conoce el dispositivo (Pedersen y cols., 1994) en el cual módulos separados son construcciones de capas individuales a base de fibras huecas con el mismo tamaño de un corte.

Sin embargo, esta decisión técnica ha sido desarrollada para la filtración de líquidos y no se puede utilizar en reactores para sistemas libres de células

sin la esencial modificación en el diseño, ya que se han previsto para trabajar con grandes volúmenes de fluidos líquidos.

Se conoce un gran número de diseños contruidos en base a membranas planas. Tienen también inconvenientes y se han previsto básicamente para filtración o diálisis.

Se conoce el dispositivo para la síntesis de polipéptidos en el sistema libre de células (Mozayeny, 1995) cuya estructura incluye dos membranas planas. Originalmente este dispositivo (OMEGA TM) se había previsto para la filtración y tiene un volumen vacío grande en las zonas de selección del producto. La solución de alimentación y los componentes de elevado peso molecular se añaden al reactor a través de una entrada. Este dispositivo no se ha previsto para ser montado en una construcción general a base de módulos N.

El prototipo del dispositivo propuesto para la síntesis de polipéptidos es el dispositivo descrito en la patente (Alakhov y cols., 1995). Para la síntesis de polipéptidos en un modo de eliminación del producto, el dispositivo contiene dos barreras porosas. Estas barreras pueden funcionar como membranas planas o fibras huecas. La mezcla de reacción se puede colocar tanto por el lado externo como el interno de las fibras huecas.

Un inconveniente del dispositivo mencionado es que contiene barreras porosas con el mismo tamaño de un corte y permite la eliminación del reactor de un flujo formado por fracciones de bajo peso molecular (el tamaño del corte de 7,5 kD) o de alto peso molecular (el tamaño del corte de hasta 100 kD).

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para la síntesis de polipéptidos en un sistema libre de células por el cual los productos de la síntesis se ramifican en una fracción de bajo peso molecular y una fracción que contiene componentes de alto peso molecular con el polipéptido de referencia, eliminándose la parte principal de la fracción de bajo peso molecular a través de al menos una parte de la segunda barrera porosa, se elige el cociente del volumen de las fracciones de la solución de alimentación y los componentes reemplazables respecto al volumen de la fracción que contiene el polipéptido de referencia, se llevan a cabo los modos de suministro de la solución de alimentación y de los componentes reemplazables de las fracciones.

Otro objetivo de la presente invención consiste en describir un método para la síntesis de polipéptidos en un sistema libre de células por el cual la fracción de bajo peso molecular que consiste en componentes eliminados que incluye componentes de bajo peso molecular de la mezcla de reacción y componentes de bajo peso molecular de la síntesis es retirada del volumen de reacción a través de cómo mínimo la segunda barrera porosa, realizándose el modo de suministro de las fracciones de la solución de alimentación y de los componentes reemplazables.

La presente invención se dirige en particular a un método para obtener polipéptidos en un sistema de traslado libre de células por el cual se preparan la mezcla de reacción, la solución de alimentación y los componentes reemplazables de la fracción de alto peso molecular, se colocan al menos dos barreras porosas dentro del módulo del reactor, la mezcla de reacción se introduce en el volumen del reactor y se in-

cuba en unas condiciones determinadas manteniendo la síntesis, el polipéptido de referencia se elimina de forma que los productos de síntesis se ramifican en una fracción de bajo peso molecular y una fracción que contiene componentes de alto peso molecular con el polipéptido de referencia, la fracción que contiene productos de alto peso molecular con el polipéptido de referencia se elimina a través de la primera barrera porosa que tiene unos tamaños de poro de hasta 100 kD, mientras que la fracción de bajo peso molecular con los componentes de la mezcla de reacción y los productos de síntesis es eliminada a través de cómo mínimo una parte de la segunda barrera porosa que tiene tamaños de poro de hasta 30 kD, se eligen el cociente del volumen de las fracciones de la solución de alimentación y de los componentes reemplazables respecto al volumen de la fracción que contiene el polipéptido de referencia, y se llevan a cabo los modos de suministro de la solución de alimentación y de los componentes reemplazables de las fracciones.

La solución de alimentación es aportada al volumen de reactor o bien (i) vía la entrada del volumen del reactor, o bien (ii) vía los poros de otra parte de la segunda barrera, o bien (ii) tanto vía la entrada como los poros.

La fracción de componentes de alto peso molecular con el polipéptido de referencia se elimina del reactor de forma continua o recurrente.

El método de la presente invención se define además por comprender una fracción de componentes de elevado peso molecular reemplazables que se añade a la mezcla de reacción o bien (i) antes de la síntesis, o bien (ii) una vez durante la síntesis, o bien (iii) de forma recurrente durante la síntesis, o bien (iv) se suministra de forma continua durante la síntesis.

La presente invención se dirige además a un método en el que los componentes de peso molecular alto reemplazables se eligen de (i) fracción de ribosomas, (ii) extractos del sistema libre de células (S30, S100 y su modificación), o bien (iii) polimerasas, plásmidos, tRNAs que son aportados al reactor mezclados con la solución de alimentación, cada uno de ellos por separado o combinado con los otros.

El método de la presente invención se define además por un cociente del volumen de la solución de alimentación, que es suministrado al reactor, al volumen de la fracción que contiene componentes de elevado peso molecular con polipéptidos diana, que son eliminados de la mezcla de reacción de 1 a 100.

La presente invención comprende además un método para obtener polipéptidos en un sistema de traslado libre de células por el cual se preparan la mezcla de reacción, la solución de alimentación y los componentes reemplazables de la fracción de alto peso molecular, se colocan al menos dos barreras porosas dentro del módulo del reactor, la primera barrera porosa tiene tamaños de poro de hasta 100 kD y la segunda barrera porosa tiene tamaños de poro de hasta 30 kD, la mezcla de reacción se introduce en el volumen del reactor y se incuba en unas condiciones determinadas manteniendo la síntesis, el polipéptido de referencia se elimina de forma que durante la síntesis se forman N ciclos, cada uno de los cuales consta al menos de dos etapas, en la primera etapa componentes de bajo peso molecular de la solución de alimentación son suministrados al reactor a través de la primera barrera porosa y la fracción de bajo peso molecular con productos de síntesis y componentes de la mezcla de

reacción se elimina a través de la segunda barrera porosa, en la segunda etapa se conectan los canales de suministro y eliminación y los componentes de bajo peso molecular de la solución de alimentación son suministrados a través de la segunda barrera porosa, la fracción de bajo peso molecular y la fracción de alto peso molecular que contiene los productos de síntesis y los componentes de la mezcla de reacción son eliminados a través de la primera barrera porosa, se realiza el tipo de suministro de la fracción de la solución de alimentación y los componentes reemplazables de alto peso molecular.

Otro objetivo adicional de la presente invención consiste en describir un reactor que comprenda al menos un volumen de reactor, cuya superficie externa contacte con la superficie externa de la primera y segunda barrera porosa, la superficie interna de la segunda barrera porosa esté conectada a la zona de entrada o salida de los flujos de peso molecular, la cara interna de la primera barrera porosa esté conectada a la zona de entrada y de los flujos de bajo peso molecular y de los flujos que contienen componentes de alto peso molecular con el polipéptido de referencia.

La presente invención en particular comprende un dispositivo para la síntesis de polipéptidos en un sistema de traslado libre de células que contiene al menos un módulo de reactor que incluye un volumen de reactor que tiene una entrada y una salida para los circuitos de líquido de entintado y que incluyen al menos dos barreras porosas, la primera barrera porosa tiene tamaños de poro de hasta 100 kD y la segunda barrera porosa tiene tamaños de poro de hasta 30 kD, un sistema para el suministro de diferentes fracciones de la solución de alimentación, y componentes reemplazables de elevado peso molecular, que consta de cómo mínimo una bomba, circuitos líquidos, compartimentos para la acumulación y el almacenamiento de productos de la solución de alimentación, por lo que el reactor comprende al menos un volumen del reactor, cuyo superficie externa entra en contacto con la superficie externa de la primera y segunda barreras porosas, la superficie interna de la segunda barrera porosa se conecta a la zona de la entrada o salida de los flujos de bajo peso molecular, el lado interno de la primera barrera porosa se conecta a la zona de entrada y salida de los flujos de bajo peso molecular que contienen componentes de alto peso molecular con el polipéptido de referencia.

Una configuración preferida es un dispositivo donde cada módulo reactor tiene un volumen de reactor de 50 μ l a 10 ml y el grosor de la capa del reactor es de 30 μ m a 5 mm, y/o donde cada volumen de reactor tiene la forma de (i) una lámina rectangular, una lámina cuadrada, o una lámina redonda, o bien (ii) una lámina plegada en una hélice o un cilindro.

El dispositivo es adecuado ya que el cociente del área de la superficie de la segunda barrera porosa respecto al área de la superficie de la primera barrera porosa se puede elegir entre 1 y 100.

Cada volumen del reactor del dispositivo puede contener o bien (i) la mezcla de reacción, (ii) la mezcla de reacción con un agitador magnético, o bien (iii) la mezcla de reacción con un diluyente poroso, o (iv) la mezcla de reacción con gránulos porosos.

Cada diluyente del dispositivo puede estar hecho de materiales porosos con tamaños de poro de 200

μ m a 10 nm, estos materiales se seleccionan de (i) estructuras fibrosas en forma de haces o láminas, (ii) una composición de estructuras fibrosas con un revestimiento de partículas porosas, (iii) sorbentes de afinidad en forma de gránulos o composición de estructuras fibrosas con un revestimiento de sorbentes de afinidad, y (iv) gránulos con componentes inmovilizados del sistema libre de células.

Una configuración preferida es un dispositivo donde la primera y segundas barreras porosas están hechas de membranas o de fibras huecas, o una barrera está hecha de una membrana y la otra barrera está hecha de fibras huecas.

Breve descripción de los dibujos

La invención se explica mediante ejemplos de funcionamiento con las referencias a las figuras siguientes.

Fig.1(a-c) muestra un esquema de los principios de la distribución del flujo para diferentes tipos de operaciones.

Fig.2(a-f) muestran diagramas de bloque de los módulos basados en el principio establecido.

Fig.3 muestra un diagrama de bloque del dispositivo para la síntesis en una configuración sin retirar el polipéptido de referencia.

Fig. 4 muestra un diagrama de bloque del dispositivo para la síntesis en una configuración retirando el polipéptido de referencia.

Fig. 5 muestra un diagrama de bloque del dispositivo para la síntesis en una configuración retirando el polipéptido de referencia con tres barreras porosas en el módulo.

Fig. 6 muestra un diagrama de bloque del dispositivo para la síntesis en una configuración con la retirada periódica del polipéptido de referencia.

Fig. 7 muestra un histograma que refleja la cantidad de GFP en las fracciones conforme a la descripción en el ejemplo 1.

Fig. 8 muestra la dependencia del cambio en la concentración del GFP sintetizado durante la síntesis en una parte de control conforme a los datos del ejemplo 1.

Fig. 9 es una foto de la electroforesis SDS conforme a los datos del ejemplo 1.

Fig. 10 muestra un diagrama de dependencia del cambio en la concentración del GFP sintetizado con la duración de la síntesis en una parte alícuota de control conforme a los datos del ejemplo 2.

La lista de las abreviaciones

F1 es el flujo de la solución de alimentación

F10-F20 son flujos de los componentes de bajo peso molecular de la mezcla de reacción. Ps son polipéptidos de referencia sintetizados.

Pc son componentes de elevado peso molecular del sistema.

Rm es la mezcla de reacción

Posiciones 100 son elementos constructivos del reactor.

Posiciones 200 son comunicaciones líquidas del dispositivo.

Posiciones 300 son elementos separados del dispositivo: válvulas, bombas, compartimentos para el eluido y compartimentos para el almacenamiento de la solución de alimentación.

Posición 400 es el bloque del controlador.

Descripción detallada de la invención

En general el proceso puede contener todas las etapas siguientes:

1. Preparar una mezcla de reacción sobre la base de los lisados procarióticos o eucarióticos libres de células.
2. Preparar una solución de alimentación y de componentes reemplazables de una fracción de elevado peso molecular;
3. Determinar el modo de funcionamiento del reactor, elegir un tipo de módulo de reactor con los tipos indicados de barreras porosas e instalar un dispositivo para la síntesis cuyas estructuras incluyan, al menos, un módulo reactor;
4. Colocar la mezcla de reacción en cada uno de los módulos de reacción.
5. Dependiendo del modo de funcionamiento, determinar y establecer las velocidades de flujo de la solución de alimentación y el flujo de los componentes de alto peso molecular reemplazables a través de la mezcla de reacción y las velocidades de eliminación de productos de alto y bajo peso molecular.
6. Llevar a cabo la síntesis aportando los tipos de funcionamiento seleccionados, y retirar durante la síntesis de forma continuada o recurrente a través de una barrera porosa los componentes de elevado peso molecular.
7. Durante la síntesis analizar el rendimiento del producto sintetizado, corregir los parámetros determinando las velocidades de flujo de la solución de alimentación del producto sintetizado y suministrar o no suministrar componentes reemplazables de elevado peso molecular.

Fig. 1(a-e) muestra diagramas de bloque que explican el principio de la ramificación del flujo en una fracción de bajo peso molecular y una fracción que contiene componentes de elevado peso molecular con polipéptido de referencia para diferentes tipos de operaciones.

Fig.1a muestra un diagrama de bloque de la ramificación del flujo dentro del módulo en un modo de retirada continua del polipéptido de referencia. El módulo de reacción contiene el caso 100, en el cual se forman tres zonas usando la primera barrera porosa 110 y la segunda barrera porosa 120. La mezcla de reacción Rm es conducida a la zona de reacción 130 antes del inicio de la síntesis. El flujo de la solución de alimentación F1 pasa a través de la entrada 151 a la zona de reacción 130 y desplaza los componentes de alto y bajo peso molecular de la síntesis de la mezcla de reacción a través de la primera y segunda barreras porosas. La parte básica de la fracción de bajo peso molecular pasa a través de la segunda barrera porosa 120 con un tamaño pequeño de un corte, que forma el flujo F20 que sale del volumen del reactor a través de la salida 142.

Simultáneamente, los componentes de alto peso molecular de la síntesis Ps, los componentes del Pc sistema libre de células y parte de los componentes de peso molecular inferior F10 que forman el flujo total Pc+Ps+F10 son desplazados de la mezcla de reacción a través de la barrera 110 con un corte de tamaño

grande a través de la salida 162. El cociente entre el volumen total de la solución de alimentación que llega al reactor y el volumen del flujo total, Pc + Ps + F10 se elige entre 2 y 100. Es preferible que este cociente se sitúe entre 10 y 50. Un descenso en la velocidad del flujo a través de la primera barrera 110 disminuye la formación de una capa de componentes de alto peso molecular sobre la superficie de la barrera porosa 110 y reduce el proceso de cierre de los poros de la membrana por los componentes de alto y bajo peso molecular. La concentración de polipéptidos sintetizados Ps en la mezcla de reacción aumenta y con ello se estimula la etapa siguiente de lavado. El tamaño del corte de la primera barrera 110 se elige dependiendo del peso molecular del polipéptido sintetizado y de su organización espacial.

La figura 1b muestra un diagrama de bloque de la ramificación del flujo de fracciones de bajo y alto peso molecular dentro del módulo en un modo de retirada periódica del polipéptido de referencia. El módulo de reacción contiene el estuche 100, dentro del cual se forman tres zonas usando la primera barrera porosa 110 y la segunda barrera porosa 120. Antes del inicio de la mezcla de reacción de síntesis se introduce Rm dentro del volumen de reacción 130 a través de la entrada 151. Durante la síntesis se forman N ciclos de entrada/retirada del flujo a través de barreras porosas 110 y 120. Cada ciclo consiste en dos etapas. Durante la primera etapa a través de la entrada 161 el flujo de la solución de alimentación F1 penetra a través de la primera barrera 110 dentro del volumen de reacción 130. La solución de alimentación desplaza los componentes de bajo peso molecular de la mezcla de reacción y los productos de síntesis de bajo peso molecular que forman el flujo F20 desde la mezcla de reacción a través de la barrera porosa 120 y la salida 142. Durante la segunda etapa, la dirección de la entrada/retirada del flujo a través de las barreras porosas 110, 120 se modifica. A través de la entrada 141 y de la segunda barrera 120 el flujo de la solución de alimentación F2 penetra dentro de la zona 130. La presión de la solución de alimentación forma un flujo de componentes de alto y bajo peso molecular de la mezcla de reacción que pasa a través de la barrera porosa 110 y de la salida 162, y se forma el flujo Pc + Ps + F10. Una vez terminada la segunda etapa, el ciclo llega a su fin, se inicia el ciclo siguiente o bien finaliza la síntesis. El cociente entre el volumen total de la solución de alimentación aportada al reactor durante N ciclos, respecto al volumen del flujo total Pc + Ps + F10 se selecciona entre 2 y 100. Es preferible que este cociente varíe de 10 a 50.

Un descenso en la velocidad del flujo a través de la primera barrera 110 reduce la formación de una capa de componentes de alto peso molecular sobre la superficie de la barrera porosa 110 y disminuye el proceso de cierre de los poros de las membranas por parte de los componentes de alto y bajo peso molecular. La concentración de Ps polipéptidos sintetizados en la mezcla de reacción aumenta, y con ello se estimula la siguiente etapa de su lavado. El tamaño del corte de la primera barrera 110 se elige dependiendo del peso molecular del polipéptido sintetizado y de su organización espacial. La primera y la segunda barrera porosa se limpian cambiando las direcciones de los flujos a través de las barreras porosas. La duración de un ciclo y los cocientes temporales entre la

duración de la primera y segunda etapas se mantienen constantes durante toda la síntesis, o se modifican dependiendo de las condiciones de la síntesis. Si la síntesis continua activamente y la concentración de polipéptidos en la mezcla de reacción crece rápidamente, para impedir el cierre de la membrana porosa se reducirá la duración de cada ciclo, lo que automáticamente dará lugar a una limpieza más frecuente de los poros.

La figura 1c muestra un esquema de las direcciones del flujo en el modo de funcionamiento sin seleccionar el producto. Durante la síntesis, todos los componentes de alto peso molecular se mantienen dentro de la mezcla de reacción. El flujo de la solución de alimentación F1 entra a través de la primera barrera porosa 110 que tiene un tamaño de poro de hasta 1000 kD. El flujo de los productos de bajo peso molecular F10, que inhiben el sistema libre de células pasa a través de la segunda barrera porosa 120. La primera barrera porosa es un flujo distribuidor F1 y proporciona la entrada uniforme de la solución de alimentación a todos los puntos de la mezcla de reacción.

La figura 1d muestra un esquema de direcciones de flujo en el modo de funcionamiento sin selección del producto para el módulo reactor que tiene al menos una parte de la primera barrera porosa y dos partes de la segunda barrera porosa. Durante la síntesis, el flujo de la solución de alimentación F1 y/o parte de los componentes reemplazables con elevado peso molecular penetra a través de los poros de la primera barrera 110, que tiene un tamaño de poro de hasta 100 kD. La barrera porosa es un flujo distribuidor F1 y proporciona la entrada uniforme de la solución de alimentación a todos los puntos de la mezcla de reacción. El flujo de los productos de bajo peso molecular F10 que inhiben el sistema libre de células se retira a través de las dos partes de la segunda barrera porosa 121-122, que tiene un tamaño de poro de hasta 30 kD.

La figura 1e muestra un esquema de direcciones de flujo en el modo de funcionamiento con una selección de producto para el módulo del reactor que tiene al menos una parte de primera barrera porosa y dos partes de segunda barrera porosa. Durante la síntesis todos los componentes de elevado peso molecular incluyendo el polipéptido de referencia se retiran de la mezcla de reacción a través de la primera barrera porosa 110, que tiene un tamaño de poro de hasta 100 kD. El flujo F1 de la solución de alimentación entra a través de una parte de la segunda barrera porosa 121, que tiene un tamaño de poro de hasta 30 kD. Esta barrera porosa es un flujo distribuidor F1 y proporciona una entrada uniforme de la solución de alimentación a todos los puntos de la mezcla de reacción. El flujo de los productos de bajo peso molecular F10 que inhiben el sistema libre de células se retira a través de la otra parte de la segunda barrera porosa 122, que tiene un tamaño de poro de hasta 30 kD.

Para llevar a cabo el método considerado se ofrecen varias construcciones del módulo reactor. El dispositivo puede aportar la síntesis de los productos en modos distintos. El módulo debería permitir las condiciones siguientes:

1. En cada punto del reactor se deberían llevar a cabo dos procesos simultáneamente:
 - (a) entrada de la solución de alimentación,
 - (b) retirada de los componentes de bajo pe-

so molecular que inhiben la síntesis.

2. La entrada de la solución de alimentación y la retirada de los componentes de los productos de bajo peso molecular se debería llevar a cabo en el periodo de tiempo durante el cual la síntesis cae por debajo de una magnitud admisible.
3. El dispositivo debería permitir la limpieza eficaz de las membranas porosas o de las fibras huecas y contener un mínimo de volúmenes vacíos en las comunicaciones líquidas para la entrada/retirada de componentes/productos de síntesis de peso molecular inferior/superior.

Para la realización de la primera y segunda condición, se prefiere un módulo reactor en el cual se pueda formar cualquier capa fina de la mezcla de reacción. El grosor de una capa se elige entre 0,1 mm y 10 mm siempre que en las zonas indicadas de la primera y segunda barreras porosas y los tamaños elegidos de su corte, la velocidad media de la entrada de la solución de alimentación en el reactor garantice la entrada de los componentes de la solución de alimentación en los puntos más remotos de la mezcla de reacción en el periodo de tiempo durante el cual la concentración de la solución de alimentación en los puntos distantes caiga al nivel admisible, y la concentración de los componentes de bajo peso molecular que inhiben la síntesis no exceda este nivel.

Con los dispositivos trabajando en el modo en el que la solución de alimentación o bien/y los componentes de alto peso molecular se desplazan directamente hacia el reactor a través de al menos una entrada, resulta preferible utilizar una mezcla adicional en el reactor. Dicha mezcla puede efectuarse haciendo girar una barra de agitación magnética o bien mediante el traslado de la mezcla de reacción a través del bucle cerrado externo o bien siguiendo otros métodos.

Para los dispositivos en los cuales se forma una capa delgada de la mezcla de reacción, lo más preferible es un módulo con un separador entre las capas de las barreras porosas. Se puede usar un tipo de separador diferente y se puede seleccionar del grupo de una capa múltiple o individual, de los materiales capilares, de una combinación de capas de materiales capilares y partículas porosas, láminas de capas finas de materiales orgánicos, sintéticos o cerámicos, metales o sus composiciones y partículas porosas entre capas. Otro tipo de separadores pueden ser a base de fibras huecas. Los filtros ampliamente utilizados para la filtración y hechos de diferentes tipos de celulosa o materiales poliméricos sintéticos, metales y cerámica también se pueden usar como separadores. El papel de los materiales capilares en forma de capas no consiste únicamente en dividir dos barreras porosas, sino que en aumentar el área en la que se produce el enlace de las moléculas, lo que aumenta la velocidad de las reacciones conectadas con la síntesis (Alberts y cols., 1986).

Es más conveniente usar partículas porosas inmovilizadas dispuestas en la superficie de las estructuras capilares a capas. El diámetro de las fibras oscila entre 0,1 y 0,001 dependiendo del diámetro de las fibras huecas. Las partículas de material poroso entre 10 micras y 0,1 mm se disponen en capas sobre la superficie de las fibras. En el caso de utilizar fibras huecas como

la primera y segunda barrera porosa, las fibras de los materiales dispuestos en capas se acomodan o bien a lo largo de las fibras huecas ocupando el espacio entre ellas, o bien en un ángulo respecto a los ejes centrales de las fibras huecas sin exceder los 90 grados (es decir, a través de las capas de fibras huecas). Los materiales a partir de los cuales se pueden fabricar partículas porosas incluyen (Choi y cols., 1997): materiales poliméricos (celulosa, gelatina, colágeno), compuestos metálicos y óxidos inorgánicos (aluminio, sílice, titanio, zirconio, molibdeno, vanadio, cobalto) y varias zeolitas. Las partículas porosas se pueden utilizar como gránulos (Ovodov y cols., 1995) sobre la base de los polisacáridos cargados negativamente y los polímeros cargados positivamente que forman complejos de polielectrolitos con polisacáridos. Dichos complejos pueden estar formados, por ejemplo, por el alginato sódico y la poli-L-lisina, el alginato sódico y el quitosano, la pectina y la poliimina, la pectina y el quitosano. Los materiales de los que están hechos las partículas porosas pueden incluir los sorbentes usados en cromatografía, también se pueden usar sorbentes de afinidad para crear un medio poroso en un volumen de reacción y aislar el polipéptido de referencia del sistema de reacción después de la síntesis. La actividad química y la posibilidad de inhibir la síntesis se encuentra restringida para parte del material poroso.

Cuando un sistema libre de células es inmovilizado en gránulos (Ovodov y cols., 1995; Alakhov y cols., 1995), el diseño más preferible es el módulo reactor que permite disponer varias capas de micro gránulos con un sistema inmovilizado libre de células en la superficie de la primera barrera porosa de manera que llenen todo el reactor. En este caso se forma una capa bastante delgada de microgránulos determinada por la altura del reactor, que permite que la solución de alimentación llegue a la zona de síntesis y elimine los componentes de bajo y alto peso molecular a la velocidad óptima.

La fig. 2a-e muestra variantes de la formación de capas finas dentro del módulo del reactor cuando membranas semipermeables finas y fibras huecas o bien sus combinaciones se utilizan como barreras porosas.

La figura 2a muestra el caso de cuando las capas delgadas de la mezcla de reacción se forman entre la superficie plana de la membrana 120 y las superficies cilíndricas de las fibras huecas que tienen el papel de la primera barrera 110 y tiene la forma de al menos una capa de fibras huecas paralelas. La cantidad de fibras huecas depende del tamaño de corte de la primera y segunda barreras así como del diámetro de las fibras huecas que determinan su área. Si el porcentaje de los tamaños de corte de la primera y segunda barreras oscila entre 3 y 10, el área de la primera barrera se situará entre 0,2 y 1,0 del de la segunda barrera.

La figura 2b muestra el caso de cuando la capa de reacción se forma entre dos capas de fibras huecas que funcionan como la primera barrera 110 y la segunda barrera 120. En cada capa las fibras huecas se colocan en paralelo unas a otras. Los ejes centrales de las fibras huecas colocados en diferentes capas son o bien paralelos o forman un ángulo de 70 grados a 110 grados. El cociente de la cantidad de fibras huecas en la primera capa respecto a la cantidad de fibras huecas en la segunda capa oscilará entre 1 y 0,1 dependiendo del cociente de los tamaños de corte. Resulta más preferible el diseño de este módulo cuando el vo-

lumen total de reactores se monta a partir de varios módulos. En este caso, los módulos se sitúan de tal manera que las capas de fibras huecas de la primera y segunda barreras se colocan de forma alternada, permitiendo con ello distribuir uniformemente los flujos de componentes de bajo y alto peso molecular a través del volumen total del reactor.

Cuando la síntesis se lleva a cabo con sistemas libres de células cuya eficacia es 2 a 4 veces superior al nivel conocido en 100-200 Mg (por ejemplo si se utiliza una mezcla de reacción concentrada), es necesario mejorar la entrada de la solución de alimentación al reactor y reducir la influencia del cierre de los poros de las membranas por los productos de la síntesis. Para garantizar la distribución uniforme de la solución de alimentación en todo el volumen de la mezcla de reacción y reducir el cierre del recorte, se emplea un módulo con tres barreras porosas. En este caso se utiliza una capa de fibras huecas paralelas unas a otras como la primera barrera porosa. Esta capa se coloca en la parte central del módulo entre dos barreras porosas, que funcionan como la segunda barrera porosa con un tamaño pequeño del recorte. En esta variante, la zona de la segunda barrera porosa se duplica, lo que influye positivamente en la eliminación de los productos de bajo peso molecular que inhiben la síntesis. Esto permite reducir la presión con la formación del flujo de los productos de bajo peso molecular reemplazables.

La figura 2c muestra un módulo de reactor en el cual la capa de reacción se coloca entre dos membranas planas con una capa de fibras huecas entre las últimas. Este diseño del módulo es más preferible cuando se forma una unidad de reactor a partir de varios módulos. En este caso las zonas para la eliminación de los componentes de bajo peso molecular se unen y el número y la longitud de comunicaciones líquidas se reduce.

La figura 2d muestra un diseño del módulo a partir de tres capas de fibras huecas. Las fibras huecas en cada capa se colocan en paralelo unas a otras. La capa central se coloca de manera que los ejes centrales de sus fibras huecas se encuentran en un ángulo de 70 a 110 grados respecto a los ejes centrales de las otras capas o son paralelos. Resulta preferible utilizar una distribución perpendicular de los ejes. En este caso, el área de contacto de las zonas entre las superficies de la primera, segunda y tercer capa de las fibras huecas se reduce si no se colocan rejillas o materiales de tipo poroso entre las capas. El cociente de la cantidad de fibras huecas en la primera y tercera capas respecto a la cantidad de fibras huecas en la segunda capa se acepta como de 1 a 0,1 dependiendo del cociente de los tamaños de corte de las fibras huecas.

En las versiones anteriores de los módulos de reactor la forma de las membranas de las láminas y las láminas que consisten en fibras huecas de una sola capa pueden ser cuadradas o redondas. Las figuras 2e y 2f muestran módulos de reactor que tienen la forma de cilindros en los cuales el volumen de reacción tiene la forma de (i) una hélice o bien (ii) un cilindro.

Una diferencia respecto a los diseños conocidos es la formación de una estructura de doble capa con diferentes tamaños y/o dimensiones de recorte y diámetros de las fibras huecas utilizadas. La figura 2e representa un módulo en el que el elemento central hecho de una fibra hueca tiene el papel de la primera barrera porosa con un recorte de hasta 100 kD. Se encuentra

revestido de material fibroso para impedir el contacto directo de la primera y de la segunda barrera porosa. Luego las fibras huecas de la segunda barrera porosa se colocan alrededor del elemento central. La cantidad de fibras huecas en la segunda barrera porosa y el área de su superficie no debería exceder los de la primera barrera en no más de 5 a 10 veces. Luego un haz de fibras huecas se coloca en una cubierta que tiene una entrada y salida para la mezcla de reacción y sus extremos están engomados tal como describe Yagihashi y cols. (1996), formando una salida para una barrera porosa por un lado de la cubierta cilíndrica y una salida para la otra barrera porosa desde el lado opuesto. La figura 2f muestra un diseño de dos capas en el cual se coloca material poroso o en capas entre las dos capas. Luego láminas preparadas de forma preliminar de sus estructuras de una sola capa que actúan como primera y segunda barrera se colocan dentro de la tapa cilíndrica con una entrada 151 al reactor. Las salidas internas de cada fibra hueca de la primera barrera se unen en una salida común 161 de una parte del cilindro, y las salidas internas de cada fibra hueca de la segunda barrera se unen en una salida común en la parte opuesta del cilindro.

La forma del módulo de reacción se elige dependiendo de las condiciones requeridas para lo siguiente: lavado de la zona de reacción, entrada accesible de la mezcla de reacción a la zona de reacción sin formación de zonas aéreas, mantenimiento de volúmenes mínimos en las zonas de entrada/retirada de la solución de alimentación y componentes de síntesis de bajo y alto peso molecular. Tiene una gran importancia la simplicidad del montaje y desmontaje del módulo para la limpieza de los recortes de membranas y las fibras huecas. Una estructura montada (cuando se utiliza al menos un módulo) se forma mediante la instalación de membranas, capas herméticas, cubiertas superiores e inferiores en la estructura del módulo. Resulta preferible que una barrera porosa se una al marco y la otra barrera sea reemplazable. Esto permitirá un fácil acceso a la zona de reacción y permitirá determinar los defectos de las membranas o fibras huecas que puedan aparecer durante el funcionamiento.

Resulta preferible utilizar materiales de moldeo que puedan realizar dos funciones, es decir, ser un soporte para las barreras porosas y sellar herméticamente las capas. Dichos materiales pueden ser materiales herméticos de silicona o bien otros materiales sintéticos con buena adherencia a los materiales poliméricos a partir de los cuales se fabrican la membrana y las fibras huecas. Las propiedades de estos materiales deberían proporcionar una restauración reiterada de la forma después de la eliminación del esfuerzo de la compresión.

Las barreras porosas pueden estar fabricadas de materiales diferentes. Sin embargo, los más preferibles son los que permiten la regeneración y purificación de poros una vez terminada la síntesis sin el desmontaje del reactor o bien en su desmontaje y posterior montaje. La limpieza de muchos tipos de membranas y fibras huecas se han descrito con detalle en los catálogos técnicos de las empresas (Operating Guide, 1997).

Los recortes de la primera barrera porosa 110 se eligen entre 30 y 300 kD. Para la mayoría de polipéptidos con un peso molecular de 20 a 40 kD es más preferible utilizar cortes de 50-100 kD. Los recortes

de la segunda barrera 120 se eligen entre 1 y 30 kD dependiendo del peso molecular de los polipéptidos sintetizados y de las condiciones del paso a través de esta barrera del flujo de componentes de bajo peso molecular. Para la síntesis de polipéptidos con un peso molecular de 20 a 40 kD, es preferible usar cortes de barrera 120 de 10 a 12 kD.

Las figuras 3-6 muestran ejemplos de los esquemas de dispositivos para diferentes tipos de funcionamiento.

El dispositivo más simple para la síntesis de polipéptidos (figura 3) usa un modo sin eliminar los componentes de alto peso molecular de la mezcla de reacción. Consiste en al menos un módulo de reacción 100, una bomba 312 y una instalación para la solución de alimentación 315 y un compartimiento de residuos 316 para los componentes de peso molecular bajo. La mezcla de reacción entra en el reactor a través de la entrada 151. A través de la bomba 312 la solución de alimentación pasa por la entrada 161 y la primera barrera 110 a la mezcla de reacción. Los componentes de bajo peso molecular que inhiben el funcionamiento del sistema son eliminados del reactor a través de una segunda barrera porosa 120 y de la salida 142 y llegan al compartimiento de residuos 316.

En otro ejemplo cuando el que realiza el experimento elige un modo de retirada continua del producto, los flujos se distribuyen del modo siguiente. En la primera etapa se realiza la instalación del sistema para la síntesis de polipéptidos (Fig. 4) utilizando el reactor 100 que consiste en al menos un módulo de reacción con dos barreras porosas, las bombas 312 y 314, unas instalaciones para el almacenamiento de la solución de alimentación 315, una fracción de residuos 316 y una fracción 317 con peso molecular elevado (con el polipéptido de referencia). El dispositivo trabaja del modo siguiente. La mezcla de reacción entra en la zona de reacción del módulo a través de la entrada de comunicación del líquido 150, la solución de alimentación de la instalación 315 pasa a la siguiente entrada 151 de este módulo a través de comunicaciones líquidas 210 y de la bomba 312 y se distribuye por todo el volumen del reactor, desplazando así los productos de síntesis.

Los productos de síntesis de alto peso molecular, que incluyen los polipéptidos sintetizados, penetran a través de la primera barrera porosa 110 y son eliminados del reactor a través de la bomba 314 a una velocidad determinada. Debido a la presión creada por la bomba 312 los componentes de bajo peso molecular son eliminados a través de la segunda barrera porosa 120 y la salida 142, que está conectada directamente al compartimiento de residuos 316. El tamaño del recorte de la primera y de la segunda barrera porosa así como la velocidad de las bombas depende de las condiciones de la síntesis. El diseño del módulo utilizado para este modo requiere la presencia de al menos dos barreras porosas en forma de dos membranas planas (Fig. 1a) o bien dos capas de fibras huecas (Fig. 2b,e,f) o bien una combinación cuando una de las barreras es una membrana y la otra consiste en fibras huecas (Fig. 2a).

Cuando las condiciones de la síntesis requieren una entrada uniforme de la solución de alimentación en todos los puntos de la zona de reacción, se utiliza un dispositivo con módulos reactor formado por tres barreras porosas. Dicho dispositivo se muestra en la fig. 5. La mezcla de reacción entra en el reactor a

través de la entrada 151. El flujo de la solución de alimentación 210 entra en el reactor de la instalación 315 a través de las comunicaciones líquidas 230, entrada 142 y barrera porosa 121. El tipo de barrera porosa depende de las condiciones de la síntesis. Es más conveniente que la primera barrera 110 esté hecha de fibras huecas y las dos segundas barreras 121 y 122 estén formadas por membranas lisas o fibras huecas. A través de la barrera porosa 121, la solución de alimentación penetra en el reactor sobre la capa fina de la mezcla de reacción debido a la presión negativa en la segunda parte de la barrera porosa 122. La presión negativa es creada por la bomba 312 cuya entrada está conectada a la salida 143 conectada con las superficies internas de la segunda barrera porosa 122. La salida de la bomba 312 está conectada al compartimiento de residuos 316 para los componentes de bajo peso molecular. Los componentes de alto peso molecular de los productos son eliminados a través de la primera barrera 110 que está hecha de fibras huecas colocadas a intervalos regulares sobre la fina capa de la mezcla de reacción. La parte interna de las fibras huecas se incorpora a una salida común 161, que está conectada a la entrada de la bomba 314, cuyas salidas están conectadas al colector 317 para los componentes de alto peso molecular.

Cuando es preciso llevar a cabo una síntesis preparatoria y el volumen de la mezcla de reacción oscila entre 1 ml y 500 ml, se utiliza una conexión en paralelo de N módulos de reacción. El esquema de un dispositivo que utiliza una conexión en paralelo de N módulos se muestra en la figura 6. Este ejemplo se basa en la eliminación periódica del producto cuando los componentes de elevado peso molecular de los productos de referencia son eliminados periódicamente al final de cada ciclo con una limpieza automatizada simultánea de los poros de la primera y de la segunda barreras porosas. El reactor 100 se llena de la mezcla de reacción a través de la entrada 151. En la situación inicial, las válvulas V3 y V4 están abiertas mientras que las válvulas V1 y V2 están cerradas. En la primera etapa de un ciclo la solución de alimentación se desplaza de la instalación 315 a través de la bomba 312 y de la válvula V3 de forma simultánea a todas las entradas N 161.

Luego la solución de alimentación pasa a través de las aberturas internas de las fibras huecas o a través de la superficie interna de la membrana por la cual se forma la primera barrera porosa 110. A través de los poros de la primera barrera porosa 110 la solución de alimentación penetra fácilmente en el volumen con el sistema de reacción. Los componentes de bajo peso molecular de la síntesis oasa a través de la segunda barrera porosa 120 con un pequeño corte y son retirados a través de las salidas N 142 y de la válvula abierta V4 a un compartimiento de residuos 316 para componentes de bajo peso molecular. Al terminar la primera etapa de un ciclo y al comienzo de la segunda etapa las válvulas V3 y V4 se cierran y las válvulas V1 y V2 se abren. La bomba 313 crea una presión negativa en el canal conectado a la válvula V2. Bajo una presión negativa, los componentes de síntesis de elevado peso molecular que incluyen los polipéptidos de referencia abandonan el reactor a través de la primera barrera 110 y llegan al colector 317 a través de la salida 161, de la válvula V2 y de la bomba 313. Al mismo tiempo, la solución de alimentación llega al reactor de la instalación 315, a la entrada 141 y a la

segunda barrera 120 bajo la acción de la presión negativa creada por la bomba 313. El flujo de la solución de alimentación a través de la segunda barrera porosa 120 en la segunda etapa del ciclo tiene una dirección diferente que el de los componentes de bajo peso molecular formados en la primera etapa de los ciclos. Por lo tanto los poros de la segunda barrera 120 que podrían estar cerrados en la primera etapa de un ciclo se abren durante la segunda etapa del ciclo y se restaura la resistencia hidráulica de la segunda barrera 120. Una vez terminada la segunda etapa de un ciclo se forma su primera etapa. Se interrumpe el flujo de los componentes de alto peso molecular a través de la primera barrera porosa 110. En la primera etapa de un ciclo el flujo a través de la primera barrera porosa cambia su dirección y los poros de la primera barrera 110 que podrían estar cerrados en la segunda etapa de un ciclo por los componentes de elevado peso molecular se abren y se restaura la resistencia hidráulica de la primera barrera 110. Un ciclo termina con el extremo de la segunda etapa, y el dispositivo de control regula la conexión de las válvulas impulsando la formación de la primera etapa del ciclo. El cociente del volumen de la solución de alimentación que entra al reactor y el volumen de la fracción de componentes de alto peso molecular eliminados del reactor se modifica alterando los cocientes temporales de los tiempos de la primera y segunda etapas de un ciclo y modificando su duración total.

Se sabe (Kim y cols., 1996) que aumentando la concentración del lisado es posible incrementar el rendimiento de polipéptidos sintetizados. Los datos mencionados en el citado modelo se refieren a una reacción tipo lote, cuando los productos que inhiben el sistema libre de células no son eliminados de la mezcla de reacción. Esto reduce el rendimiento del producto sintetizado. Es posible elevar el rendimiento de los polipéptidos eliminando los componentes de los productos de peso molecular bajo del reactor y aportando componentes de alto peso molecular que pierden su actividad durante la síntesis. Los experimentos han demostrado que al eliminar los componentes de los productos de alto y bajo peso molecular del reactor es posible añadir al reactor no solo la solución de alimentación, sino que también componentes del lisado como una fracción de ribosomas, extractos (S30, S100 y otros), polimerasas (T7, T5, SP6 y otros), plásmidos, tRNA, enzimas o sus combinaciones.

La estructura propuesta de un módulo de reactor permite añadir la solución de alimentación y los componentes del lisado al reactor del modo siguiente: (a) todo el volumen de los componentes del lisado pasa a través de la entrada del reactor junto con todo el volumen de la solución de alimentación o bien parte del mismo; (f) los componentes más grandes del lisado (ribosomas y otros) y parte de la solución de alimentación entran en la zona de reacción mientras que los componentes pequeños del lisado y parte de la solución de alimentación entran en la zona de reacción a través de los poros de al menos una barrera. Como un ejemplo de ello la figura 5 muestra el caso en el que la bomba 314 puede suministrar componentes de alto peso molecular de lisado de la instalación 318, de forma regulada por el controlador.

Los módulos del reactor están termostatados entre 20°C y 40°C (el margen corriente es de 25°C a 37°C). Es preferible que la temperatura de la solución de alimentación se encuentre entre +2 y +7°C.

Las bombas se accionan manualmente o son controladas por el bloque regulador 400. Este bloque debería proporcionar los modos de funcionamiento. Los sistemas automatizados a base de ordenadores desarrollados por Roche Diagnostic Boehringer Mannheim han demostrado ser muy eficaces (Simonenko, 1998). El bloque controlador permite ajustar la duración de los ciclos y el cociente de dos etapas en un ciclo.

En la instalación, por ejemplo, de las galgas de presión es posible establecer el cambio de la presión en los circuitos de líquido mediante el cierre del recorte y de esta forma modificar las condiciones del proceso a su debido tiempo.

El método propuesto de ramificación del flujo proporciona la síntesis de polipéptidos en un extracto procariótico y eucariótico con elevada velocidad durante una serie de horas eliminando los productos activos desde el punto de vista funcional. Como ejemplo de ello se muestra la síntesis del GFP fibroso. La síntesis se llevaba a cabo con la ayuda de un dispositivo cuyo diagrama de bloque se muestra en la fig. 4. La membrana de ultrafiltración con el corte de 50 kD a 10 kD se utilizaban como la primera y segunda barreras porosas en el módulo reactor. El volumen de la zona de reacción era de 400 μ l.

En el ejemplo dado, se utiliza el método de síntesis preparatoria de polipéptidos en el sistema conjugado de transcripción/traslación (Baranov y cols., 1989). Se realiza una estimación más frecuente de la eficacia de los sistemas libres de células al medir la cantidad de aminoácido radiactivo contenida en los polipéptidos sintetizados (Alakhov y cols., 1991). Como un método alternativo, se emplean las propiedades específicas de los polipéptidos como la fluorescencia (Kolb y cols., 1996; Cramer y cols., 1996).

El extracto S30 de *E. coli* se prepara según un método modificado (Zubay, 1973) del modo siguiente.

Las células de *E. coli* A 19 crecen hasta una densidad óptica del cultivo - 0,8 a una longitud de onda a 582 nm. Las células se recogen por centrifugación. La biomasa obtenida se lava dos veces y se resuspende en tampón A: Tris- Ac 10 mM pH 8,2, Mg(OAc)₂ 14 mM, KCl 60 mM, ditiotretitol 1 mM por centrifugación durante 30 minutos a 10.000 g. La biomasa lavada se vuelve a suspender en tampón A con el cociente de 4 volúmenes de tampón respecto a 1 volumen de células. La suspensión obtenida es destruida por la prensa francesa a una caída de presión de 1600 bars. La destrucción se realiza a +4°C. Los inhibidores de proteasa de tipo comercial en concentraciones recomendadas por sus fabricantes se añadirán al extracto celular obtenido, y la mezcla se centrifugará durante 30 min a 30.000 g. Eliminando la agitación, se recogen 2/3 del volumen sobrenadante. El volumen recogido se centrifuga de nuevo durante 30 minutos a 30.000 g. Eliminando la agitación se recogen 2/3 del volumen sobrenadante. Todos los procedimientos se llevan a cabo a +40°C. Tampón B que contiene Tris-Ac 750 mM pH 8,2, Mg(OAc)₂ 21 mM, ditiotretitol 7,5 mM, ATP 6 mM, acetilfosfato 500 mM, 500 μ M de cada uno de los 20 aminoácidos. La solución obtenida se incubaba a 37°C durante 80 minutos. Terminada la incubación, el extracto se dializa frente a tampón C: Tris-Ac 10 mM pH 8,2, Mg(OAc)₂ 14 mM, KOAc 60 mM, ditiotretitol 0,5 mM durante 16 horas. La diálisis se lleva a cabo a +4°C en 500 veces el volumen de tampón C con dos cambios. Terminada la diálisis el volumen resul-

tante se centrifugará durante 30 minutos a 10.000 g, se distribuirá en partes alícuotas y se congelará en nitrógeno líquido para un posterior almacenamiento a -70°C.

El sistema acoplado de transcripción/traslación se prepara del modo siguiente.

1 ml de la mezcla de reacción contiene 200-400 μ l de extracto S30 de *E. coli*, 0,1-0,5 mg del tRNA total de *E. coli*, 0,01-0,03 del ADN superhelicoidal plásmido, 2000-3000 U de ARN dependiente de ADN de la polimerasa del bacteriófago T7, 10-50 U de inhibidor de ribonucleasa de placenta humana en tampón D: TES-KOH 50-100 mM, o bien MOPS-KOH 50-100 mM, o bien BES-KOH 50-100 mM pH 7,0-7,6. A la misma mezcla de reacción añadiremos compuestos de bajo peso molecular que contengan Mg(OAc)₂ 10-20 mM o bien MgCl₂, KOAc 120-230 mM o K-L-glutamato, ATP 1,0-2,0 mM, GTP 1,0-2,0 mM, CTP 0,8-1,5 mM, UTP 0,8-1,5 mM, acetilfosfato 25-40 mM, 40 μ g/ml de leucovorina, 1 mM de ditiotretitol, 4% de glicerol, 0,02% de NaN₃ y 150-250 μ M de cada uno de los 19 aminoácidos a excepción de uno con el cual se lleva a cabo la síntesis de control en una parte alícuota de un volumen establecido.

El sistema de transcripción/traslación preparado se divide en dos volúmenes distintos. El volumen más pequeño (30-50 μ l) se coloca en un microtubo y se añade el aminoácido que contiene una marca radiactiva. Luego se toman partes alícuotas de 5-10 μ l del microtubo para estimar la cinética de la síntesis en un volumen establecido. La cantidad de polipéptidos sintetizados se determina mediante la precipitación de la parte alícuota en un filtro de fibra de vidrio con ácido tricloroacético, con partículas irradiadas por los isótopos que se cuentan en un escintilador líquido. Luego se añade el aminoácido que falta en la concentración de 150-250 μ M al volumen restante y después de una ligera agitación se coloca en la célula de reacción. La síntesis se lleva a cabo a 26 hasta 37°C haciendo pasar la solución de alimentación a través de la mezcla de reacción al módulo del reactor.

La solución de alimentación se prepara del modo siguiente.

1 ml de la solución de alimentación contiene las siguientes sustancias de bajo peso molecular: Mg(OAc)₂ 10-20 mM o bien MgCl₂, KOAc 120-230 mM o K-L-glutamato, ATP 1,0-2,0 mM, GTP 1,0-2,0 mM, CTP 0,8-1,5 mM, UTP 0,8-1,5 mM, acetilfosfato 25-40 mM, 40 μ g/ml de leucovorina, 1 mM de ditiotretitol, 4% de glicerol, 0,02% de NaN₃ y 150-250 μ M de cada uno de los 20 aminoácidos en tampón D. El tampón D contiene TES-KOH 50-100 mM, o bien MOPS-KOH 50-100 mM, o bien BES-KOH 50-100 mM pH 7,0-7,6. A la misma solución añadiremos 200-400 μ l de tampón C que contiene Tris-Ac pH 8,2 10 mM, Mg(OAc)₂ 14 mM, KOAc 60 mM, ditiotretitol 0,5 mM.

Ejemplo 1

La transcripción/traslación acoplada de la proteína fluorescente verde (GFP) del celentéreo *Aequoria victoria* de un modelo de ADN que contiene un gen de GFP, en un sistema continuo libre de células de *E. coli*, con flujos ramificados.

Un ADN plásmido que contiene un gen mutante de GFP y secuencias de nucleótidos de un punto de enlace a ribosomas y un promotor de la polimerasa de ARN dependiente de ADN del bacteriófago T7 se utiliza como un patrón.

El sistema de transcripción/traslación acoplado se prepara del modo siguiente.

1 ml de la mezcla de reacción contiene 200-400 μ l de extracto S30 de *E. coli*, 0,1-0,5 ml de la preparación de tRNA total de *E. coli*, 0,01-0,03 del ADN superhelicoidal plásmido, 2000-3000 U de ARN dependiente de ADN de la polimerasa del bacteriófago T7, 10-50 U de inhibidor de ribonucleasa de placenta humana en tampón E (100 mM HEPES-KOH, pH 7,6). A la misma mezcla de reacción añadiremos compuestos de bajo peso molecular que contengan Mg(OAc)₂ 12 mM, KOAc 220 mM, ATP 1,2 mM, GTP 1,0 mM, CTP 0,8 mM, UTP 0,8 mM, acetilfosfato 30 mM, 40 μ g/ml de leucovorina, 1 mM de ditioneitol, 4% de glicerol, 0,02% de NaN₃ y 160 μ M de cada uno de los 19 aminoácidos a excepción de la leucina.

El sistema de transcripción/traslación preparado se divide en dos volúmenes desiguales. El volumen inferior (30-50 μ l) se coloca en un microtubo y (¹⁴C)-leucina con una radioactividad específica de 38 mCi/mmol y una concentración 100 μ M se añade al mismo. Luego partes alícuotas de 5-10 μ l son seleccionadas del microtubo para estimar la cinética de la síntesis en un volumen establecido. La cantidad de polipéptido sintetizado es determinada mediante la precipitación alícuota en el filtro de fibra de vidrio por el ácido tricloroacético con la posterior estimación de las partículas irradiadas en un contador de escintilación líquido. La leucina en una concentración 160 μ M se añadirá al volumen restante y tras una cuidadosa agitación la preparación se colocará en una cuba de reacción.

La síntesis se lleva a cabo a 26°C en la cuba de reacción. La solución de alimentación pasa a la cuba de reacción a una velocidad igual a su 1,5-2 volúmenes internos durante 1 hora. El producto es eliminado a una velocidad igual a 1/20-1/8 del volumen interno de la cuba durante 1 hora. Durante toda la síntesis se registra la fluorescencia específica del producto eliminado a través de una membrana con el recorte de 50 kD. La eficacia del sistema se calcula por la fluorescencia de todos los volúmenes reunidos. La figura 7 representa un histograma que muestra la cantidad de GFP en fracciones recogidas durante la síntesis. La cantidad de GFP en las fracciones se calcula por medio de la curva de calibración que se representa usando los datos de las mediciones de fluorescencia específicas de la preparación de GFP purificada frente a su concentración. La figura 8 muestra un diagrama de dependencia de un cambio en la concentración de GFP sintetizado durante el periodo de síntesis en una parte de control incubada en un volumen constante. La concentración se determina por la incorporación de aminoácido radiactivo al polipéptido. Además, el producto recién sintetizado es controlado registrando

la fluorescencia después de la electroforesis de todos los volúmenes juntos en gel de poliácridamida. La figura 9 muestra una foto de la electroforesis del gel con partes alícuotas seleccionadas a partir de fracciones recogidas durante la síntesis. Una preparación de GFP purificada se utilizará como control. La cantidad de proteína en capas es de 0,3 mg.

Una parte de 150-200 μ g de un producto activo funcionalmente se obtiene durante 48 horas por 1 ml del sistema de transcripción/traslación acoplado.

Ejemplo 2

La transcripción/traslación acoplada de la proteína verde fluorescente (GFP) del celentéreo *Aequoria victoria* de un modelo de ADN que contiene un gen de GFP, en un sistema continuo libre de células de *E. coli*, con un flujo.

Se obtiene el ADN y el sistema de transcripción/traslación se prepara tal como se ha descrito en el ejemplo 1. La síntesis se lleva a cabo usando un dispositivo cuyo diagrama de bloque se muestra en la figura 3. Las fibras huecas de 1 mm de diámetro y el tamaño de recorte de 100 kD se utilizaban como la primera barrera porosa en el módulo reactor. Una membrana de ultrafiltración con un tamaño de recorte de 10 kD y un área de 4 cm² se utilizaba como la segunda barrera porosa. El volumen del reactor era de 400 μ l.

El flujo de la solución de alimentación es aportado a la cuba de reacción a una velocidad igual a su 1,5-2 volúmenes internos durante 1 hora. El producto no se elimina.

La eficacia del sistema se estima a partir de la fluorescencia de la solución retirada al terminar la síntesis de la cuba de reacción con una determinación posterior de la cantidad de polipéptidos sintetizados. Luego se realiza la comparación con la eficacia de la síntesis de control en un volumen establecido. La figura 10 muestra un diagrama de dependencia de un cambio en la concentración del GFP sintetizado durante la síntesis en la parte alícuota de control incubada en un volumen constante. La concentración se determina incorporando aminoácidos radiactivos al polipéptido. Además el producto recién sintetizado se control registrando la fluorescencia después de la electroforesis de todos los volúmenes recogidos en gel de poliácridamida. La figura 11 representa una foto de la electroforesis en gel con partes alícuotas seleccionadas del sistema acoplado de transcripción /traslación en un volumen fijo y de la cuba de reacción una vez terminada la síntesis. Una preparación purificada de GFP se utilizará como control. La cantidad de proteína en capas es de 0,3 mg.

Durante la síntesis se obtienen 60 μ g de un producto funcionalmente activo durante 24 horas por 1 ml de sistema de transcripción/traslación acoplado.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener polipéptidos en un sistema de traslado libre de células por el cual se preparan la mezcla de reacción, la solución de alimentación y los componentes reemplazables de la fracción de alto peso molecular, se colocan al menos dos barreras porosas dentro del módulo del reactor, la mezcla de reacción se introduce en el volumen del reactor y se incuban en unas condiciones determinadas manteniendo la síntesis, el polipéptido de referencia se elimina de forma que los productos de síntesis se ramifican en una fracción de bajo peso molecular y una fracción que contiene componentes de alto peso molecular con el polipéptido de referencia, la fracción que contiene productos de alto peso molecular con el polipéptido de referencia se elimina a través de la primera barrera porosa que tiene unos tamaños de poro de hasta 100 kD, mientras que la fracción de bajo peso molecular con los componentes de la mezcla de reacción y los productos de síntesis es eliminada a través de cómo mínimo una parte de la segunda barrera porosa que tiene tamaños de poro de hasta 30 kD, se eligen el cociente del volumen de las fracciones de la solución de alimentación y de los componentes reemplazables respecto al volumen de la fracción que contiene el polipéptido de referencia, y se llevan a cabo los modos de suministro de la solución de alimentación y de los componentes reemplazables de las fracciones.

2. El método conforme a la reivindicación 1, donde la solución de alimentación pasa al volumen del reactor o bien (i) a través de la entrada del volumen del reactor, o bien (ii) a través de los poros de otra parte de la segunda barrera, o bien (iii) a través tanto de la entrada como de los poros.

3. El método conforme a la reivindicación 1, donde la fracción de componentes de alto peso molecular con el polipéptido de referencia se retira del reactor de forma continua o recurrente.

4. El método conforme a la reivindicación 1, donde la fracción de componentes reemplazables de alto peso molecular se añade a la mezcla de reacción o bien (i) antes de la síntesis, o bien (ii) una vez durante la síntesis, o bien (iii) de forma recurrente durante la síntesis, o bien (iv) se suministra de forma continua durante la síntesis.

5. El método conforme a la reivindicación 4 donde los componentes reemplazables de elevado peso molecular se eligen de (i) la fracción de ribosomas, (ii) de los extractos del sistema libre de células (S30, S100 y su modificación) o bien de (iii) las polimerasas, plásmidos, tRNAs que son suministrados al reactor mezclados con la solución de alimentación, elegidos por separado o en combinación con otros.

6. Los métodos conforme a la reivindicación 1 donde el cociente del volumen de la solución de alimentación, que entra al reactor, respecto al volumen de la fracción que contiene componentes de alto peso molecular con polipéptidos de referencia, que son eliminados de la mezcla de reacción, es de 1 a 100.

7. un método para obtener polipéptidos en un sistema de traslado libre de células por el cual se preparan la mezcla de reacción, la solución de alimentación y los componentes reemplazables de la fracción de alto peso molecular, se colocan al menos dos barreras porosas dentro del módulo del reactor, la primera barrera porosa tiene tamaños de poro de hasta 100 kD y la segunda barrera porosa tiene tamaños de

poro de hasta 30 kD, la mezcla de reacción se introduce en el volumen del reactor y se incuban en unas condiciones determinadas manteniendo la síntesis, el polipéptido de referencia se elimina de forma que durante la síntesis se forman N ciclos, cada uno de los cuales consta al menos de dos etapas, en la primera etapa componentes de bajo peso molecular de la solución de alimentación son suministrados al reactor a través de la primera barrera porosa y la fracción de bajo peso molecular con productos de síntesis y componentes de la mezcla de reacción se elimina a través de la segunda barrera porosa, en la segunda etapa se conectan los canales de suministro y eliminación y los componentes de bajo peso molecular de la solución de alimentación son suministrados a través de la segunda barrera porosa, la fracción de bajo peso molecular y la fracción de alto peso molecular que contiene los productos de síntesis y los componentes de la mezcla de reacción son eliminados a través de la primera barrera porosa, se realiza el tipo de suministro de la fracción de la solución de alimentación y los componentes reemplazables de alto peso molecular.

8. El método conforme a la reivindicación 7 donde en la configuración en la que se elimina el polipéptido de referencia el cociente del volumen de la solución de alimentación que entra al reactor durante N ciclos respecto al volumen que incluye el polipéptido de referencia eliminado de la mezcla de reacción es de 2 a 100.

9. El método conforme a la reivindicación 7 donde la fracción de componentes de alto peso molecular reemplazables se añade a la mezcla de reacción o bien (i) antes de la síntesis, o bien (ii) una vez durante la síntesis, o bien (iii) de forma recurrente durante la síntesis, o (iv) se suministra de forma continua durante la síntesis.

10. El método conforme a la reivindicación 7 donde los componentes reemplazables de elevado peso molecular se eligen de (i) la fracción de ribosomas, (ii) de los extractos del sistema libre de células (S30, S100 y su modificación) o bien de (iii) las polimerasas, plásmidos, tRNAs que son suministrados al reactor mezclados con la solución de alimentación, elegidos por separado o en combinación con otros.

11. El método conforme a la reivindicación 7 donde la duración de la primera y segunda etapas en cada uno de los ciclos N se ajusta dependiendo de las condiciones de la síntesis y de los cambios en sus parámetros.

12. Un dispositivo para la síntesis de polipéptidos en un sistema de traslación libre de células que contiene al menos un módulo de reactor que incluye un volumen de reactor que tiene una entrada y una salida para los circuitos de líquido de tinción y que incluye al menos dos barreras porosas, la primera barrera porosa tiene tamaños de poro de hasta 100 kD y la segunda barrera porosa tiene tamaños de poro de hasta 30 kD, un sistema para el suministro de las diferentes fracciones de la solución de alimentación y de los componentes reemplazables de alto peso molecular, que consta de cómo mínimo una bomba, circuitos de líquido, compartimentos para la acumulación y el almacenamiento de productos o de la solución de alimentación, donde el reactor comprende al menos un volumen de reactor, cuya superficie externa entra en contacto con la superficie externa de la primera y segunda barrera porosa, la superficie interna de la segunda barrera porosa se conecta a la zona de entrada o

salida de flujos de bajo peso molecular, el lado interno de la primera barrera porosa se conecta a la zona de la entrada y salida de los flujos de bajo peso molecular que contienen componentes de alto peso molecular con el polipéptido de referencia.

13. El dispositivo conforme a la reivindicación 12, donde cada módulo de reactor tiene un volumen de 50 μ l a 10 ml y el grosor de la capa del reactor es de 30 μ m a 5 mm.

14. El dispositivo conforme a la reivindicación 12 donde cada volumen de reactor tiene la forma de (i) una lámina rectangular, una lámina cuadrada, o una lámina redonda, o (ii) una lámina plegada en un hélice o cilindro.

15. El dispositivo conforme a la reivindicación 12 donde el cociente del área de la superficie de la segunda barrera porosa respecto al área de la superficie de la primera barrera porosa es de 1 a 100.

16. El dispositivo conforme a la reivindicación 12 donde cada volumen de reactor contiene (i) la mezcla

de reacción, (ii) la mezcla de reacción con un agitador magnético, o bien (iii) la mezcla de reacción con un diluyente poroso, o (iv) la mezcla de reacción con gránulos porosos.

17. El dispositivo conforme a la reivindicación 16 donde cada diluyente está hecho de materiales porosos con tamaños de poro de 200 μ m a 10 nm, habiendo seleccionado estos materiales de (i) estructuras fibrosas en forma de haces o láminas, (ii) una composición de estructuras fibrosas con un revestimiento de partículas porosas, (iii) sorbentes de afinidad en forma de gránulos o una composición de estructuras fibrosas con un revestimiento de sorbentes de afinidad, y (iv) gránulos con componentes inmovilizados del sistema libre de células.

18. El dispositivo conforme a la reivindicación 12 donde la primera y segunda barreras porosas anteriormente mencionadas están hechas de membranas planas o bien de fibras huecas, o una barrera está hecha de una membrana y la otra barrera de fibras huecas.

25

30

35

40

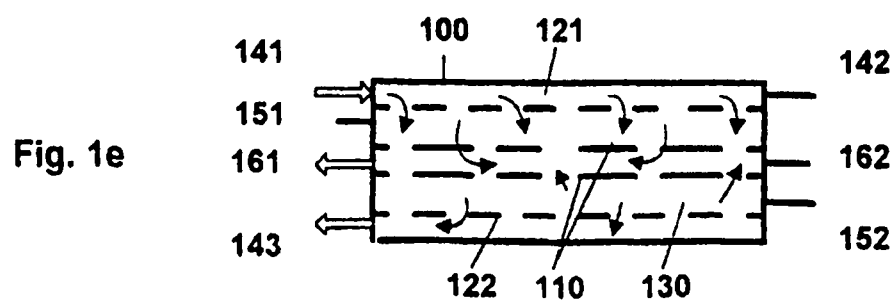
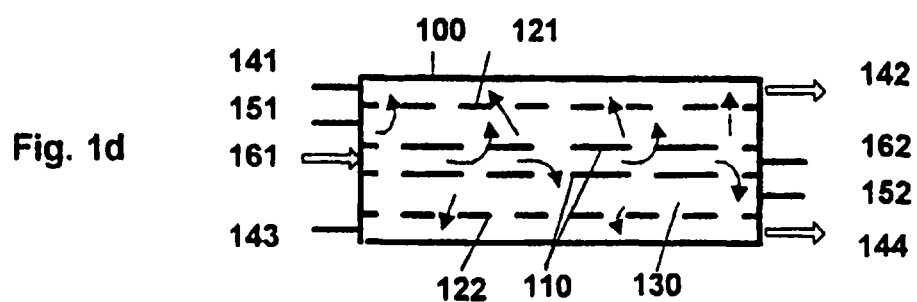
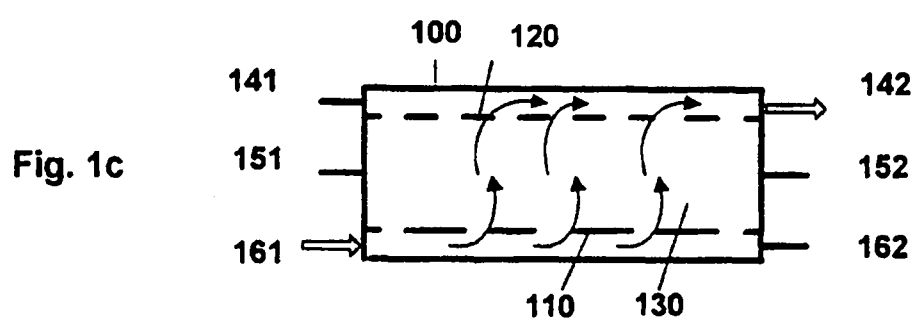
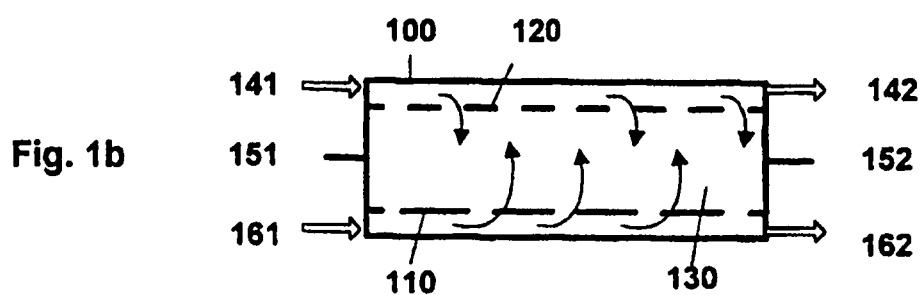
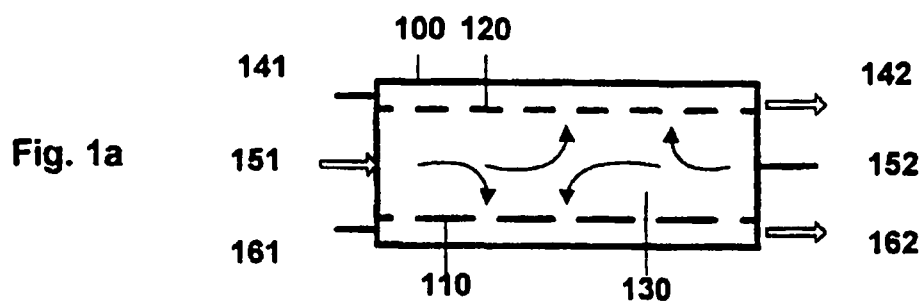
45

50

55

60

65



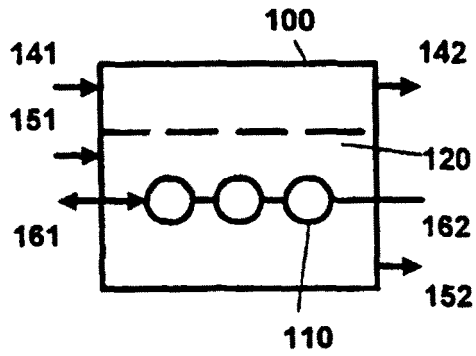


Fig. 2a

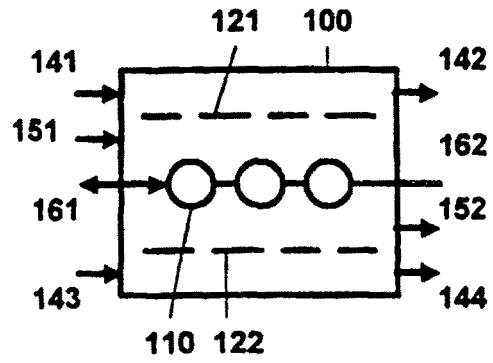


Fig. 2c

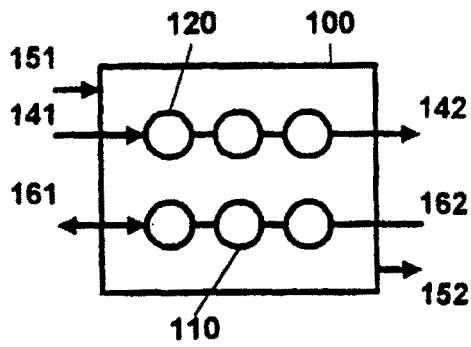


Fig. 2b

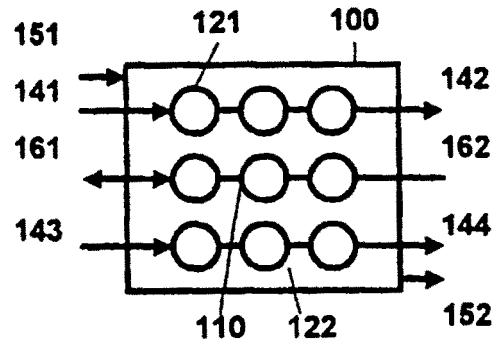


Fig. 2d

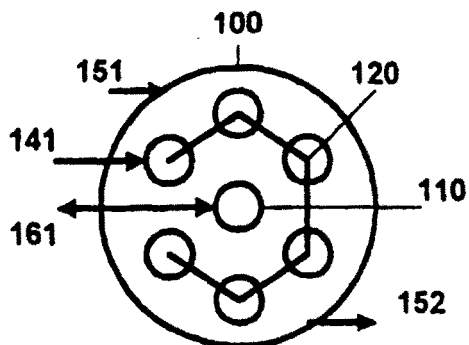


Fig. 2e

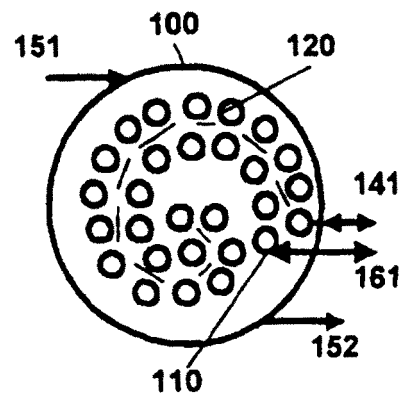


Fig. 2f

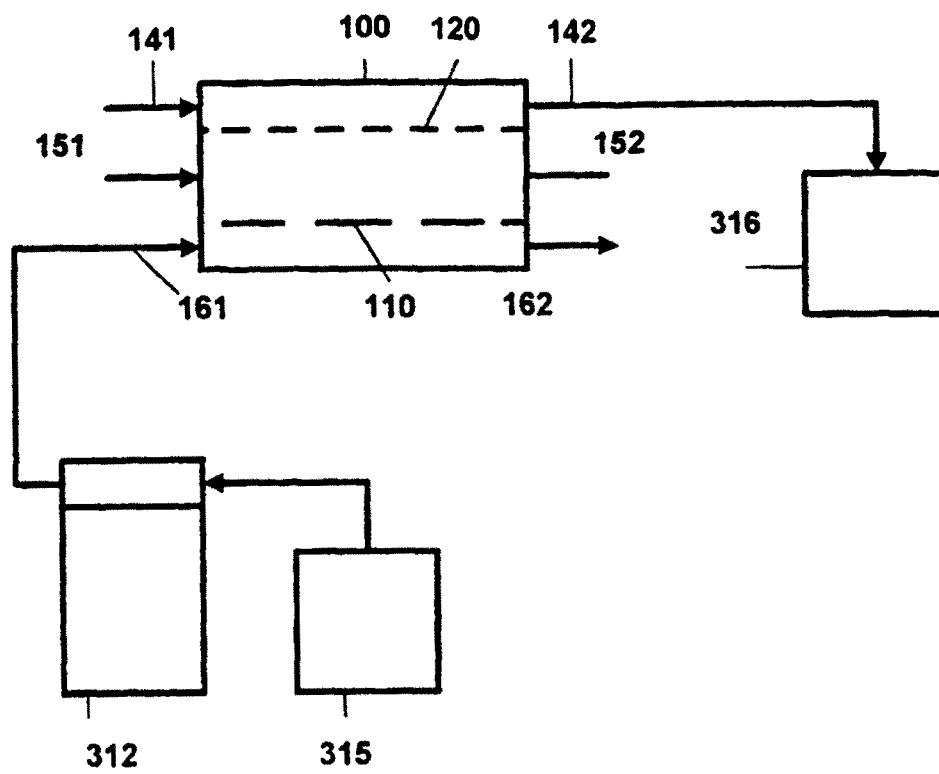


Fig. 3

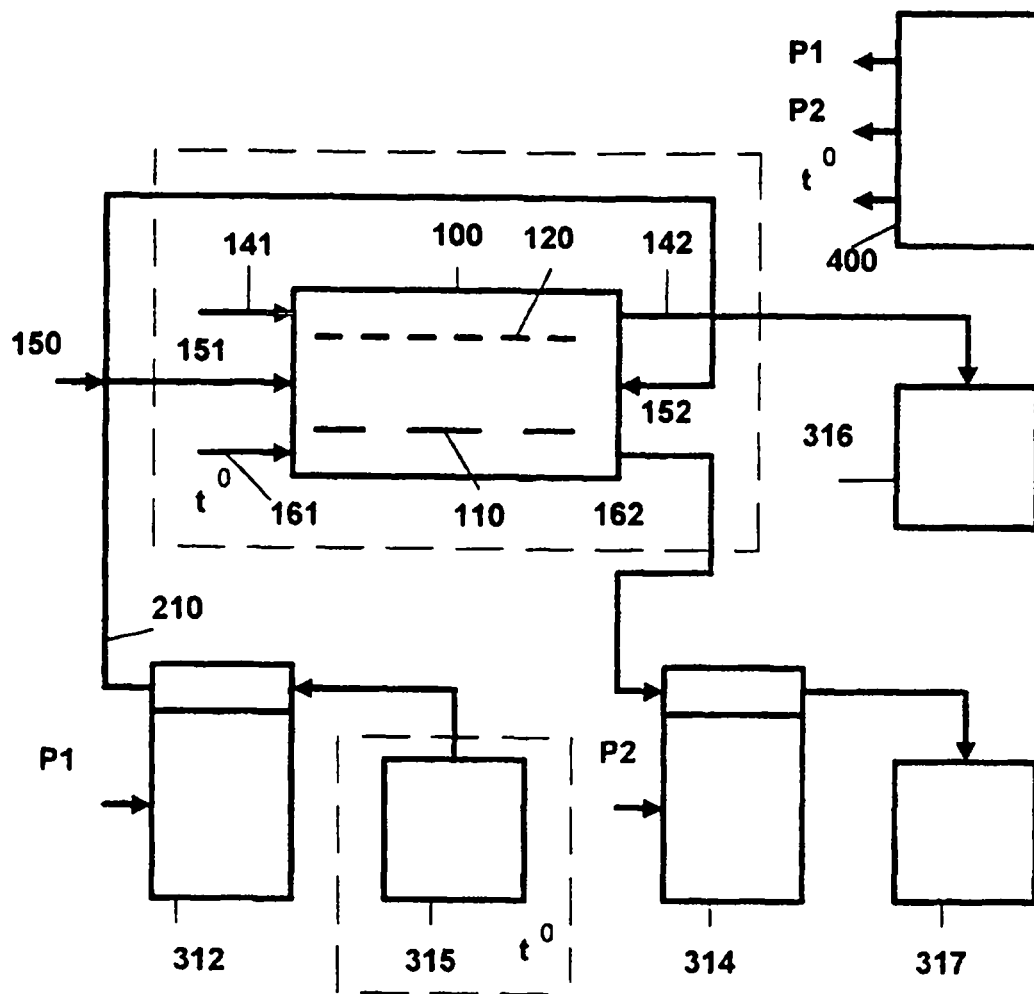


Fig. 4

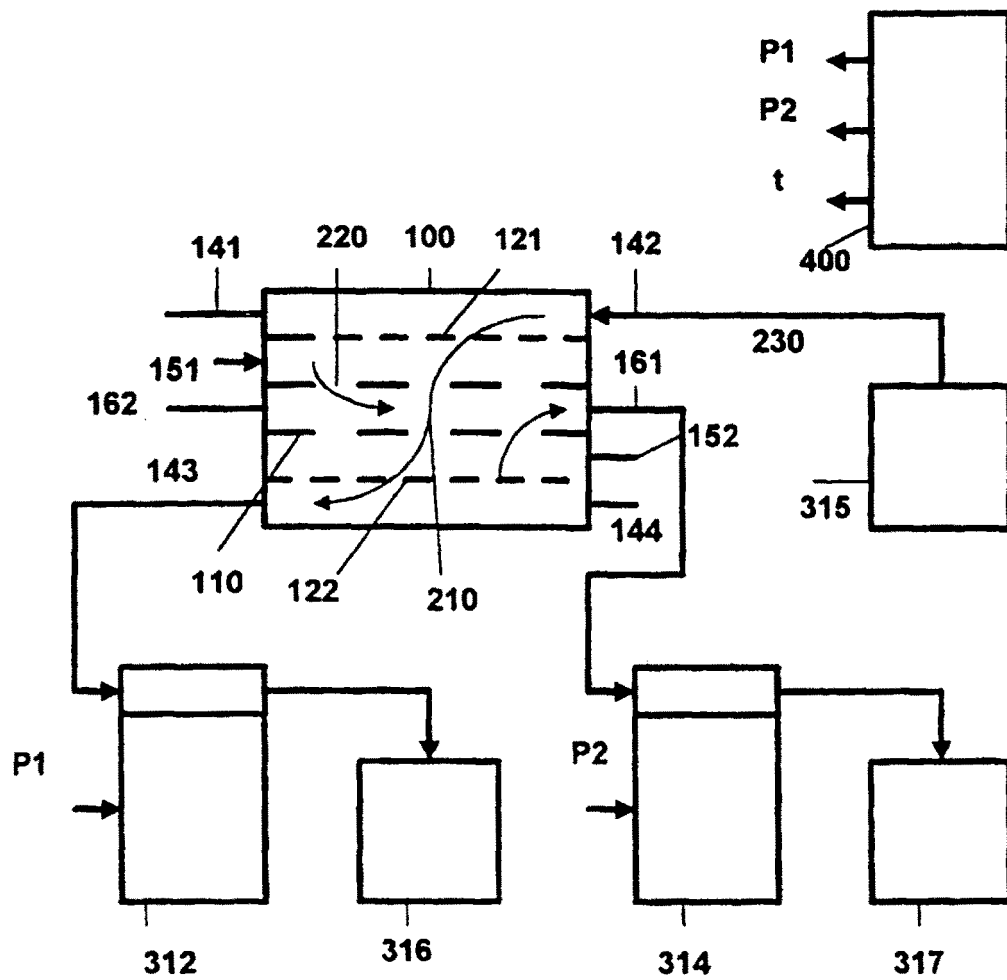


Fig. 5

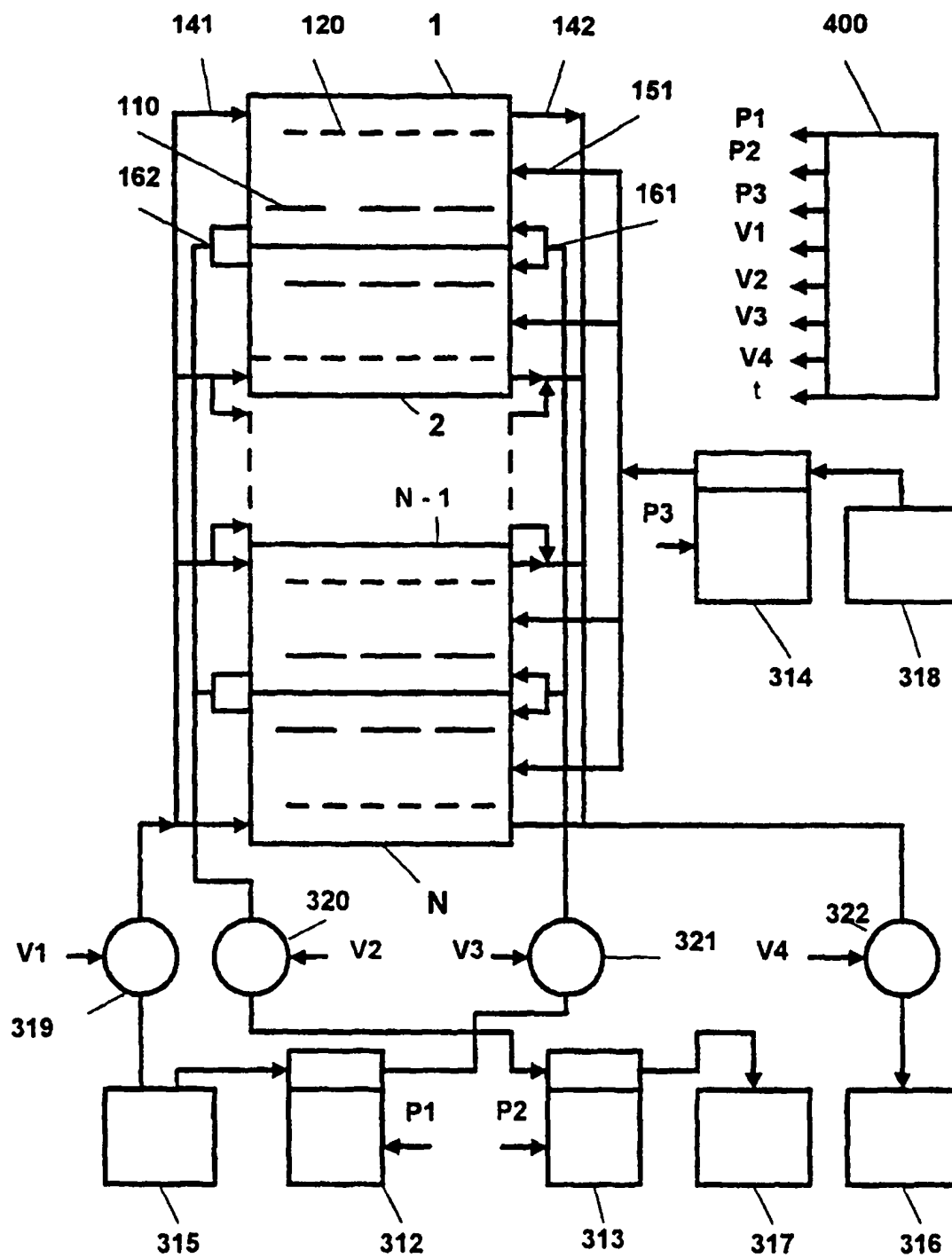


Fig. 6

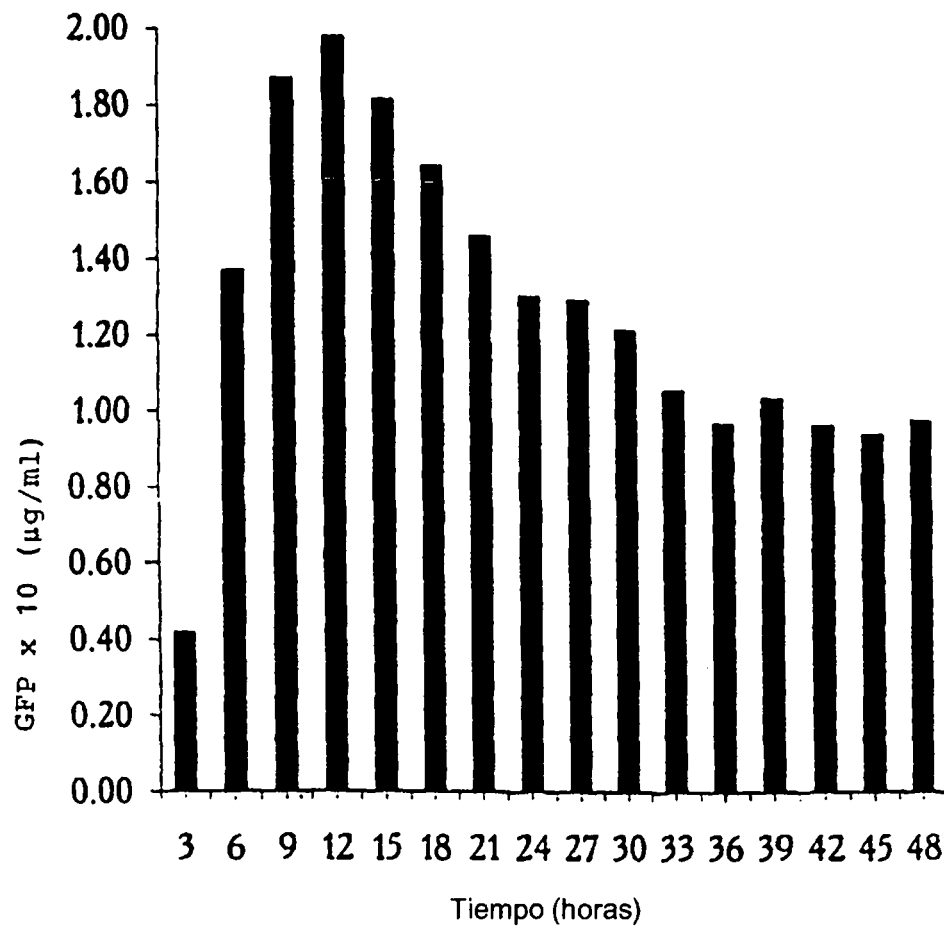


Figura 7

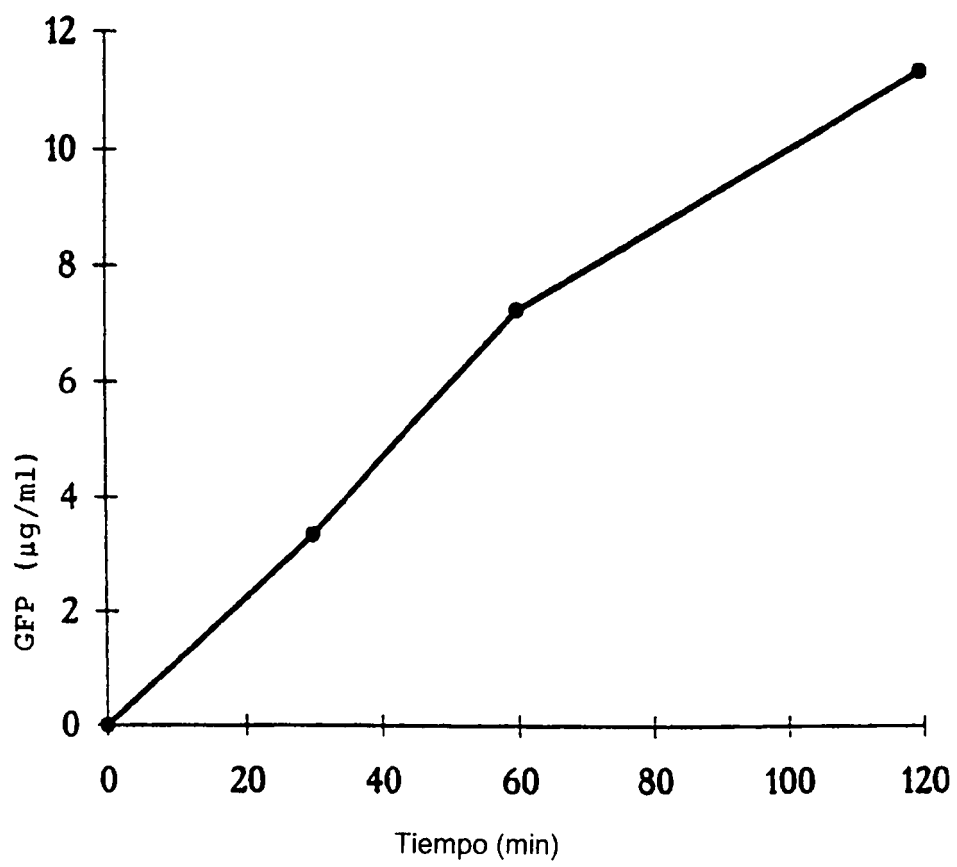


Figura 8

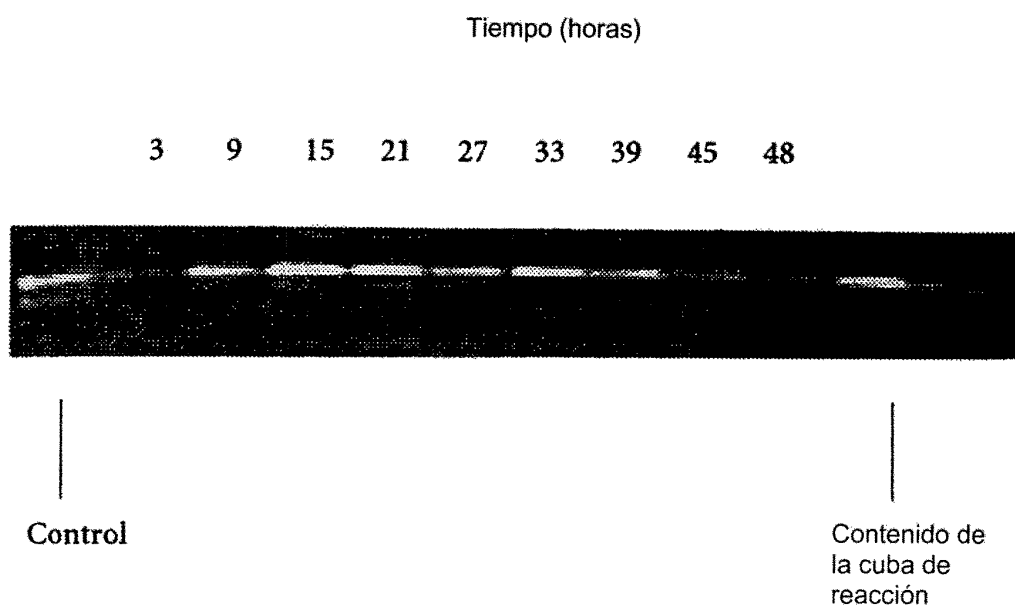


Fig. 9

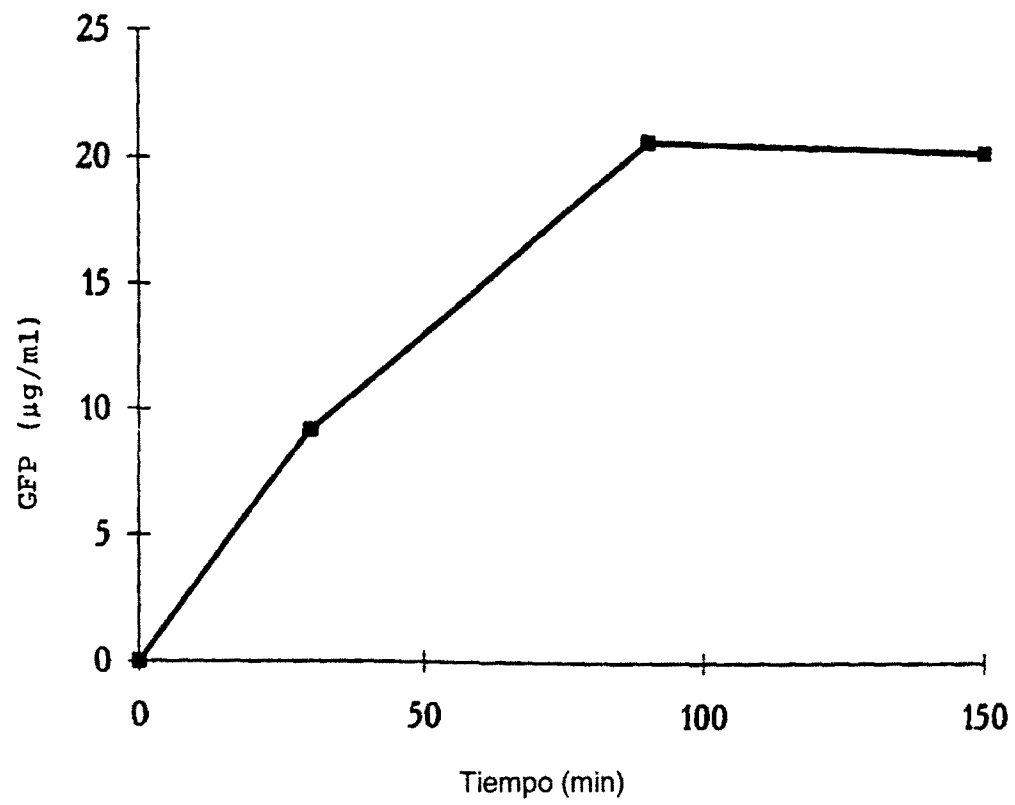


Figura 10

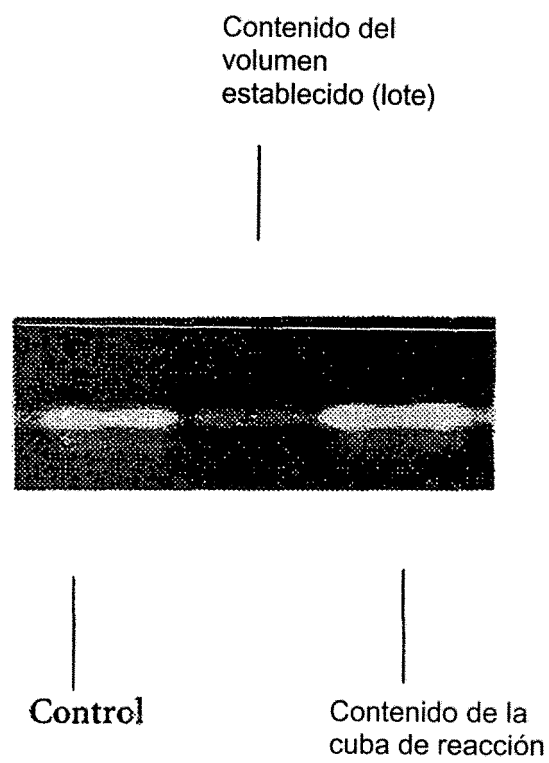


Fig. 11