



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

202 044

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 1/06

C 12 N 15/00

C 12 P 21/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2383 498
(31) 8108982

(22) 22.03.82
(32) 23.03.81

(44) 24.08.83
(33) GB

(71) siehe (73)

(72) WEISSMANN, CHARLES, PROF. DR.; SCHEIN, CATHERINE; CH;

(73) BIOGEN N.V., CURACAO, NL

(74) PAB (PATENTANWALTSBÜERO BERLIN) 1493556 1130 BERLIN FRANKFURTER ALLEE 286

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG EINES IN EINEM WIRTORGANISMUS ERZEUGTEN PRODUKTES

(57) Das Verfahren ist durch den Schritt gekennzeichnet, daß ein Produkt erzeugender Wirtsorganismus mit wenigstens einer Zusammensetzung zusammengebracht wird, die Lysis oder zumindest Permeabilisierung des Wirtsorganismus erzeugt und das verlangte Produkt in gewinnbarer Form an das Kulturmedium abgibt.

Verfahren zur Gewinnung eines in einem Wirtsorganismus erzeugten Produktes

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft Verfahren für die Erzeugung von Proteinen, Polypeptiden oder anderen Produkten in Wirtsorganismen. Genauer gesagt betrifft sie ein Verfahren für die Gewinnung eines bestimmten Proteins, Polypeptids oder anderen Produktes von einem dieses Produkt erzeugenden Wirtsorganismus. Das erfindungsgemäße Verfahren ist durch den Schritt gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus mit mindestens einer Zusammensetzung zusammengebracht wird, die Lysis oder zumindest Permeabilisierung des Wirtes erzeugt und das verlangte Produkt in das Kulturmedium in gewinnbarer Form abgibt. Wie aus der folgenden Beschreibung hervorgeht, ist das erfindungsgemäße Verfahren allgemein für die Erzeugung verschiedener Proteine, Polypeptide und anderer Produkte in verschiedenen Wirtsorganismen geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Eines der Probleme bei der Massenproduktion von Proteinen, Polypeptiden und anderen Produkten in potentiell gefährlichen Wirtsorganismen besteht darin, wie die Wirtsorganismen der Kultur inaktiviert oder getötet werden können, während gleichzeitig das verlangte Produkt gewonnen werden kann.

Dieses Problem hat infolge der Entwicklung der Rekombinant-DNA-Technologie immer mehr an Bedeutung gewonnen. Eine derartige Technologie ermöglicht die Erzeugung von Fremdprodukten in Wirtsorganismen, die mit Fremd-DNA-Sequenzen, die für diese Produkte kodieren, transformiert wurden. Beispiele für solche Prozesse umfassen die Erzeugung von Humaninsulin, Humaninterferonen, Hepatitis-B-Virusantigenen, Maul- und Klauenseuche-Virusantigenen und Humanwachstumshormon in Bakterien und anderen Wirtsorganismen.

Bisher wurden zwei allgemeine Lösungen für dieses Problem versucht. Bei der ersten werden die Wirtsorganismen der Vermehrungskultur unter entsprechenden Bedingungen physikalischer Eindämmung durch Hitze, Säure oder andere Inaktivierungsbehandlung vor dem Ernten inaktiviert. Danach werden die inaktivierten Wirtsorganismen geerntet und die vorgesehenen Proteine oder Polypeptide gewonnen. Bei dem zweiten dieser bisherigen Versuche werden die Wirtsorganismen geerntet und unter Bedingungen physikalischer Eindämmung extrahiert, wie es durch staatliche Richtlinien und Bestimmungen gefordert wird. Dann werden alle zurückbleibenden lebenden Zellen wie zuvor inaktiviert oder getötet und die verlangten Proteine oder Polypeptide gewonnen.

Doch keiner dieser Versuche hat sich für die Gewinnung der verlangten Produkte aus Massenfermentationen von Wirtsorganismen, die diejenigen Produkte erzeugen, als zufriedenstellend erwiesen. Zum Beispiel wurde im Falle der mikrobiellen Erzeugung von Humanleukozyten-Interferon (IFN- α) von mit einer DNA-Sequenz, die für IFN- α kodiert, transformierten E. coli (derartige Mikroorganismen werden beispielsweise in der EPÜ-Patentanmeldung 81.300050.2, eingereicht am 7. Januar 1981, beschrieben und diese Anmeldung ist durch Bezugnahme hier einbezogen worden) bei dem ersten allgemeinen Versuch -- Inaktivierung der transformierten Wirtsorganismen entweder durch Hitze, Säure oder andere inaktivierende Behandlung und anschließendes Ernten -- eine Ausbeute von nur etwa 10 % Interferon oder interferonartigen Produkten, die durch die Mikroorganismen erzeugt wurden, erzielt. Abweichend von der Theorie wird angenommen, daß die anderen Produkte des Wirtsorganismus mit dem verlangten Interferonprodukt einen Komplex bilden oder okkludieren und seine Gewinnung aus der inaktivierten und geernteten Kultur verhindern.

Der zweite allgemeine Versuch, der durchaus im Labormaßstab anwendbar sein könnte, ist technisch im größeren Ausmaß schwierig durchzuführen. Zum Beispiel sind die Kompliziertheit und die Ausgaben für Fermentations- und Bearbeitungseinrichtungen zur Erzielung der verlangten Eindämmung während der Ernte und Extraktion von Massenkulturen lebender Zellen sehr hoch. Außerdem sind die anzuwendenden Verfahren aufwendig und werden von den Einrichtungen her und vom Personal nicht bevorzugt.

Ziel der Erfindung:

Durch die Erfindung werden die genannten Probleme dadurch gelöst, daß ein Verfahren für die Gewinnung eines verlangten Proteins, Polypeptids oder anderen Produktes von einem Wirtsorganismus, der das Produkt erzeugt, zur Verfügung gestellt wird.

Mit Hilfe der Erfindung ist es möglich, in das Kulturmedium in gewinnbarer Form im wesentlichen das gesamte von dem Wirtsorganismus erzeugte Protein, Polypeptid oder andere Produkt abzugeben, während gleichzeitig der Wirtsorganismus inaktiviert wird.

Das verbesserte erfindungsgemäße Verfahren unterscheidet sich somit von den oben beschriebenen, dem bisherigen Stand der Technik entsprechenden Verfahren dadurch, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren im wesentlichen die vollständige Gewinnung der verlangten Produkte aus einer Kultur von Wirtsorganismen möglich ist und gleichzeitig die Nachteile der dem bisherigen Stand der Technik entsprechenden Verfahren ausgeschaltet werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Zum besseren Verständnis der hier beschriebenen Erfindung

wird folgende ausführliche Beschreibung vorgenommen. In dieser Beschreibung wird der Ausdruck "Wirtsorganismus" umfassend angewandt. Zum Beispiel umfaßt er sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterienwirte, wie Stämme von E. coli, z. B. E. coli HB101, E. coli X1776, E. coli X2882, E. coli DS410, E. coli MRCI und Stämme von Pseudomonas, Bacillus subtilis, Bacillus steareothermophilus und anderen Bazillen, Hefearten und anderen Fungi, tierischen oder pflanzlichen Wirten wie Tier- (einschließlich Human-) oder Pflanzenzellen in Kultur oder anderen Wirten. Die Wahl eines bestimmten Wirtes ist kein Teil der Erfindung. Die Erfindung ist vielmehr allgemein für die Gewinnung von Produkten von allen Wirten anwendbar, die nach der Einwirkung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen lysierbar oder zumindest permeabilisierbar sind.

Außerdem ist das erfindungsgemäße Verfahren für eine große Vielzahl von Proteinen, Polypeptiden und anderen Produkten anwendbar. Zum Beispiel bildet die Gewinnung von Produkten wie Wirkstoffen von Vakzinen oder anderen pharmazeutisch oder innerlich nützlichen Zusammensetzungen, Enzymen, Alkaloiden, Aminosäuren, Industriechemikalien, Antibiotika, Lebensmitteln und dergleichen Teil der Erfindung. Nochmals, die Wahl eines bestimmten Produktes ist nicht Teil der Erfindung. Sondern die Erfindung ist allgemein für die Gewinnung aller dieser wünschenswerten Produkte anwendbar.

Schließlich sind die zahlreichen Techniken und Verfahren für die Züchtung oder Fermentierung von Kulturen von Wirtsorganismen oder die Reinigung von Produkten derselben kein Teil der vorliegenden Erfindung. Vielmehr bildet die Erfindung eine nützliche Ergänzung für diese Techniken und ermöglicht die bessere Gewinnung des verlangten Produktes daraus.

Natürlich muß man beachten, daß nicht jeder Wirt oder jede Züchtungs- oder Reinigungstechnik erfolgreich zur Erzeugung eines spezifischen Produktes in einem bestimmten Wirtsorganismus unter Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden kann. Die Fachleute sollten stattdessen verschiedene im Fachgebiet bekannte Faktoren bei der Wahl eines bevorzugten Wirtes und bevorzugter Bedingungen für die Erzeugung und Reinigung eines erwünschten Produktes berücksichtigen.

Zum Beispiel sind die verschiedensten Wirt-Cloningvehikel-Kombinationen in der Rekombinant-DNA-Technologie zur Herstellung transformierter Wirtsorganismen, die ein verlangtes Fremdprodukt erzeugen, angewandt worden. Nützliche Cloningvehikel können beispielsweise aus Segmenten chromosomer, nicht-chromosomer und synthetischer DNA-Sequenzen bestehen, wie verschiedenen bekannten Bakterienplasmiden, z. B. Plasmiden von E. coli, wie col El, pCR1, pBR322 und deren Derivate; breiteren Wirtsbereichsplasmiden, z. B. RP4; Phagen-DNA, z. B. den zahlreichen Derivaten von Phage λ , z. B. NM989; und von Kombinationen von Plasmiden und Phagen-DNAe abgeleiteten Vektoren wie Plasmiden, die zur Verwendung von Phagen-DNA oder anderen Expressions-Kontroll-Sequenzen modifiziert wurden, oder Hefepiasmiden, wie 2 μ Plasmide oder Derivate davon. Verschiedene DNA-Sequenzen können an allgemein bekannten Stellen in diese Cloningvehikel eingebaut werden, um Hybrid-DNA-Moleküle zu erzeugen. Diese Moleküle sind entweder im erzeugten Zustand oder nach entsprechender Modifikation nützlich, um ihre Expressionscharakteristika zu verbessern oder das tatsächlich von ihnen verwirklichte Produkt zu modifizieren, zur Transformation von Wirtsorganismen nach obiger Beschreibung und zur Erzeugung der durch die eingefügten DNA-Sequenzen kodierten Produkte oder wünschenswerter Fragmente davon.

Beispiele für die durch solche transformierten Wirtsorga-

nismen erzeugten Fremdprodukte sind Hepatitis-B-Virusantigene, Maul- und Klauenseuchen-Virusantigene, Leukozyteninterferon, Fibroblastinterferon und die A- und B-Ketten von Humaninsulin, Rattenwachstumshormon, Mäuse-Dihydrofolatreduktase, Somatostatin, Humanwachstumshormon und dergleichen.

Im Rahmen der obigen allgemeinen Technologie ist die Erfindung durch den Schritt gekennzeichnet, daß ein Wirtsorganismus mit mindestens einer Zusammensetzung zusammengebracht wird, auf die der Wirtsorganismus durch Lysis reagiert oder zumindest dadurch, daß er permeabel wird, so daß er das durch ihn erzeugte Produkt in das Kulturmedium abgibt. Diese Zusammensetzungen werden in zwei allgemeine Klassen unterteilt. Die erste Klasse löst die Lipide der Zellmembran und zerstört die Undurchlässigkeit des Wirtsorganismus. Beispiele für diese Klasse sind Detergenzien wie Triton und Natriumdodecylsulfat ("SDS") und Enzyme wie Glusulase[®] (ein β -Glucuronidasesulfatase-Präparat). Die zweite Klasse zerreißt die Zellhülle des Wirtsorganismus oder blockiert von dem Zellwandsystem gebrauchte Enzyme. Beispiele für diese Klasse sind Penicillin, Cycloserin, Bacitracin, Zanco mycin, Ristocetin, Polymyxin und deren Derivate, synthetische, halb-synthetische oder natürliche.

Es ist natürlich klar, daß bestimmte Wirtsorganismen auf eine Klasse oder ein Glied einer Klasse von Zusammensetzungen empfindlicher reagieren als auf andere. Zum Beispiel sind Humanzellen leicht für nichtionische und ionische Detergenzien empfänglich. Andererseits reagieren E. coli-Zellen empfindlicher auf die Einwirkung von Penicillin oder seiner Derivate oder auf die Einwirkung von SDS nach einer Lysozym/EDTA-Behandlung. Und Hefezellen reagieren empfindlicher auf Glusulase[®].

Die verschiedenen Zusammensetzungen, die oben als Beispiele

für im erfindungsgemäßen Verfahren nützliche Zusammensetzungen beschrieben wurden, besitzen ein allgemein bekanntes Spektrum von Aktivitäten gegenüber verschiedenen Wirtsorganismen. Daher muß die Wahl einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung für einen bestimmten Anwendungsfall durch eine Reihe von Faktoren bestimmt werden. Zu denen gehören die Suszeptibilität des Wirtsorganismus gegenüber der Zusammensetzung, die Suszeptibilität des Wirtsorganismus nach der Transformation, wenn die erfolgte, mit einem Hybridplasmid auf die Zusammensetzung, die Aktivität und Stabilität der Zusammensetzung in dem Kulturmedium, die Stabilität des verlangten Produktes in dem Kulturmedium und bei anschließenden Bearbeitungsschritten und jede Wechselwirkung zwischen der Zusammensetzung und dem verlangten Produkt. Unter Anwendung dieser Prinzipien kann ein Fachmann eine bestimmte Zusammensetzung im Rahmen der Erfindung wählen und das erfindungsgemäße Verfahren mit Erfolg für die Gewinnung eines verlangten Produktes anwenden.

Das "Schema", nach dem der Wirtsorganismus mit der gewählten Zusammensetzung in dem erfindungsgemäßen Verfahren zusammengebracht wird, wird gleichfalls bis zu einem gewissen Grade durch den betreffenden Wirtsorganismus, die verwendete Zusammensetzung und die verlangten Produkte bestimmt. Zum Beispiel verlangen einige Behandlungen wie Lysozym/EDTA und anschließende Einwirkung von SDS, daß die Vermehrung der Kultur von Wirtsorganismen im wesentlichen vor dem Beginn der Freisetzung des Produktes abgeschlossen ist. Andererseits ermöglicht die Anwendung von Penicillin oder dessen Derivaten wie Ampicillin oder anderer gleich wirkender Zusammensetzungen, daß nach den verschiedensten Schemata gearbeitet wird. Zum Beispiel können die Menge der zugesetzten Zusammensetzung, der Zeitpunkt der Zugabe im Wachstumszyklus des Wirtsorganismus, die Anzahl der Zusatzstoffe, die Anzahl der Zugaben oder die Zeitspanne der Vermehrung des Wirtsorganismus nach der Zugabe und vor der Produktgewinnung insgesamt vom Fachmann modifiziert werden, ohne daß vom

Geltungsbereich der Erfindung abgewichen wird.

Zum Beispiel wurde bei einem Ausführungsbeispiel der Erfindung eine einzige große Dosis Penicillin zu einer sich vermehrenden Mikroorganismenkultur am Ende ihrer Vermehrungsperiode gegeben. Alle nach der für die Einwirkung gewählten Zeitspanne verbliebenen Wirtsorganismen wurden dann inaktiviert und das gewünschte Produkt gewonnen. In einem zweiten Beispiel wurde die Konzentration des Penicillins in der Kultur auf einem niedrigen, mehr oder weniger konstanten Niveau gehalten, damit sich die Mikroorganismen weiter vermehren und das verlangte Produkt mit etwa der gleichen Geschwindigkeit erzeugen konnten, mit der die Mikroorganismen durch das Penicillin lysiert oder zumindest permeabilisiert wurden, um das verlangte Produkt freizusetzen. Daher kann die richtige Wahl von Zugabeplänen die Erzielung eines annähernd eingeschwungenen Zustandes in der Kultur ermöglichen. Derartige Verfahren sind sehr nützlich bei halb-kontinuierlichen und kontinuierlichen Fermentations- und Gewinnungsverfahren.

Abweichend von der Theorie wird angenommen, daß das erfindungsgemäße Verfahren Lysis oder zumindest Permeabilisierung eines Teiles oder aller Wirtsorganismen der Vermehrungskultur und die Abgabe der verlangten, von jenen Wirtsorganismen erzeugten Produkte in das Kulturmedium herbeiführt. Der nicht-lysierte Teil der Kultur, wenn vorhanden, kann sich natürlich weiter vermehren und das verlangte Produkt erzeugen, bis er durch das erfindungsgemäße Verfahren lysiert oder permeabilisiert oder anderweitig inaktiviert wird.

Bei einem nicht-kontinuierlichen Verfahren wird die Fermentation irgendwann beendet, vorzugsweise durch die Zugabe einer ausreichenden Menge der erfindungsgemäßen Zusammensetzung. Dann werden alle im nicht-lysierten Zustand verbliebenen Wirtsorganismen durch Säure oder Wärmebehandlung,

je nachdem, was günstiger für die Stabilität des verlangten Produktes ist, abgetötet. Das Produkt wird anschließend isoliert und in entsprechender Weise gereinigt. Zum Beispiel werden säurebeständige, säure-präzipitierbare Produkte (z. B. IFN- α , IFN- β) durch Ausfällung mit Säure gereinigt und durch Extraktion gewonnen. Andere Produkte werden durch Absorption auf Ionenaustauscherharzen oder Affinitätsharzen oder durch Ausfällung mit einem der zahlreichen allgemein bekannten Zusatzstoffe wie Salzen, Metallionen und dergleichen gewonnen.

In einem chargenweisen Verfahren kann ein Teil der Kultur in Abständen entfernt und wie oben behandelt werden, um das verlangte Produkt zu gewinnen, während die restliche Kultur sich weiter vermehrt und das verlangte Produkt erzeugt. Bei einem kontinuierlichen Verfahren kann das verlangte Produkt wie oben aus dem Mediumstrom gewonnen werden, nachdem dieser durch die immobilisierte oder anderweitig lokalisierte Kultur von Wirtsorganismen geleitet worden ist.

Zum besseren Verständnis der Erfindung werden die folgenden Beispiele aufgeführt. Diese Beispiele dienen nur zur Erläuterung, und die Erfindung soll nicht durch irgendwelche darin gebrauchten Ausführungen eingeschränkt werden.

Ausführungsbeispiele:

Beispiel I

E. coli DS410 (β -Lac-AUG(α 2)), ein E. coli DS410 (Ara Azid Ton A lac y Tsx min a min b gal λ xyl Schritt^R) Stamm wurde wie in der oben angeführten EPÜ-Patentanmeldung beschrieben mit Plasmid β -lac-AUG (α 2) transformiert. Er ist unter ATCC Nr. 31769 im American Type Culture Collector hinterlegt. Der transformierte Wirt enthält das über ein AUG Initiator-Codon mit der Penicillinase-(β -lac) Expressions-Kontroll-Sequenz

von pBR322 verbundene IFN- α 2-Gen. Der Wirt ist resistent gegenüber Tetracyclin und Streptomycin.

Er wurde bis zu einer Zelldichte von 5×10^9 ($OD_{650} = 6$) in einer 130-l-Kultur bei 30°C gezüchtet, und eine Probe wurde zur Bestimmung, wieviel IFW durch die Wirtsorganismen erzeugt worden war, analysiert. Das Kulturmedium bestand aus Casaminosäuren (enzymatisches Caseinhydrolysat C-0626, Sigma) (30 g/l), Glycerin (98 % PHHVI, rein, Siegfried) (20 g/l), Hefeextrakt (BBL) (2 g/l), KH_2PO_4 (rein, p.A. Fluka) (5 g/l), NaOH (p.A. Merck, Nr. 6498) (1,2 g/l), Silicon DX31DB (Dow Chemical) (0,1 ml/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, z. Analyse, Nr. 5886) (1 g/l) und NaOH (wie oben) (ca. 2 g/l).

Das Medium wurde durch Autoklavenbehandlung der Casaminosäuren, Glycerin, Hefeextrakt, KH_2PO_4 und Silicon über einen Zeitraum von 20 Minuten bei 120°C hergestellt. Nach dem Kühlen wurde das $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in "1 ml" H_2O , das getrennt wie oben im Autoklaven behandelt worden war, zugesetzt, und der pH-Wert wurde mit NaOH in H_2O auf 7 eingestellt. Es wurden Belüftung und Rühren vorgenommen, um nicht weniger als 80 % gelösten Sauerstoff (in bezug auf Luft bei atmosphärischem Druck) zu garantieren. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 10 M NaOH auf 7 gehalten.

75 mg/l Ampicillin (ein Penicillin-Derivat) wurden mit $OD_{650} = 6$ zugesetzt und die Belüftung und das Rühren wie zuvor fortgesetzt. Nachdem die $OD_{650} = 6$ auf 4 gesunken war (30 bis 60 Minuten), wurde die Kultur auf 10°C abgekühlt, und H_2SO_4 (ca. 4 M) wurde langsam zur Einstellung des pH-Wertes auf 1,9 zugegeben. In einigen Fällen wurde Trichloressigsäure zur Einstellung des pH-Wertes auf 1,3 verwendet, um dadurch die vollständige Ausfällung des verlangten IFN-Produktes zu fördern.

Das Präzipitat wurde mit Hilfe eines Westphalia-Separators gesammelt, und die konzentrierten Feststoffe wurden zu einer Paste in einer Sharples zentrifugiert. Die Paste (etwa 133 g/l, feucht) wurde in einer das fünffache ihres Gewichts betragenden Menge entionisierten Wassers suspendiert, mit einem Silverson-Homogenisator homogenisiert, und der pH-Wert wurde mit 2 M NaOH (etwa 3 l NaOH werden normalerweise gebraucht) auf 7,2 eingestellt. Eine Analyse ergab, daß im wesentlichen die gesamte von den Wirtsorganismen erzeugte IFN gewonnen worden war.

Diese geerntete und extrahierte IFN- α kann anschließend zu ihrer Reinigung in der unterschiedlichsten Weise behandelt werden. Wie oben bereits gesagt wurde, bilden diese anschließenden Techniken keinen Teil der Erfindung.

Beispiel II

E. coli DS410 (β -lac AUG(α 2)) nach obiger Beschreibung wurden bis zu einer Zelldichte von 10^9 /ml unter den gleichen Bedingungen und unter Verwendung des gleichen Kulturmediums wie oben gezüchtet. Es wurde wieder eine Probe zur Bestimmung der Menge der IFN-Erzeugung analysiert. 5 μ g Ampicillin je ml Kultur wurden danach zugesetzt und die Inkubation unter voller Belüftung und Bewegung fortgesetzt. Es wurde keine Zunahme von lebenden Zellen festgestellt, so daß vermutlich die Fraktion der Zellen, die durch das Ampicillin lysiert oder zumindest permeabilisiert wurden und IFN- α 2 in das Medium abgegeben haben, durch die verbliebenen, die Teilung fortsetzenden Zellen ersetzt worden waren, zumindest soweit es die Grenze des benutzten Nachweises erlaubte. Diese Zellen erzeugen natürlich weiterhin zusätzliches IFN- α 2.

Nach etwa 1 Stunde ergab eine Analyse einen Titer in der Höhe von 200×10^6 Einheiten von IFN/l. Die Kultur wurde

anschließend wie in Beispiel I beschrieben behandelt, und im wesentlichen wurde die gesamte IFN-Aktivität von der Kultur in dem Säurepräzipitat gewonnen.

Beispiel III

Eine 1-1-Kultur von E. coli DS410 (β -lac AUG(α 2)) nach obiger Beschreibung wurde bei 37 °C in dem oben beschriebenen Kulturmedium bis zu einer Zelldichte von etwa 10^{10} gezüchtet. Die Kultur wurde danach mit 20 mM EDTA, 100 μ g/ml Lysozym 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert und danach mit 0,4 % SDS lysiert. Nach dem Abkühlen auf 10 °C wurde das Lysat mit Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und 60 Minuten lang stehen gelassen, um alle restlichen Zellen abzutöten. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugieren gesammelt und mit Wasser (1/20 ursprünglicher Kulturmedien) homogenisiert, wobei der pH-Wert mit NaOH auf 7,3 eingestellt wurde. Durch Entfernung der unlöslichen Substanz ergab sich eine klare Lösung mit 50 bis 100 % der ursprünglichen IFN- α -Aktivität.

In diesem Falle war die weitere Reinigung von IFN- α schwierig, was vermutlich auf eine Komplexbildung von IFN mit den gleichfalls durch SDS extrahierten hydrophoben Membranproteinen zurückzuführen war. Natürlich sollte eine derartige Komplexbildung kein Nachteil bei der Gewinnung anderer Nicht-Interferon-Produkte sein.

Nachdem eine Anzahl Ausführungsbeispiele der Erfindung vorgestellt worden sind, dürfte es klar sein, daß die grundlegende Konstruktion zur Schaffung anderer Ausführungsformen verändert werden kann, bei denen die erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen verwendet werden. Daher soll der Geltungsbereich der Erfindung nur durch die angefügten Ansprüche und nicht durch die spezifischen Ausführungsformen, die oben als Beispiele erläutert wurden, festgelegt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung eines Produktes von einem dieses Produkt erzeugenden Wirtsorganismus, gekennzeichnet dadurch, daß der Wirtsorganismus mit mindestens einer Zusammensetzung zusammengebracht wird, die Lysis oder wenigstens Permeabilisierung des Wirtsorganismus und Freisetzung des verlangten Produktes erzeugt.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Wirtsorganismus aus der Stämme von E. coli, Pseudomonas, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, andere Bazillen, Hefearten, andere Fungi, Tier- oder Pflanzenzellen und andere Wirtsorganismen umfassenden Gruppe ausgewählt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei dem Wirtsorganismus um einen Stamm von E. coli handelt.
4. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei dem Wirtsorganismus um einen Wirtsorganismus handelt, der mit einem Vektor, der eine für das Produkt kodierende DNA-Sequenz aufweist, transformiert wurde.
5. Verfahren nach Punkt 4, gekennzeichnet dadurch, daß die DNA-Sequenz aus der Gruppe ausgewählt wurde, die für Proteine kodierende DNA-Sequenzen, für Polypeptide kodierende DNA-Sequenzen, für einzelne oder mehrere Aminosäuren kodierende DNA-Sequenzen, für Enzyme kodierende DNA-Sequenzen, für Industriechemikalien kodierende DNA-Sequenzen und für Lebensmittel kodierende DNA-Sequenzen umfaßt.
6. Verfahren nach Punkt 4 oder 5, gekennzeichnet dadurch, daß die DNA-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe, die

DNA-Sequenzen, die für eine immunologische oder biologische Aktivität von Leukozyteninterferon aufweisende Polypeptide kodieren, DNA-Sequenzen, die für eine immunologische oder biologische Aktivität von Fibroblast-Interferon aufweisende Polypeptide kodieren, DNA-Sequenzen, die für die Antigenwirkung von FMDV-Virusantigenen aufweisende Polypeptide kodieren, DNA-Sequenzen, die für die Antigenwirkung von Hepatitis-B-Virusantigenen aufweisende Polypeptide kodieren, und DNA-Sequenzen, die für andere eine immunologische oder biologische Aktivität von Tier- oder Humanprodukten aufweisende Polypeptide kodieren, umfaßt.

7. Verfahren nach einem der Punkte 4 bis 6, gekennzeichnet dadurch, daß die DNA-Sequenz für eine immunologische oder biologische Aktivität von Leukozyten-Interferon aufweisendes Polypeptid kodiert.
8. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß die Zusammensetzung aus der Detergenzien, Enzyme, Penicillin, Cycloserin, Bacitracin, Zanamycin, Ristocetin, Polymyxin und deren Derivate umfassenden Gruppe ausgewählt ist.
9. Verfahren nach Punkt 8, gekennzeichnet dadurch, daß die Zusammensetzung aus der Penicillin und dessen Derivate umfassenden Gruppe ausgewählt ist.
10. Verfahren nach Punkt 9, gekennzeichnet dadurch, daß das Ampicillin der Kultur von etwa 10^9 Zellen/ml in einer zwischen etwa $15 \mu\text{g/l}$ und etwa $75 \mu\text{g/l}$ liegenden Menge zugesetzt wird.