



(11) *Número de Publicação:* PT 755438 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N001/38 A C12P021/02 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1995.04.27	(73) <i>Titular(es):</i> AMGEN, INC. PATENT OPERATIONS, ONE AMGEN C. DRIVE, M/S 27-4-A THOUSAND OAKS, CA 91320-1789 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1994.04.28 US 235573	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.01.29	(72) <i>Inventor(es):</i> CRAIG ERIC CURLESS US JEFFREY BURKE BACLASKI US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.02.14	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* MÉTEDO PARA REGULAR A PRECIPITAÇÃO DE METALOFOSFATOS EM FERMENTAÇÕES COM ALTA DENSIDADE CELULAR

(57) *Resumo:*

MÉTEDO PARA REGULAR A PRECIPITAÇÃO DE METALOFOSFATOS EM FERMENTAÇÃO COM ALTA DENSIDADE CELULAR





FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 755.438 (11)		N.º Objectos <input type="checkbox"/> N.º Desenhos <input type="checkbox"/>		DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)	

REQUERENTE (1) **Amgen Inc., norte-americana, industrial, com sede em One Amgen**
 (NOME E MORADA)
Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799, Estados Unidos da América

CODIGO POSTAL _____

INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72)
CURLLESS, CRAIG, ERIC e BACLASKI, JEFFREY, BURKE

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO

FIGURA (para interpretação do resumo)

EPÍGRAFE (54)
"MÉTODO PARA REGULAR A PRECIPITAÇÃO DE METALOFOSFATOS EM FERMENTAÇÕES COM ALTA DENSIDADE CELULAR"

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

A invenção descreve a utilização de um vidro de fosfato, enquanto fonte de fósforo, nos meios utilizados nos processos de fermentação bacteriana de elevada densidade celular para a redução das reacções de precipitação dos metalofosfatos. Os métodos da invenção demonstram um método prático para regular os níveis de precipitação de metalofosfatos nos meios nutriente e no fermentador, daí resultando também um aumento das densidades celulares, sendo úteis em inúmeros processos de fermentação bacteriana de elevada densidade celular.

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

SISTEMA DE REGISTRO DE MARCA DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Descrição

“Método para regular a precipitação de metalofosfatos em fermentações com alta densidade celular”

A presente invenção diz respeito a um processo de fermentação bacteriana para a produção de proteínas recombinantes em que determinados nutrientes dos meios alimentares são verificados e ajustados por forma a regular a precipitação de metalofosfatos nesses meios. Em particular, a invenção diz respeito a um processo de fermentação com elevada densidade celular que compreende um método em que são utilizados determinados polifosfatos e/ou metalofosfatos nos meios para se eliminar a precipitação de nutrientes e para se fazer aumentar a densidade celular.

Os progressos da biologia molecular e a exploração dos procedimentos da tecnologia do ADN recombinante vieram fazer com que fosse possível produzir quantidades significativas de proteínas exógenas em determinados sistemas de células hospedeiras. As proteínas recombinantes são produzidas nos sistemas de células hospedeiras transfectando essas células hospedeiras com ADN codificador da proteína relevante e deixando depois crescer as células hospedeiras assim transfectadas em condições que permitam a expressão das novas proteínas recombinantes. É possível utilizar determinados sistemas de células hospedeiras bacterianas para a produção de grandes quantidades de proteínas recombinantes que normalmente se encontram em quantidades limitadas em fontes naturais.

O microrganismo procariota *Escherichia coli* é uma bactéria que foi já estudada exaustivamente. A bactéria *E. coli* é frequentemente escolhida para ser utilizada em sistemas

de células hospedeiras de expressão elevada, em parte porque as células de *E. coli* têm tendência para serem mais adequadas à produção de quantidades extremamente grandes de proteínas recombinantes. Os sistemas de células hospedeiras em que são utilizadas células hospedeiras eucarióticas e células hospedeiras de leveduras são geralmente incapazes de produzir proteínas recombinantes nas enormíssimas quantidades geradas nos sistemas de células hospedeiras de expressão elevada, tais como *E. coli*. Além disso, o desenvolvimento de processos de fermentação de elevada densidade celular teve como consequência o aumento da produtividade volumétrica de produtos recombinantes em *E. coli*. Yee e Blanch, 'Biotechnology and Bioengineering', 41:221-230 (1993).

Os processos de fermentação utilizados para produzir proteínas recombinantes em sistemas de células hospedeiras, tais como o sistema de *E. coli*, são praticados em reservatórios físicos finitos (isto é, fermentadores, reactores). Os depósitos agitados correspondem à geometria mais vulgar de fermentadores, embora estejam a ser desenvolvidos cada vez mais tipos de reservatórios com outras formas físicas. Os modos de exploração dos fermentadores podem ser classificados nas categorias seguintes: (1) funcionamento descontínuo (processo por lotes), (2) funcionamento contínuo ou (3) tipos diversos de funcionamentos semi-contínuos, tais como o processo combinado de enriquecimento faseado.

Consoante o modo de funcionamento e o sistema de células hospedeiras que se utiliza, assim terá de ser concebido um meio equilibrado e definido, por lotes e/ou combinado de enriquecimento faseado, que irá facilitar o crescimento das células e a expressão das proteínas recombinantes. O meio definido recebe a designação de "mínimo" se contiver apenas os nutrientes essenciais para o crescimento. No caso do sistema de *E. coli*, os meios mínimos contêm fontes de carbono, azoto, fósforo, magnésio e oligoelementos, tais como o ferro e o cálcio. Gunsalus e

Stanter, 'The Bacteria', Vol. 1, Capítulo 1 'Academic Press Inc., N.Y.' (1960). Na maior parte dos meios mínimos utiliza-se glicose como fonte de carbono, amónia como fonte de azoto e um ortofosfato (v.g. o PO₄) como fonte de fósforo. Os meios nutrientes ideais para o crescimento das células deveriam conter as quantidades exactas de cada nutriente que irá ser consumido durante o crescimento celular, por forma a que não houvesse acumulação de nutrientes até níveis inibitórios nem houvesse nenhuma falta de nutrientes para as células. Thompson *et al.*, 'Biotechnology and Bioengineering', 27:818-824 (1985). Foi já concebido um meio nutriente mínimo teoricamente equilibrado para *E. coli*, utilizável em balões agitados com baixa densidade celular (densidades celulares até 1,5 g de células (peso seco)/litro). Neidhardt *et al.*, 'Journal of Bacteriology', 119:736-747 (1974).

Para além da composição química dos meios, também devem ser ponderados cuidadosamente os efeitos de outros parâmetros ambientais tais como pH, tempo, temperatura da cultura e pressão parcial do oxigénio dissolvido. Por exemplo, o valor óptimo do pH para o crescimento em *E. coli* é pH = 7,0. Durante o processo de fermentação, o valor do pH dos meios pode alterar-se devido ao consumo de amónia ou devido à síntese de determinados produtos metabólicos dos microrganismos, v.g. ácido acético e ácido láctico. Uma vez que as alterações dos valores de pH podem ser desfavoráveis ao crescimento óptimo das células, é crucial manter o meio a um determinado valor de pH e isso pode ser conseguido por adição de ácidos e bases. É possível verificar o pH e outros parâmetros do processo manualmente ou por meio de dispositivos automáticos.

Nas fermentações de elevada densidade celular (isto é, aquelas em que são atingidas densidades celulares superiores a 20 g de células (peso seco)/litro) têm de ser utilizados meios concentrados. Os técnicos que executam fermentações de elevada densidade celular comprovaram

que ao trabalharem com meios nutrientes concentrados se formam precipitados quando a solução que contém o fosfato é misturada com a solução que contém os outros componentes nutrientes. Os precipitados que se formam nos meios nutrientes resultam da precipitação de ortofosfatos, designadamente NH_4MgPO_4 , $(\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ e metalofosfatos da forma $(\text{Me})_n(\text{PO}_4)_m$ (em que o símbolo Me representa Fe, Ca, Zn, Cu ou Co). Estes compostos são muito fracamente solúveis em água. Dean, John A., 'Lange's Handbook of Chemistry', 12ª edição, McGraw-Hill, Nova Iorque, páginas 7-12 (1979). A quantidade de precipitação pode variar em função do pH, da concentração da glicose e da concentração dos componentes dos meios.

A formação de precipitados pode originar diversos problemas no meio alimentar e no fermentador. Por exemplo, os precipitados no meio alimentar podem passar a constituir uma fonte não homogénea de nutrientes (devido à sedimentação dos precipitados nos vasos de alimentação ou nas condutas de alimentação) e podem fazer com que as células tenham carência de nutrientes críticos que já não sejam solúveis. Os precipitados também podem desgastar as bombas e os tubos de alimentação e possivelmente também podem entupir as condutas de alimentação.

No fermentador irá ter lugar uma precipitação se os meios não estiverem perfeitamente equilibrados para o crescimento das células. A precipitação no fermentador pode dar origem ao entupimento dos injectores de ar para o fermentador, dar origem a misturas não homogéneas (isto é, o precipitado sedimenta nos níveis mais baixos do fermentador) e podem reduzir a disponibilidade de nutrientes solúveis para as células. A concentração de nutrientes disponíveis para as células fica dependente da velocidade a que são perdidos os nutrientes devido à formação do precipitado, comparativamente com a velocidade de incorporação de nutrientes pelas células. Estes efeitos podem ser compensados pela adição automática de ácidos e bases

para regular o pH. Todas estas considerações reduzem a reprodutibilidade do processo de fermentação. Além disso, a presença de precipitados pode ter impacto sobre as operações de purificação das proteínas e obrigar à utilização de passos complementares do processo de purificação para se separar o precipitado do produto.

Sob o ponto de vista comercial, para que o processo de fermentação seja prático é necessário sustentar o problema da precipitação. Um caminho sugerido para evitar a precipitação dos nutrientes em meio mínimo é a adição de AEDT (o mesmo que EDTA) e de citrato para quelar os íons de metais nos meios nutrientes. Pirt, S.J., 'Principles of Microbe and Cell Cultivation', página 134 (1975). No entanto, a necessidade de se adicionar agentes quelantes não é desejável uma vez que tais agentes não são metabolizados. Em consequência, vão acumular-se ou vão fazer aumentar a osmolaridade do ambiente celular. Uma osmolaridade elevada tem um efeito prejudicial sobre o metabolismo celular. Gouesbet *et al.*, 'Journal of Bacteriology', 175:214-221 (1993). As concentrações elevadas de agentes quelantes também podem danificar as membranas das células. Ryan *et al.*, 'Biotechnology and Bioengineering', 37:430-444 (1991).

No pedido de patente de invenção alemã nº 290 212 A5 (depositado a 28 de Julho de 1998), Riesenber *et al.* descrevem um procedimento para a preparação de um meio mínimo com glicose, utilizável na fermentação de *E. coli* em cultura em grande escala para a obtenção de produtos de ADN recombinante. Os meios mínimos descritos por Riesenber *et al.* foram concebidos para superar os graves problemas de precipitação com que normalmente se depara ao trabalhar com tais meios. Os meios descritos no referido pedido de patente de invenção contêm ortofosfatos, enquanto fontes de fósforo, e não permitem eliminar completamente a precipitação de nutrientes; no entanto, sobre eles se afirma que apenas são responsáveis por uma perturbação diminuta devida à formação ligeira de precipitados.

Para além daquilo que se disse anteriormente, não é possível extrair nada da literatura respeitante à preparação de meios para fermentações de elevada densidade celular em que seja efectivamente resolvido o problema da precipitação de nutrientes. Continua a ser necessário que haja um método para reduzir a precipitação em meios para trabalhar por lotes e/ou com meios alimentares em que não ocorra nenhuma precipitação quando todos os componentes são misturados (misturados a valores neutros de pH para *E. coli*) e que garantam que não irá formar-se nenhum precipitado no fermentador durante o processo de transformação. A presente invenção proporciona tal método graças à utilização de um vidro de fosfato de sódio, como fonte de fósforo, nos meios nutrientes concentrados. Ao contrário dos métodos sugeridos nas obras anteriormente citadas, os métodos da presente invenção proporcionam a vantagem tripla seguinte: (1) permitem conceber meios concentrados e completamente equilibrados para trabalhar por lotes e/ou com meios alimentares sem nenhum precipitado; (2) podem ser metabolizados pelo microrganismo *E. coli*; e (3) permitem trabalhar com maiores densidades celulares e maiores velocidades de crescimento. Os métodos práticos da presente invenção são úteis em diversas fermentações bacterianas, em especial nos processos de fermentação de elevada densidade celular.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a um processo de fermentação bacteriana para a produção de proteínas recombinantes, em que determinados nutrientes dos meios alimentares são verificados e ajustados por forma a que seja controlada a precipitação dos metalofosfatos durante o processo. Em particular, a invenção diz respeito a um processo de fermentação de elevada densidade celular que compreende um método em que uma solução nutriente concentrada contém vidro de fosfato de sódio, enquanto fonte de fósforo. De forma surpreendente, este

738

método elimina a formação de precipitados nos meios e dá origem a maiores densidades celulares em condições convencionais.

De acordo com a presente invenção, esta proporciona um método para reduzir a precipitação num processo de fermentação bacteriana de elevada densidade celular para a produção de uma proteína recombinante, em que no processo de fermentação de elevada densidade celular são alcançadas densidades celulares superiores a 20 g de células (peso seco)/litro, compreendendo tal método a utilização de vidros de fosfato, enquanto fontes de fósforo, nos meios nutrientes durante a produção da referida proteína.

De acordo com outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um método para aumentar a densidade celular num processo de fermentação bacteriana de elevada densidade celular para a produção de uma proteína recombinante, em que no processo de fermentação de elevada densidade celular são alcançadas densidades celulares superiores a 20 g de células (peso seco)/litro, compreendendo tal método a utilização de vidros de fosfato, enquanto fontes de fósforo, nos meios nutrientes durante a produção da referida proteína.

De acordo com a presente invenção, esta proporciona também um método para reduzir a precipitação num processo de fermentação bacteriana de elevada densidade celular para a produção de uma proteína recombinante em *E. coli*, em que no processo de fermentação de elevada densidade celular são alcançadas densidades celulares superiores a 20 g de células (peso seco)/litro, compreendendo tal método a utilização de um vidro de fosfato, cujo comprimento da cadeia varia entre cerca de $n = 4$ e cerca de $n = 20$, enquanto fonte de fósforo, nos meios nutrientes durante a produção da referida proteína.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DOS DESENHOS

A figura 1 ilustra os perfis de densidades celulares da experiência C (●—●) e da experiência D (○—○), demonstrando que a utilização de vidro de fosfato, como fonte de fósforo, nos meios origina um aumento da densidade celular superior àquele que se consegue utilizando um ortofosfato, enquanto fonte de fósforo. Mediu-se a densidade celular utilizando um espectrofotômetro M35 de 'Perkin-Elmer' e traçou-se a curva DO_{600} em função do tempo.

DESCRIÇÃO MINUCIOSA

Os métodos segundo os quais determinados nutrientes dos meios alimentares são verificados e ajustados para se regular a precipitação de metalofosfatos durante o processo de fermentação são descritos mais minuciosamente no texto subsequente e são ilustrados pelos exemplos adiante apresentados. Esses exemplos demonstram que é possível utilizar fontes de fósforo alternativas nas fermentações de elevada densidade celular para se eliminar a precipitação de nutrientes. Os resultados obtidos foram surpreendentes, na medida em que as fermentações em lotes de elevada densidade celular e as fermentações de processo combinado de enriquecimento faseado, utilizando o fosfato de sódio vidrado, enquanto fonte de fósforo, nos meios concentrados para se trabalhar por lotes e/ou por processos combinados de enriquecimento faseado, foi possível eliminar a precipitação dos metalofosfatos nos meios e daí resultou um aumento das densidades celulares nas fermentações.

Nos processos de fermentação para a produção de proteínas recombinantes utilizar-se-á um modo operatório pertencente a uma das seguintes categorias: (1) funcionamento descontínuo (processo por lotes), (2) funcionamento contínuo e (3) funcionamento semi-contínuo (processo combinado de enriquecimento faseado). Um processo por lotes caracteriza-se pela inoculação

do meio de cultura estéril (meio que constitui o lote) com microrganismos no início do processo, desenvolvendo-se a cultura durante um período de reacção específico. Durante a cultura as concentrações de células, as concentrações de substratos (fonte de carbono, sais nutrientes, vitaminas, etc.) e as concentrações de produto vão variando. Uma boa mistura garante que não haverá diferenças locais significativas na composição ou na temperatura da mistura de reacção. A reacção é de tipo não estacionário e as células irão crescer até ter sido consumido o substrato limitativo do crescimento (geralmente a fonte de carbono).

● O funcionamento contínuo caracteriza-se pelo facto de se adicionar continuamente meio de cultura recente (meio alimentar) ao fermentador e os meios consumidos e as células serem retirados continuamente do fermentador à mesma velocidade. Em funcionamento contínuo, a velocidade de crescimento é determinada pela velocidade de adição do meio e o rendimento do crescimento é determinado pela concentração do substrato limitativo do crescimento (isto é, a fonte de carbono). Todas as variáveis de reacção e parâmetros de regulação se mantêm constantes ao longo do tempo e por tal motivo estabelece-se num fermentador um estado constante com o tempo, a que corresponde uma produtividade e uma produção constantes.

● O funcionamento semi-contínuo pode ser considerado como uma combinação do funcionamento por lotes e do funcionamento contínuo. A fermentação arranca como um processo por lotes e depois de o substrato limitativo do crescimento ter sido consumido, junta-se de uma determinada maneira um meio alimentar contínuo que contenha glicose e minerais (processo combinado de enriquecimento faseado). Dito por outras palavras, neste modo de funcionamento utiliza-se simultaneamente um meio que constitui o lote e um meio alimentar para se conseguir o crescimento das células e uma produção eficiente da proteína desejada. Não são acrescentadas nem retiradas nenhuma células durante o período de cultura e por tal motivo o fermentador

trabalha como se fosse por lotes se apenas pensarmos em termos de microrganismos. Embora a presente invenção possa ser utilizada segundo uma multiplicidade de processos, incluindo os anteriormente enumerados, uma utilização preferencial é aquela em que se pratica um processo combinado de enriquecimento faseado.

Em cada um dos processos referidos *supra*, o crescimento das células e a acumulação de produto podem ser verificados indirectamente, tirando partido da correlação entre a formação de metabolitos e algumas das outras variáveis, tais como o pH do meio, a densidade óptica, a cor e a acidez titulável. Por exemplo, a densidade óptica proporciona uma indicação da acumulação de partículas celulares insolúveis e pode ser verificada na própria corrente, utilizando um microdispositivo de determinação da DO acoplado a um dispositivo com mostrador ou a um registador, ou pode ser verificada à parte, por amostragem. São utilizadas as leituras de densidade óptica a 600 nanómetros (DO_{600}) como meio para se determinar o peso das células, em base seca.

As fermentações de elevada densidade celular são descritas geralmente como sendo processos cujos rendimentos são superiores a 20 g de células (peso seco)/litro ($DO_{600} > 30$). Em todos os processos de fermentação de elevada densidade celular se utiliza um meio nutriente concentrado que é doseado gradualmente para dentro do fermentador num processo “combinado de enriquecimento faseado”. É necessário um meio alimentar com nutrientes concentrados para os processos de elevada densidade celular para se minimizar a diluição dos conteúdos do fermentador durante a alimentação. É necessário um processo combinado de enriquecimento faseado uma vez que permite ao operador controlar o fornecimento da fonte de carbono, facto este que é importante pois se as células ficarem expostas a concentrações da fonte de carbono suficientemente elevadas para que se gerem elevadas densidades celulares, então as células

irão produzir tanto subproduto inibitório, o acetato, que o crescimento irá ser interrompido.

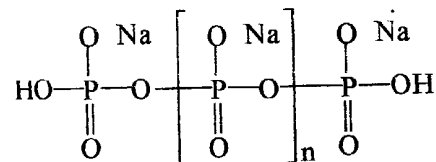
Majewski e Domach, 'Biotechnology and Bioengineering', 35: 732-738 (1990).

As condições de reacção convencionais para os processos de fermentação utilizados para a produção de proteínas recombinantes consistem geralmente em manter o valor do pH aproximadamente entre 5,0 e 8,0 e em trabalhar com temperaturas de cultura compreendidas entre 20°C e 50°C no caso de *E. coli*. Na presente invenção, num caso preferencial em que se utiliza o microrganismo *E. coli* como sistema hospedeiro, trabalhar-se-á com um valor óptimo de pH aproximadamente igual a 7,0 e com uma temperatura óptima de cultura aproximadamente igual a 37°C.

Os componentes nutrientes convencionais existentes nos meios, nestes processos de fermentação, compreendem geralmente fontes de energia, carbono, azoto, fósforo, magnésio e oligoelementos seleccionados entre ferro e cálcio. Além disso, os meios podem conter factores de crescimento (tais como vitaminas e aminoácidos), sais inorgânicos e ainda outros precursores essenciais para a formação do produto. A composição elementar do microrganismo em causa pode ser utilizada para se calcular a proporção de cada componente necessário ao desenvolvimento das células. As concentrações dos componentes irão variar consoante o processo seja de baixa densidade celular ou de elevada densidade celular. Por exemplo, as concentrações de glicose, nos processos de fermentação por lotes de baixa densidade celular, irão estar compreendidas entre 1 g/L e 5 g/L ao passo que nos processos por lotes de elevada densidade celular se trabalha com concentrações de glicose compreendidas entre 45 g/L e 75 g/L.

Para utilização na prática da presente invenção prevê-se, enquanto fontes de fosfato nos meios, uma grande variedade de vidros de fosfato. Os vidros de fosfato são fosfatos de cadeia linear com aplicações relativamente especializadas. Para uma recapitulação geral sobre

polifosfatos de cadeia linear, incluindo os vidros de fosfato, veja-se a obra de Corbridge, D.E.C., 'Phosphorus: An Outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology', 4ª edição, capítulo 3, páginas 210-302 (1990). Os vidros de fosfato podem ser preparados com uma composição bastante variada e são constituídos principalmente por uma mistura de catiões e de cadeias discretas de polifosfatos. Os vidros formados com catiões Na^+ foram estudados mais meticulosamente e existem numa série contínua, são estáveis a temperaturas normais e têm composições que vão desde P_2O_5 até $5\text{Na}_2\text{O} \cdot 100\text{P}_2\text{O}_5$. Os vidros de fosfato são formados por condensação de anões ortofosfato, isto é, aquecendo NaH_2PO_4 até cerca de 650°C , seguindo-se um arrefecimento brusco. Um vidro típico, obtido a partir de uma fusão a 650°C com arrefecimento brusco e vapor de água à pressão de 55 torr, possui cadeias com um comprimento médio de $\bar{n} = 60$ tetraedros de PO_4 .



Os diversos tipos de vidro de polifosfato de sódio encontram-se comercialmente disponíveis. Tais vidros são fabricados com diversos comprimentos médios das cadeias (v.g. $\bar{n} = 5$ a $\bar{n} = 200$).

De um modo geral, os polifosfatos úteis nos métodos da presente invenção são os vidros de polifosfato de sódio. Em particular, recomenda-se a utilização de vidros de polifosfato de sódio com cadeias variáveis entre cerca de $\bar{n} = 2$ e cerca de $\bar{n} = 100$ e mais preferencialmente entre cerca de $\bar{n} = 4$ e cerca de $\bar{n} = 20$. Estes vidros de polifosfato são úteis na presente invenção pelos motivos seguintes: (1) as suas propriedades de solubilidade são tais que os meios nutrientes concentrados podem ser preparados sem que haja nenhuma precipitação

consequente ao efectuar-se a mistura; (2) os sistemas de células hospedeiras, tais como o sistema de *E. coli*, possuem os circuitos necessários para metabolizar os vidros de fosfato; e (3) atendendo a que não há nenhuma precipitação, todos os nutrientes ficam perfeitamente disponíveis para consumo, daí resultando maiores densidades celulares e maiores velocidades de crescimento. De acordo com uma variante preferencial, utiliza-se como fonte de fósforo um vidro de polifosfato de sódio com uma cadeia de comprimento $n = 11$.

A presente invenção é útil num processo para a produção de diversas proteínas recombinantes. Como exemplos de proteínas aqui previstas refere-se as seleccionadas entre citoquinas, incluindo diversos factores hematopoiéticos tais como FEC-G, FCP, EPO, FEC-GM e FEC-1 (respectivamente o mesmo que (G-CSF, SCF, EPO, GM-CSF e CSF-1), as interleucinas, por exemplo, desde IL-1 até IL-12, e os IGF, FEC-M, FNT ou FIL (respectivamente o mesmo que IGF, M-CSF, TNF ou LIF). Também são úteis outras proteínas terapêuticas, tais como os interferões (interferões α , β , γ ou de consenso), os factores de crescimento e as hormonas, por exemplo, as hormonas de crescimento dos seres humanos ou de outros animais (por exemplo, hormonas de crescimento dos porcos ou dos galináceos), FCF, FCK, FCE e FCDP (respectivamente o mesmo que FGF, KGF, EGF e PDGF). Também estão previstos os inibidores das proteases, tais como os inibidores da metaloproteinase (por exemplo, TIMP-1, TIMP-2 ou outros inibidores de proteinases). São contemplados também os factores de crescimento dos nervos, tais como o FCNC (o mesmo que BDNF) e as NT-3. São ainda contempladas as parcelas peptídicas de proteínas que possuam a totalidade ou uma parte da estrutura primária da proteína original e pelo menos uma das propriedades biológicas da proteína original.

Em geral, o FCK útil na presente invenção tem a sequência do FCK humano ou dos seus análogos estreitamente afins. O pedido de patente de invenção PCT publicado com o nº

WO 90/08771 descreve a purificação de FCK a partir de um meio condicionado de uma linhagem celular de fibroblastos embrionários humanos, a sequenciação parcial dos aminoácidos do polipeptido isolado, a clonagem do gene e a expressão em células bacterianas (*E. coli*) para se conseguir um FCK recombinante e biologicamente activo.

De acordo com uma variante preferencial, a célula hospedeira recombinante utilizada no processo é de *E. coli*. O microrganismo *E. coli* constitui um sistema preferível, uma vez que a sua genética está bem caracterizada, é fácil conseguir elevadas densidades celulares e pode desenvolver-se eficientemente em condições normais (v.g., valores normais de pH e temperatura).

Como elementos complementares que permitem criar casos preferenciais da presente invenção refere-se as fontes de azoto complexas, tais como os extractos de leveduras e os produtos de digestão química obtidos com farinha de soja e caseína, carne, sangue ou sementes de algodão. Conforme é perfeitamente compreensível por um especialista na matéria, a invenção compreende também os métodos para regular a precipitação de metalofosfatos que possuam diversas combinações destes elementos complementares.

EXEMPLO 1

Utilizando fontes de fosfatos alternativas efectuou-se a preparação de meios alimentares nutrientes mínimos equilibrados, típicos daqueles que poderiam ser utilizados para a produção de proteínas recombinantes em fermentações de elevada densidade celular em *E. coli*. Efectuou-se a comparação de um meio mínimo de um lote “padrão” (designado por Meio A) utilizando um ortofosfato como fonte de fósforo, com um outro meio (designado por Meio B) em que se utilizou como fonte de fósforo ‘Hexaphos™’, que é um polifosfato de sódio vítreo com um comprimento de cadeia $n = 11$ e que é fornecido por “FMC Corp.”.

O Meio A continha glicose (45 g/L), extracto de levedura (3 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), K_2HPO_4 (4 g/L), KH_2PO_4 (4,56 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,71 g/L), KCl (0,74 g/L), solução A com oligoelementos à razão de 4,0 mL/L (27 g/L para $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/L para $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/L para $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/L para $\text{MnMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L para $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,9 g/L para $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L para H_3BO_3 , 1,6 g/L para $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 73,5 g/L para o citrato de sódio $\cdot\text{H}_2\text{O}$) e solução A de vitaminas na proporção de 4 mL/L (0,06 g/L para a biotina, 0,04 g/L para o ácido fólico, 1,4 g/L para piridoxina $\cdot\text{HCl}$, 0,42 g/L para a riboflavina, 5,4 g/L para o ácido pantoténico, 6,1 g/L para a niacina). O Meio B era idêntico ao Meio A, com a excepção de se ter utilizado 'Hexaphos™' na concentração de 3,33 g/L como fonte de fosfato, em vez de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 .

Durante a esterilização de cada um dos meios, esterilizou-se conjuntamente a glicose e o sulfato de magnésio, esterilizou-se separadamente a solução A de oligoelementos e os outros componentes dos meios também foram esterilizados separadamente (incluindo o ortofosfato). Procedeu-se deste modo para evitar reacções secundárias indesejáveis. No caso do Meio B também se esterilizou separadamente o produto 'Hexaphos™'. Ao trabalhar com o Meio A, quando todos os componentes esterilizados dos meios foram misturados entre si, a solução resultante ficou turva. Atribuiu-se a turvação à ocorrência de reacções de precipitação. No entanto, o Meio B permaneceu transparente durante o procedimento de mistura.

Determinou-se o peso do precipitado resultante, retirando amostras de 10 mL do meio e filtrando-as através de filtros de 'nylon' com poros com um tamanho de 0,2 μm (Nalgene, 215-4020) sobre um suporte de filtros (Nalgene, 300-4100). Utilizou-se o segundo filtro desta montagem para se avaliar o aumento de massa devido aos sólidos solúveis que ficaram retidos na membrana. Os filtros foram secos ao ar durante várias horas e depois foram completamente

secos numa mufla de secagem por micro-ondas de modelo 'Labware 9000' com um prato de balança. Utilizou-se a mufla de modelo 'Labware 9000' para a determinação do peso seco dos filtros antes e após a introdução da amostra. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro 1 seguinte.

QUADRO 1

<u>Meios</u>	<u>Peso do precipitado</u>
A	0,20 g/L
B	não detectável

EXEMPLO 2

Foram realizadas fermentações em processo combinado de enriquecimento faseado de elevada densidade celular, concebidas para a produção de FCK recombinante em *E. coli*, para se comparar a utilização de um vidro de fosfato com a utilização de um ortofosfato, enquanto fontes de fósforo, nos diversos lotes de meios e também nos meios de alimentos nutrientes concentrados. Determinou-se os efeitos dos níveis de precipitação dos metalofosfatos nos meios e também a densidade celular global. Fez-se uma experiência com um meio mínimo "padrão" de processo combinado de enriquecimento faseado (a que se chamou Experiência C), tendo sido utilizado um ortofosfato como fonte de fósforo, tendo esta experiência servido para comparação com uma experiência (a que se chamou Experiência D) em que se utilizou 'Hexaphos™' como fonte de fósforo.

No caso da Experiência C, o meio do lote continha glicose (5 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,68 g/L), K_2SO_4 (0,05 g/L), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,36 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,136 g/L), KCl (0,008 g/L) e solução A com oligoelementos à razão de 0,78 mL/L (27 g/L para $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/L para

ZnCl₂•4H₂O, 2,0 g/L para CoCl₂•6H₂O, 2,0 g/L para MnMoO₄•2H₂O, 1,0 g/L para CaCl₂•2H₂O, 1,9 g/L para CuSO₄•5H₂O, 0,5 g/L para H₃BO₃, 1,6 g/L para MnCl₂•4H₂O, 73,5 g/L para o citrato de sódio•H₂O). A Experiência D foi idêntica à Experiência C, com a exceção de se ter utilizado 'HexaphosTM' na concentração de 0,28 g/L em vez de NaH₂PO₄•H₂O.

No caso da Experiência C o meio alimentar continha glicose (651,5 g/L), K₂SO₄ (6,52 g/L), NaH₂PO₄•H₂O (46,91 g/L), MgSO₄•7H₂O (17,69 g/L), KCl (1,08 g/L) e solução A com oligoelementos à razão de 102 mL/L. O meio alimentar da Experiência D foi idêntico ao da Experiência C, com a exceção de se ter utilizado 'HexaphosTM' na concentração de 37,2 g/L em vez de NaH₂PO₄•H₂O. Em cada experiência ajustou-se o pH do meio para o valor 7,0 por adição de uma solução de NaOH a 40% v/v até à proporção de 36 mL/L.

Tal como sucedeu no caso em que se utilizou os meios alimentares nutrientes mínimos equilibrados do exemplo 1, a utilização de ortofosfato como fonte de fósforo deu origem à formação de precipitação ao ser efectuada a mistura dos componentes esterilizados dos meios. Por outro lado, a utilização de 'HexaphosTM' não deu origem a nenhuma precipitação. Determinou-se o peso do precipitado resultante, utilizando para tal o procedimento descrito no exemplo 1, estando os resultados obtidos agrupados resumidamente no quadro 2 seguinte.

QUADRO 2

<u>Experiência</u>	<u>Peso do precipitado</u>
C	0,33 g/L
D	não detectável

Verificou-se também as densidades celulares para as experiências C e D. Em cada uma dessas experiências as células cresceram inicialmente por um processo descontínuo (por lotes)

no meio para os lotes. Depois de a glicose ter sido consumida teve início uma alimentação contínua em que se utilizou o meio alimentar. Durante esta parte da fermentação de enriquecimento faseado, a velocidade de alimentação aumentou em intervalos de 2 horas, em conformidade com a densidade celular. Na experiência C a velocidade de crescimento começou a $0,08 \text{ h}^{-1}$ e decaiu para $0,04 \text{ h}^{-1}$ decorridas 42 horas após o início da alimentação, altura em que se obteve uma densidade celular de DO 65. O valor de DO decaiu a seguir. Na experiência D a fermentação cresceu a uma velocidade estacionária de $0,09 \text{ h}^{-1}$ durante 43 horas, altura em que se atingiu um valor de densidade celular de DO 92. O valor de DO decaiu a seguir (ver a figura 1). Como resultado obteve-se uma densidade celular final de 61 g (peso das células secas)/L para a experiência D, comparativamente com o valor apenas de 43 g (peso das células secas)/L no caso da experiência C. Em consequência, a experiência D produziu o FCK à razão de 180 mg/L ao passo que a experiência C produziu o FCK à razão de 120 mg/L.

EXEMPLO 3

Foram utilizados vários polifosfatos (com comprimentos de cadeia variando entre $\bar{n} = 2$ e $\bar{n} = 19$), diferentes do produto 'HexaphosTM', como fontes de fósforo, nas preparações de meios, típicas das utilizadas nas fermentações de elevada densidade celular em *E. coli*. Efectuou-se a formulação de vários meios que continham glicose:fósforo e glicose:magnésio em proporções típicas das necessárias nas fermentações de elevada densidade celular, misturando uma solução concentrada de reserva constituída por glicose/sulfato de magnésio (contendo glicose na concentração de 888 g/L) com soluções concentradas de água e compostos diversos contendo fósforo. Ajustou-se o pH de cada solução resultante para um valor igual a 7,0 utilizando quer NaOH a 40% quer HCl a 30%.

Foram realizados diariamente exames visuais a cada solução durante 5 dias para se verificar a formação de precipitados. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro 3 seguinte. Os resultados demonstram que a utilização do produto 'HexaphosTM', enquanto fonte de fósforo nos meios, permite a utilização de concentrações de glicose da ordem de 800 g/L sem que haja precipitação. A utilização de 'Glass HTM', que é um vidro de polifosfato de sódio com um comprimento de cadeia $n = 19$, e da substância 'SodaphosTM', que é um vidro de polifosfato de sódio com um comprimento de cadeia $n = 4$, permite a utilização de glicose em concentrações da ordem de 600 g/L. Por outro lado, a utilização de ortofosfato permite a utilização de glicose com uma concentração máxima que é apenas de 462 g/L.

QUADRO 3

Fonte de fósforo	Comprimento da cadeia	Número de dias para a formação de precipitação				
		Glicose a 800 g/L	Glicose a 600 g/L	Glicose a 400 g/L	Glicose a 200 g/L	Glicose a 100 g/L
'Glass H TM '	19	2	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
'Hexaphos TM '	11	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
'Sodaphos TM '	4	2	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
Tripolifosfato	1	1	1	1	Nenhum	Nenhum
Ortofosfato	N/A	N/A	0*	Nenhum	Nenhum	Nenhum

* A concentração máxima de glicose que é possível obter é de 462 g/L.

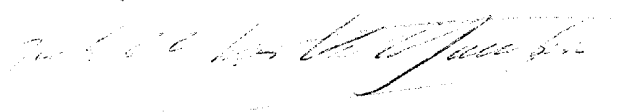
Estes resultados demonstram que há um conjunto de vidros de polifosfatos de sódio que são eficazes para eliminar a precipitação de nutrientes nos meios concentrados utilizados para a produção de proteínas recombinantes nas fermentações de elevada densidade celular.

Os resultados aqui apresentados revelam um método prático para regular as reacções de precipitação de metalofosfatos nos meios utilizados nos processos de fermentações bacterianas

de elevada densidade e permitem concluir que o crescimento das células e a produção de proteínas irão ser melhores num conjunto de processos de fermentação bacteriana de elevada densidade celular.

Lisboa, 26 de Abril de 2001

Com a ciente do Sr. Diretor da Universidade Nova



UNIVERSIDADE NOVA
LISBOA
INSTITUTO DE ENGENHARIA DE BIOTECNIA
LISBOA

Reivindicações

1. Método para reduzir a precipitação num processo de fermentação bacteriana de elevada densidade celular para a produção de uma proteína recombinante, em que no processo de fermentação de elevada densidade celular são alcançadas densidades celulares superiores a 20 g de células (peso seco)/litro, compreendendo tal método a utilização de vidros de fosfato, enquanto fontes de fósforo, nos meios nutrientes durante a produção da referida proteína.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos vidros de fosfato são seleccionados entre o conjunto constituído por vidros de fosfato de sódio que possuem cadeias com comprimentos variáveis entre cerca de $n = 2$ e cerca de $n = 100$.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o referido vidro de fosfato de sódio tem uma cadeia com um comprimento compreendido entre cerca de $n = 4$ e $n = 20$.
4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o referido vidro de fosfato de sódio tem uma cadeia com um comprimento de $n = 11$.
5. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, em que a referida fermentação de elevada densidade celular é escolhida entre o conjunto constituído por uma fermentação em lotes, uma fermentação contínua e uma fermentação de processo combinado de enriquecimento faseado.

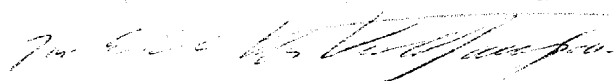
6. Método para fazer aumentar a densidade das células num processo de fermentação bacteriana de elevada densidade celular para a produção de uma proteína recombinante, em que no processo de fermentação de elevada densidade celular são alcançadas densidades celulares superiores a 20 g de células (peso seco)/litro, compreendendo tal método a utilização de vidros de fosfato, enquanto fontes de fósforo, nos meios nutrientes durante a produção da referida proteína.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que os referidos vidros de fosfato são seleccionados entre o conjunto constituído por vidros de fosfato de sódio que possuem cadeias com comprimentos variáveis entre cerca de $\bar{n} = 2$ e cerca de $\bar{n} = 100$.
8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o referido vidro de fosfato de sódio possui uma cadeia com um comprimento compreendido entre cerca de $\bar{n} = 4$ e $\bar{n} = 20$.
9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o referido vidro de fosfato de sódio possui uma cadeia com um comprimento de $\bar{n} = 11$.
10. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações 6 a 9, em que a referida fermentação de elevada densidade celular é escolhida entre o conjunto constituído por uma fermentação em lotes, uma fermentação contínua e uma fermentação de processo combinado de enriquecimento faseado.
11. Método para reduzir a precipitação num processo de fermentação bacteriana de elevada densidade celular para a produção de uma proteína recombinante, em que no processo de

fermentação de elevada densidade celular são alcançadas densidades celulares superiores a 20 g de células (peso seco)/litro, consistindo esse método em utilizar um vidro de fosfato que possui uma cadeia com um comprimento compreendido entre cerca de $n = 4$ e cerca de $n = 20$, enquanto fonte de fósforo, nos meios nutrientes durante a produção da referida proteína.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o referido vidro de fosfato de sódio possui uma cadeia com um comprimento de $n = 11$.

Lisboa, 26 de Abril de 2001

© Agência Nacional de Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMBIAO
A. 0000
Rua ...
1000-000

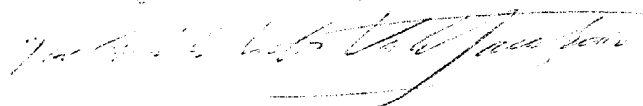
Resumo

“Método para regular a precipitação de metalofosfatos em fermentações com alta densidade celular”

A invenção descreve a utilização de um vidro de fosfato, enquanto fonte de fósforo, nos meios utilizados nos processos de fermentação bacteriana de elevada densidade celular para a redução das reacções de precipitação dos metalofosfatos. Os métodos da invenção demonstram um método prático para regular os níveis de precipitação de metalofosfatos nos meios nutriente e no fermentador, daí resultando também um aumento das densidades celulares, sendo úteis em inúmeros processos de fermentação bacteriana de elevada densidade celular.

Lisboa, 26 de Abril de 2001

3 Registo de Patentes Industriais



JOSÉ DE SÁ
733/01
Rua ...
Lisboa

1/1
Figura 1

