

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Januar 2009 (29.01.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/013066 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12M 1/36 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/057378

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juni 2008 (12.06.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 028 355.7 15. Juni 2007 (15.06.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): HITEC ZANG GMBH [DE/DE]; Ebertstr. 30-32,
52134 Herzogenrath (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZANG, Werner
[DE/DE]; Sperberweg 5, 52134 Herzogenrath (DE).
CANZONERI, Michelangelo [IT/DE]; Liststr. 18, 40470

Düsseldorf (DE). KRÜGER, Rolf [DE/DE]; Höhenweg
49, 52074 Aachen (DE). BISELLI, Manfred [DE/DE];
Max-Hermkes-Platz 8, 52428 Jülich (DE). FISCHER,
Rainer [DE/DE]; Menzerath 1, 52156 Monschau (DE).

(74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Hauser Ring 10, 40878 Ratingen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR FERMENTING CELL CULTURES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FERMENTATION VON ZELLKULTUREN

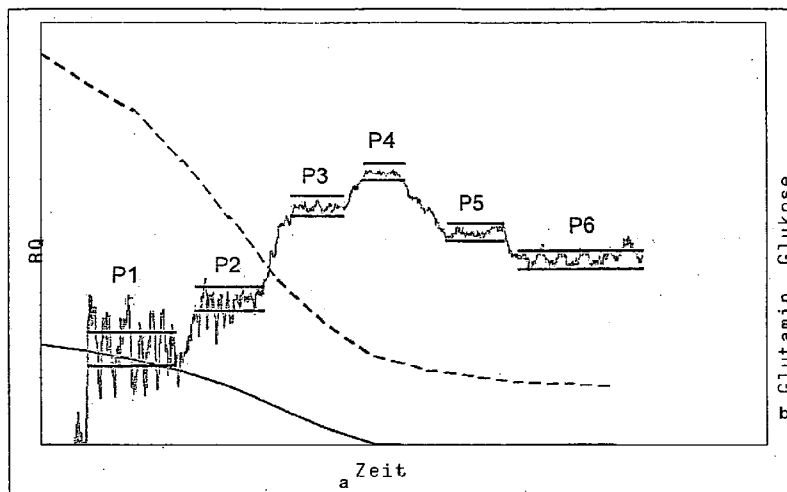


Fig. 1

a time
b glutamine, glucose

(57) Abstract: The invention relates to a method and a corresponding apparatus for fermenting cell cultures, in which the metabolic respiratory quotient (RQ) is determined online as an actual value for a regulation process, a target RQ suitable for achieving a desired productivity or product characteristic is determined as a desired value for a regulation process by means of trial or calculation, and a high cell yield, an optimum product yield and/or product quality, or a desired product characteristic, e.g. a reduction of secondary products, are achieved by controlling one or more metering devices on the basis of said desired and actual values.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2009/013066 A1



GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren sowie eine entsprechende Vorrichtung zur Fermentation von Zellkulturen, bei welchem -der metabolische Respirationsquotient (RQ) als Ist-Wert für eine Regelung online bestimmt wird, -der für die Erzielung einer angestrebten Produktivität oder Produkteigenschaft geeigneter Ziel-RQ als Sollwert für eine Regelung durch Versuch oder Berechnung ermittelt wird und -auf Basis dieser Soll- und Ist-Werte durch Ansteuerung von einer oder mehreren Dosiervorrichtungen eine hohe Zellausbeute, eine optimale Produktausbeute und/oder Produktqualität bzw. eine gewünschte Produkteigenschaft, z. B. Reduzierung von Nebenprodukten erzielt wird.

Verfahren zur Fermentation von Zellkulturen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und/oder eine Vorrichtung für ein RQ-geregeltes Zulaufverfahren in Zellkulturen.

5

Bei der Entwicklung neuer Medikamente nehmen biopharmazeutische Wirkstoffe rasant an Bedeutung zu. Unter Biopharmazeutika versteht man mit gentechnischen Methoden gewonnene (sog. rekombinante) therapeutische Proteine, monoklonale Antikörper oder nukleinsäurebasierte Medikamente. Innerhalb von nur drei Jahren hat sich die produzierte Menge an Biopharmazeutika mit Zellkulturen mehr als verdoppelt. Die Entwicklung hat mittlerweile eine solche Dynamik erreicht, dass die Zellkultur-Fermentationskapazitäten weltweit zum limitierenden Faktor werden.

Die Optimierung dieser großtechnischen Produktionsprozesse wird daher zunehmend bedeutsam. Die Herausforderung wird insbesondere darin bestehen, die entsprechenden Produkte im Wettbewerb kosteneffizient herzustellen.

Bei großtechnischen Anlagen stellt die Fed-Batch Fermentation die zurzeit am weitesten verbreitete Strategie der Prozessführung dar. Neben der Nachfütterung essentieller Medienkomponenten (Fed-Batch) werden gleichzeitig andere Prozessparameter, wie z. B. der pH-Wert, konstant gehalten. Das durch Stoffwechselendprodukte angesäuerte Medium wird somit neutralisiert und ermöglicht der Kultur ein ungehindertes Wachstum. Die Kulturdauer lässt sich durch die Fed-Batch-Methode auf bis zu zwei Wochen verlängern und der Produkttiter teilweise bis auf das 10-fache erhöhen.

Die Einhaltung konstanter Kulturparameter ist für Zellkulturen von besonderer Bedeutung. Bei nicht optimalen Kulturparametern wird nicht nur die Produktivität der Zellen gesenkt. Durch wechselnde Kulturparameter wird auch die chemische Struktur (von z. B. Seitenketten) des sekretierten Proteins (insbesondere die Glykosylierung) verändert und so eine unerwünschte Heterogenität des Wirkstoffs hervorgerufen, was einen erheblichen Einfluss auf die pharmakologische Wirkung hat.

Die fortlaufende Ermittlung prozessrelevanter Parameter während einer Fermentation ist daher für eine kontrollierte Kultivierung von Zellkulturen unverzichtbar. Diese liefern Informationen, die für das Verständnis des Stoffwechsels sowie für die Optimierung des Prozesses von großem Interesse sind. Weiterhin wird auch immer mehr die Dokumentation der Reproduzierbarkeit des Prozessverlaufs gegenüber den Behörden, z. B. der FDA bedeutend. Durch den tieferen Einblick in die Zelle eröffnen sich vielseitige Möglichkeiten, die Konzentration und die Qualität des Biopharmazeutikums zu steigern.

Der aerobe Abbau von Nährstoffen führt zu einer Konzentrationsabnahme des zu verstoffwechselnden Substrates und zu einer Abreicherung von Sauerstoff (Atmungskette). Letzteres kann durch Bilanzierung der Abluft als Oxygen Transfer Rate (OTR) erfasst werden und ist ein Maß für den momentanen Sauerstoffverbrauch der Zelle. Der direkte Zusammenhang zwischen Substrat- und Sauerstoffverbrauchsrate konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (T. Anderlei, Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks, Biochemical Engineering, 2004, 17, 187–194; Q. Feng, On-line monitoring of oxygen uptake rate and its application in hybridoma culture, Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao., 2003, 19(5), 593–607; M. Canzoneri, Atmungsaktivität von Säugerzellen, BioForum, 2006, 2).

Die vollständige Erschöpfung der Nährsubstanzen führt zum Absterben der Zellen. Daher ist die Zuführung von Kulturmedium und/oder Nährstoffen unabdingbar. Das Zulaufverfahren bzw. die Fed-Batch-Strategie wird bei verschiedenen Produktionsprozessen (rekombinante Proteine, Backhefe, Antibiotika etc.) in der Industrie standardmäßig angewendet. Ausgehend von einer Batch-Kultur werden nach der Verzögerungsphase die limitierenden Substrate zugeführt. Das Substrat wird dabei in dem Maße zugeführt, wie es metabolisiert wird (quasi steady state), d. h. mit der eingestellten Substratkonzentration kann eine bestimmte Wachstumsrate eingestellt werden (Monod-Kinetik).

Wesentlich bei der Fed-Batch-Technik sind die Handlungsanweisungen für die konkreten Kultur-/Produktionsverfahren. Sie basieren auf einer intensiven Erforschung des Kulturverlaufs und der Ableitung entsprechender, spezifischer Vorgehensweisen/Handlungsanweisungen. Einen großen Nachteil der konventionellen Prozessführung stellt die Offline-Ermittlung der Substratverbrauchsraten, Substratkonzentrationen und der aktuellen Zelldichte dar. In der Regel müssen in regelmäßigen Abständen Proben im laufenden Prozess genommen und anschließend mit externen Geräten bzw. mit Schnelltests analysiert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wird die Zulauf rate neu berechnet und anschließend die Zulaufgeschwindigkeit angepasst. Die fehlende Möglichkeit einer Onlinemessung von Substratkonzentrationen macht eine Regelung des Prozesses aufwändig und schwierig. Schwankungen in der Produktausbeute und –qualität sind mögliche Folgen dieser Art der Prozesskontrolle. Der Zeitabstand, der zwischen der Offline-Analyse der Proben und der Einstellung der neuen Prozesswerte entsteht, kann zu falschen Einstellungen der Zulauf rate und damit zu einer ungewollten Nährstofflimitierung führen.

Durch die aerobe Verstoffwechselung der Substrate wird Sauerstoff verbraucht und Kohlendioxid produziert. Das Verhältnis der in einer bestimmten Zeitspanne abgegebenen CO₂-Menge zu der in der gleichen Zeiteinheit aufgenommenen O₂-Menge ist definiert als der Respirationsquotient (RQ). Dieser Parameter spiegelt den Stoffwechselzustand der Zelle wieder und erlaubt einen detaillierten Rückschluss auf den aktuellen Stoffwechselprozess der Zelle. So kann z. B. festgestellt werden welche Substratgruppen (z. B. Kohlenhydrate oder Fette) aktuell überwiegend verwertet werden.

10 In Zellkulturen werden Bikarbonat gepufferte Medien verwendet. Dadurch wird die Bestimmung des RQ kompliziert. Die gemessene CTR ist ein Summensignal aus zellspezifischer und pufferbedingter Kohlendioxidbildung. Letzteres resultiert aus der Wirkung des Puffers bei Säurebildung der Zellen. Hierbei wird durch die Ansäuerung zusätzliches CO₂ chemisch erzeugt. Die ermittelten RQ-Werte führen zu überhöhten Werten da nur ein Teil des CO₂ dem Stoffwechsel der Zellen entstand und stellen nicht den metabolischen RQ der Zellen dar. Da hier die Bezeichnung RQ irreführend ist, wurde der Begriff TQ (Transfer Quotient) eingeführt. Dieser stellt das Verhältnis der gesamten CO₂-Bildung zum gesamten O₂-Verbrauch dar. Der gemessene TQ sagt nichts über den metabolischen RQ aus und lässt damit keinen Rückschluss auf die Stoffwechselaktivität der Zelle zu.

Verschiedene Forschergruppen konnten jedoch durch Flüssig-Gas-Bilanzierungen des CO₂ unter Einbeziehung des pH-Wertes die tatsächliche zellspezifische Kohlendioxidbildungsrate (CER, Carbondioxide Evolution Rate) bestimmen. (Hendrik P. Bonarius, Determination of the Respiration Quotient in Mammalian Cell Culture in Bicarbonate Buffered Media, Biotechnology and Bioengineering, 1995, 45, 524-534; Björn Frahm, Determination of dissolved CO₂ concentration and CO₂ production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement, Journal of Biotechnology, 2002, 99, 133-148).

30 Damit war zwar die Grundvoraussetzung für die korrekte Bestimmung des metabolischen RQ gegeben, aber aufgrund der aufwändigen apparativen und rechnerischen Randbedingungen hat die online Messung keine weitere Verbreitung in der industriellen Zellkulturfermentation gefunden.

35

Die Steigerung der Produktivität kontinuierlicher Zelllinien ist auf Grund ihres komplexen Stoffwechsels und des Zusammenspiels der Einflüsse verschiedener Substrate auf das Wachstum eine große Herausforderung.

In verschiedenen Experimenten (Carl Johan Franzén, Metabolic flux analysis of RQ-controlled microaerobic ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 2003, 20, 117-132; Hendrik P. Bonarius, Determination of the Respiration Quotient in Mammalian Cell Culture in Bicarbonate Buffered Media, *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 45, 524-534) konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von kontinuierlichen Zelllinien bei niedrigen Glutamin- und Glukosekonzentrationen einen positiven Einfluss auf die zellspezifische Produktivität hat. Gleichzeitig wird die Bildung von Stoffwechselendprodukten auf ein Minimum reduziert, so dass deren Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung erheblich reduziert wird.

Die Steigerung der Produktivität bei niedrigen Substratkonzentrationen beruht auf der effektiveren Verstoffwechselung von Glukose und Glutamin zu CO₂ und Wasser. Bei höheren Konzentrationen hingegen überwiegt die ineffektive Verstoffwechselung von Glukose zu Laktat (95%) bzw. von Glutamin zu Alanin (Overflow-Metabolismus) (Jan Ljunggren, Catabolic Control of Hybridoma Cells by Glucose and Glutamine Limited Fed Batch Cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44, 808-818; Hideo Kurokawa, Growth Characteristics in Fed-Batch Culture of Hybridoma Cells with Control of Glucose and Glutamine Concentrations, *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44, 95-103).

Kontinuierliche Zelllinien durchlaufen bei hohen Substratkonzentrationen den Zitratzyklus nur vom α -Ketoglutarat bis zum Zitrat. Niedrige Aktivitäten von wichtigen Schlüsselenzymen verhindern eine weitere Umsetzung des Substrates und führen somit zu einem unvollständigen und energetisch ineffektiven Abbau. Stoffwechselphysiologisch gesehen basiert die effektivere Verwertung der Substrate bei niedrigen Konzentrationen auf einem vollständigen Durchlaufen des Zitratzyklus. Die Aktivitätszunahme verschiedener Schlüsselenzyme im Laufe einer Batch-Fermentation konnte von verschiedenen Forschergruppen belegt werden (L. Fitzpatrick, Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture, *Appl Biochem Biotechnol*, 1993, 43(2), 93-116).

Die Folge sind ein erhöhter Sauerstoffverbrauch und eine erhöhte Kohlendioxidbildung pro umgesetztem Substratmolekül. Die Änderung der Stoffwechselaktivität muss sich demzufolge im metabolischen RQ widerspiegeln und damit kann der RQ in Abhängigkeit von der Glutaminkonzentration verschiedene Werte annehmen.

Eine Aufzeichnung des vollständigen RQ-Verlaufs während einer Batch-Fermentation von kontinuierlichen Zelllinien sowie die Identifizierung und biochemische Interpretation einzelner RQ-Phasen ist bisher nicht erfolgreich gelungen. Eine Aussage zur Korrelation
5 zwischen Nährstoffkonzentration und Stoffwechselzustand war bisher nur durch retrospektive Offline-Messungen möglich. Obwohl seit mehr als 10 Jahren Möglichkeiten zur Bestimmung des RQ bei Mikroorganismen bekannt sind, war es bisher nicht möglich bei Zellkulturen, eine Online-Regelung auf Basis der RQ-Werte zu erstellen. Dies lag vor allen Dingen daran, dass bisher nur der TQ bestimmt werden konnte.

10

Verschiedene Kontrollmethoden sind beispielsweise aus der US 4,891,310, US 6,284,453 B1, US 6,150,133 und US 6,955,892 B2 bekannt. Aber auch hier wird kein Kontroll- und Messverfahren vorgestellt, mit welchem sich letzten Endes online über die Messung des Respirationsquotienten der Zulauf von Kulturmedium und/oder Nährstoffen
15 regeln lässt. Gleichwohl besteht ein Bedarf, hier Abhilfe zu schaffen; denn allen bisherigen Messverfahren für die Parameter von Fermentationen in Zellkulturverfahren haften Nachteile an. So ist z. B. die Elektrodenmessung zur Bestimmung des CO₂ für die Regelung nicht stabil genug.

20 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren sowie eine entsprechende Vorrichtung zur RQ-geregelten Zufuhr von Kulturmedium und/oder Nährstoffen zur Verfügung zu stellen, welches die geschilderten Probleme des Standes der Technik überwindet. Es soll erfindungsgemäß durch Bestimmung des metabolischen RQ-Wertes erreicht werden, dass mittels Online-Regelung die Zufuhr von Kulturmedium und/oder
25 Nährstoffen einer empfindlichen Online-Regelung zugänglich gemacht wird. Hierdurch soll zugleich eine effektive Produktivitätssteigerung in Zellkulturverfahren erreicht werden. Dies war mit den bisherigen Verfahren der Fermentationstechnik nicht möglich. Denn die von der Kultivierung mit Mikroorganismen bekannten Verfahren lassen sich nicht auf die wesentlich empfindlicheren Zellkulturen übertragen. Dies gilt insbesondere
30 bei Einsatz von tierischen Zellkulturen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Fermentation von Zellkulturen, bei welchen

- der metabolische RQ online bestimmt wird,
- 35 - der metabolische RQ als Istwert für eine Regelung dient,

- der Ziel-RQ für die gewünschte Produktivität oder Produkteigenschaft als Sollwert für eine Regelung ermittelt wird und
- auf Basis der Soll- und Ist-Werte die Zufuhr von Kulturmedium und/oder Nährstoffen so geregelt wird, dass sich eine optimale Zell- oder Produktausbeute und/oder eine gewünschte Produktqualität bzw. Produkteigenschaft einstellt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Herstellung von Proteinen, beispielsweise Pharmaproteinen, durchgeführt werden. Dabei kann das Verfahren mit tierischen- oder pflanzlichen Zellen durchgeführt werden. In dem Verfahren können sowohl kontinuierliche Zelllinien als auch gentechnisch veränderte Zellen eingesetzt werden.

Dabei kann der Ziel-RQ in einem Vorversuch (z. B. Batch-Betrieb, Konti-Betrieb oder Chemostat-Betrieb; Konti-Betrieb entspricht einer kontinuierlichen Prozeßführung) oder im laufenden Prozess bestimmt werden. Ferner kann der Ziel- RQ rechnerisch aus der Stöchiometrie des Stoffwechselweges bestimmt werden. Online wird der metabolische RQ durch die geeignete Kombination der Gasanalysewerte und in situ Messwerte wie pH und Temperatur bestimmt. Die Gasanalyse wird mittels Partialdruckmessung, Massen- und Volumenstrombestimmung oder einer beliebigen Kombination von zwei oder mehr der genannten Parameter durchgeführt.

Die Messung des metabolischen RQ-Wertes basiert auf den im Stand der Technik beschriebenen Meß- und Berechnungsmethoden. Eine Verwendung des RQ-Wertes zur Regelung einer Fermentation von Zellkulturen wurde bisher noch nicht gezeigt. Die vorliegende Erfindung zeigt erstmals, dass es möglich ist in einem Verfahren zur Fermentation von Zellkulturen aus dem gemessenen RQ-Verlauf reproduzierbar auf verschiedene Stoffwechselzustände zu schließen und dass sich während der Fermentation verschiedene diskrete RQ-Zustände bezogen auf die zellspezifische Produktivität einstellen. Der optimale RQ-Wert kann anhand einer Aufzeichnung eines vollständigen RQ-Verlaufs von kontinuierlichen Zelllinien sowie der Identifizierung und biochemischen Interpretation der einzelnen RQ-Phasen ermittelt werden. Dabei kann der Ziel-RQ im Verlauf einer vorgeschalteten Fermentation, rechnerisch aus der Stöchiometrie des Stoffwechselweges, aber auch im laufenden Prozess bestimmt werden.

Mit Hilfe dieser Information, der Verknüpfung von diskreten RQ-Werten mit Stoffwechselzuständen und/oder zellspezifischen Produktivitäten, ist es möglich, bestimmte Produktivitäten einem bestimmten RQ-Wert zuzuweisen. Dadurch kann man

z. B. eine bestimmte Produktmenge verbunden mit einer geringen Nebenproduktbildung über den RQ-Wert einregeln. Folglich kann während der Fermentation ohne aufwändige Kontrolle verschiedenster Parameter, lediglich durch eine Online-Bestimmung und Online-Regelung des RQ-Werts, die gewünschte Produktivität eingestellt werden. Die
5 Regelung erfolgt durch die Zufuhr von Kulturmedium und/oder Nährstoffen, so dass sich eine optimale Zell- oder Produktausbeute und/oder eine gewünschte Produktqualität bzw. Produkteigenschaft einstellt.

Die Online-Kontrolle und -Regelung des gewünschten RQ-Wertes ermöglicht somit eine
10 exakte Zuführung des benötigten Kulturmediums und/oder der Nährstoffe um entweder eine hohe Zellausbeute, eine hohe Produktausbeute, eine bestimmte Produktqualität oder Produkteigenschaft zu erzielen.

Die Begriffe „gewünschte Produktqualität“, „gewünschte Produkteigenschaft“, „optimaler
15 RQ-Wert“ oder „gewünschter RQ-Wert“ im Sinne der Erfindung variieren je nach Verfahren und Produkt. So kann es bedeuten nicht auf einen RQ-Wert zu regeln bei dem die maximale zellspezifische Produktivität vorhanden ist, sondern auf einen RQ-Wert mit niedrigerer zellspezifischer Produktivität, wobei dieser dafür mit einer niedrigeren Nebenproduktbildung verbunden ist.

20

Die Verstoffwechselung von z. B. Fetten führt zu RQ-Werten < 1 (ca. 0,7), da diese Stoffklasse zu den wenig oxidierten Substanzen zählt. Kohlenhydrate sind im Vergleich hoch oxidiert und führen zu einem RQ-Wert von 1. Anwendung findet diese Methode z.B. bei der Fermentation von Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) (Carl Johan Franzén,
25 Metabolic flux analysis of RQ-controlled microaerobic ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast, 2003, 20, 117–132).

Saccharomyces cerevisiae kann unter anaeroben Bedingungen Alkohol produzieren. Jedoch gibt es außerdem die Möglichkeit, unter aeroben Bedingungen entweder Alkohol
30 oder ausschließlich Biomasse zu gewinnen. Das zu Grunde liegende Phänomen wird als Crabtree-Effekt bezeichnet und beschreibt die aerobe Alkoholbildung oberhalb einer kritischen Glukosekonzentration von 100 mg/l, wohingegen unterhalb von 100 mg/l bevorzugt die Biomasseproduktion abläuft.

Der gemessene RQ liegt bei der Ethanolproduktion weit über eins. Im Gegensatz dazu
35 hat die vollständige Oxidation des Zuckers zu CO_2 und Wasser einen RQ von eins.

Die erfindungsgemäße Prozessführung ist völlig unabhängig von Substrat-Offlinemessungen und basiert vorzugsweise auf der Messung des Gaswechsels. Durch die exakte Einhaltung einer bestimmten Substratkonzentration kann die Ausbeute an Biomasse oder Ethanol um ein vielfaches gesteigert werden.

5

Die Messung des Respirationsquotienten erfolgt erfindungsgemäß vorzugsweise durch die Bestimmung der geeigneten Kombination der Gasanalysewerte und der in situ vorgenommenen Messungen.

Die Gasanalyse kann mittels aller dem Fachmann zur Verfügung stehenden Methoden erfolgen. Voraussetzung ist, dass die Verfahren für die Online-Bestimmung brauchbar sind. Beispiele für Gasanalyse sind Partialdruckmessungen sowie die Bestimmung des Masse- und Volumenstroms.

Die in situ-Messung kann ebenfalls mit den üblichen dem Fachmann bekannten Methoden gemessen werden. Hier werden vorzugsweise der Kohlendioxidgehalt, der Sauerstoffgehalt, der pH-Wert und die Temperatur bestimmt. O₂- und CO₂-Gehalt können z. B. mittels Partialdruckmessung ermittelt werden. Ggf. können auch weitere Parameter gemessen werden. Für die Bestimmung des Kohlendioxidgehalts, des Sauerstoffgehalts und des pH-Werts kommen beispielsweise übliche Elektroden in Betracht.

Die Bestimmung des Soll-Wertes kann erfindungsgemäß vorzugsweise vor Beginn der Produktion durchgeführt werden. Die Sollwertbestimmung kann jedoch auch an beliebigen anderen Zeitpunkten erfolgen und je nach Erfordernissen des Betriebs auch beliebig oft wiederholt werden. Sie kann in einem gesonderten Fermenter oder auch in dem Produktionsfermenter erfolgen. Bevorzugt ist die Messung im Batch-Betrieb in einem gesonderten Gefäß.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann für pflanzliche oder tierische Zellen Verwendung finden. Erfindungsgemäß können auch kontinuierliche Zelllinien oder gentechnisch veränderte Zellen zum Einsatz kommen. Besonders bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren für den Einsatz von tierischen Zellkulturen. Hier ist ein besonders bevorzugter Bereich wiederum die Produktion von Proteinen, insbesondere von pharmazeutisch anwendbaren Proteinen. Besonders vorteilhaft ist es erfindungsgemäß, dass nunmehr im kontinuierlichen Verfahren über die Regelung des metabolischen RQ der Zulauf von Kulturmedium und/oder Nährstoffen gesteuert werden

kann. Das erfindungsgemäße Verfahren kann in den nach dem Stand der Technik bekannten für vorzugsweise Submersversverfahren geeigneten Fermentern durchgeführt werden. Demgemäß kommen z.B. Blasensäulen, Injektor betriebene Systeme, Schlaufenreaktoren sowie Rührreaktoren in Form von Ein- und
5 Mehrstufensystemen in Betracht. Besonders bevorzugt sind Rührreaktoren.

Die Reaktoren sind regelmäßig mit den nach dem Stand der Technik an sich bekannten Mess-, Steuer- und Regelsystemen ausgestattet. Hierzu zählen Geräte zur Online- und Offline-Messung. Als Beispiele zu nennen sind pH-, pO_2 - pCO_2 Messgeräte,
10 insbesondere der Einsatz entsprechender Sensoren. Ebenso ist z. B. der Einsatz von Messungen der Zu- und Abfuhr von Substrat sowie der Zu- und Abluft erfindungsgemäß vorteilhaft.

Eine Vorrichtung die zur Durchführung des beschriebenen Verfahrens geeignet ist, ermöglicht die Online-Ermittlung des metabolischen RQ mit Hilfe der Zu- und Abluft, sowie des pH-Wertes und der Temperatur. Die Steuerung der Medien- und Nährstoffzufuhr erfolgt automatisch basierend auf dem RQ. Dabei werden Dosiervorrichtungen (gasförmige, flüssige oder feste Medien) angesteuert um einen für die Erzielung einer angestrebten Produktivität oder Produkteigenschaft geeigneten RQ
20 (Ziel-RQ) einzuregeln und zu halten. Darüber hinaus können durch die Messung der Sauerstoffkonzentration und des pH-Wertes im Fermenter eine Regelung der Sauerstoff- bzw. NaOH/ CO_2 -Zufuhr zur Aufrechterhaltung einer gewünschten Sauerstoffkonzentration bzw. pH-Wertes im Fermenter durchgeführt werden.

25 Die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens kann dabei
a) einen Fermenter;
b) ein Gasmischsystem;
c) Zuluftleitungen für Gas;
d) Abluftleitungen;
30 e) Messvorrichtungen zur Bestimmung der Sauerstoff und CO_2 -Konzentration und des Massenflusses in der Zuluft und in der Abluft zur Ermittlung der Sauerstoffverbrauchsrate OTR und der Kohlendioxidbildungsrate CTR;
f) Vorrichtung zur Messung des pH-Werts und der Temperatur ;
g) Vorrichtung zur Ermittlung des CER und des metabolischen RQ aus den Temperatur-,
35 pH-, Sauerstoffkonzentrations- und Kohlendioxidkonzentrations-Werten;

h) ein RQ-Regler zur RQ-basierten Regelung der Zufuhr von Kulturmedium und/oder Nährstoffen enthalten.

Im Folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf diese Beispiele und Figuren
5 näher erläutert. Im einzelnen haben die Figuren folgende Bedeutung:

In allen Figuren entspricht P1 der Phase 1; P2 der Phase 2; P3 der Phase 3; P4 der Phase 4; P5 der Phase 5 und P6 der Phase 6.

10 Fig. 1: Verlauf des RQ bei einer Batch-Fermentation der Hybridomazelllinie CF-10H5. Durchgängige Linie: Glutamin; gestrichelte Linie: Glucose; durchgängige Linie in grau: RQ.

Fig. 2: Verlauf der zellspezifischen Produktivität. Gestrichelte Linie: zellspezifische
15 Produktivität; durchgängige Linie in grau: RQ.

Fig. 3: Verlauf der Laktatbildungsrate. Durchgängige Linie: Zellspezifische Laktatbildungsrate; durchgängige Linie in grau: RQ.

20 Fig. 4: Abhängigkeit des RQ von der Glutaminkonzentration in der chemostatischen Betriebsweise. Durchgängige Linie: Glutamin; durchgängige Linie in grau: RQ.

Fig. 5: Glutaminverlauf im RQ-geregelten Fed-Batch (Sollwert RQ 0,66). Durchgängige Linie: Glutamin; durchgängige Linie in grau: RQ. Der Pfeil markiert den Start des RQ-geregelten Fed-Batch-Verfahrens.
25

Fig. 6: Produktivitätsverlauf im RQ-geregelten Fed-Batch. Gestrichelte Linie: zellspezifische Produktivität; durchgängige Linie in grau: RQ.

30 Fig. 7: Verfahrensfließbild des RQ-geregelten Fed-Batch Verfahrens. 1: Fermenter; 2: Rührer; 3: Zuluft; 4: Abluft; 5 und 22: pH und pO₂-Elektroden; 7: Vorrichtung für die Abgasanalytik; 8: Vorrichtung zur Ermittlung des metabolischen RQ; 9: Nährstoffbehälter; 10: Nährstoffpumpe; 11: Zufuhrleitung.

35 Fig. 8: Vorrichtung zur Durchführung des RQ-geregelten Fed-Batch Verfahrens. 1: Fermenter; 2: Rührer; 3: Zuluft für Gas; 4: Abluftleitungen; 5: pH-Elektrode; 6-7:

Messvorrichtungen zur Bestimmung der Sauerstoff und CO₂-Konzentration und des Massenflusses in der Zuluft; 8: Vorrichtung zur Ermittlung des metabolischen RQ; 9: Nährstoffbehälter; 10: Nährstoffpumpe; 11: Zufuhrleitung; 12: Vorrichtung zur Messung des pH-Werts; 13: Vorrichtung zur Messung der Temperatur; 14-15: Messvorrichtungen zur Bestimmung der Sauerstoff und CO₂-Konzentration und des Massenflusses in der Abluft; 16: Vorrichtung zur Ermittlung der Sauerstoffverbrauchsrate OTR; 17: Vorrichtung zur Ermittlung der Kohlendioxidbildungsrate CTR; 18: Vorrichtung zur Ermittlung der CER; 19: Vorgegebener Ziel-RQ; 20: RQ-Regler; 21: Gasmischsystem;

10 1. RQ-Verlauf während einer Fermentation von Hybridomazellen

Figur 1 zeigt den Verlauf des RQ bei einer Batch-Fermentation der Hybridomazelllinie CF-10H5.

15 In Batch-Experimenten mit Hybridomazellen (ACC 477, CF-10H5) ist es gelungen aus dem gemessenen RQ-Verlauf reproduzierbar auf verschiedene Stoffwechselzustände zu schließen und eine biochemische Interpretation zu ermöglichen.

Insbesondere konnte im RQ-Verlauf eine Phase identifiziert werden, in der die zellspezifische Produktivität am höchsten ist. Daraus ergibt sich eine konkrete Handlungsanweisung bzw. ein Verfahren für die Führung der Kultur mit erhöhter Produktivität für Fed-Batch und kontinuierliche Fermentationsverfahren.

Figur 1 zeigt den RQ-Verlauf sowie die Abnahme der Glukose- und Glutaminkonzentration während der Batch-Kultivierung der Hybridomazelllinie CF-10H5 im Fermenter. Die Glutaminkonzentration nimmt im Laufe der Kulturdauer kontinuierlich ab, bis sie nach ca. 60 Stunden vollständig erschöpft ist. Die Glukosekonzentration nimmt während der gesamten Kulturdauer ab, wird aber bis zum Ende der Fermentation nie limitierend für die Kultur. Überraschenderweise stellen sich verschiedene diskrete RQ-Zustände (Phasen 1 bis 6) während der Fermentation ein.

30

2. Verlauf der zellspezifischen Produktivität während dieser Batch-Fermentation

Figur 2 zeigt den Verlauf der zellspezifischen Produktivität im Batch.

35 Aus Figur 2 wird ersichtlich, dass die zellspezifische Produktivität von den genannten RQ-Werten abhängig ist.

Bei hohen Glutaminkonzentrationen (Phase 1) wird ein niedriger RQ-Wert von 0,55 und bei niedrigen Glutaminkonzentrationen höhere RQ-Werte zwischen 0,66 und 1,11 gemessen. Die zellspezifischen Produktivitäten liegen bei den niedrigen RQ-Werten bei ca. $1\text{E-}7 \mu\text{g/N/h}$ und erreichen ihr Maximum (ca. $4\text{E-}7 \mu\text{g/N/h}$) bei einem RQ von 1,11. Ab einem RQ von ca. 1,3 fällt die Produktivität erneut auf den Ursprungswert zurück. Die Erhöhung der Produktivität liegt ca. bei einem Faktor 4.

Darüber hinaus wird bei einem RQ von 1,11 die Bildungsrate von Nebenprodukten deutlich erniedrigt. Aus Figur 3 wird ersichtlich, dass in der RQ-Phase von 1,11 die Laktatbildungsrate im Vergleich zu den anderen RQ-Phasen deutlich niedriger ist.

Das Ziel ist es daher, die 3. Stoffwechselphase (RQ = 1,11) und damit eine hohe Produktivität und gleichzeitig eine niedrige Bildungsrate von zum Teil toxischen Nebenprodukten aufrecht zu halten.

3. RQ-Verlauf während einer chemostatischen Betriebsweise

Aus Figur 4 ist die Abhängigkeit des RQ von der Glutaminkonzentration in der chemostatischen Betriebsweise sichtbar.

Die Korrelation des RQ mit dem jeweiligen Glutaminkonzentrationsbereich, im speziellen der Phasen 1, 2 und 3 konnte durch die chemostatische Fermentationsbetriebsweise bestätigt werden.

Diese Art der Prozessführung spiegelt die kontinuierliche Betriebsweise einer Fermentation ohne Zellrückhaltung. Dieses System ist charakterisiert durch den kontinuierlichen Zulauf von frischem Kulturmedium und dem Ablauf von verbrauchtem Kulturmedium inklusive Zellen. Das Fließgleichgewicht ermöglicht unter Berücksichtigung der Durchflussrate ($D < \mu_{\text{max}}$) das Einstellen von definierten Wachstumsraten, Substrat-, Produkt- und Zellkonzentrationen im Fermenter.

Aus Figur 4 wird ersichtlich, dass erst das Überschreiten von gewissen Glutaminkonzentrationen der RQ seinen Wert ändert.

4. RQ-geregelter Fed-Batch

Fed-Batch-Fermentationen mit der Hybridomazelllinie CF-10H5 konnten die Effektivität dieser Methode bestätigen (Figuren 5 bis 8).

Figur 5 zeigt den Glutaminverlauf im RQ-geregelten Fed-Batch (Sollwert RQ 0,66).

Figur 6 zeigt den Produktivitätsverlauf im RQ-geregelten Fed-Batch (Sollwert RQ 0,66).

5

Der anfängliche Batch-Betrieb bis 50 Stunden Fermentationszeit zeigt 2 der 6 Stoffwechselphasen und die damit verbundenen zellspezifischen Produktivitäten.

Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit des eingeregelter RQ-Wertes eine niedrige (RQ = 0,66) bzw. eine hohe (RQ = 1,11) zellspezifische Produktivität eingestellt wurde (Figur 6).

10

Das Einregeln des RQ erfolgt durch die geregelte Zugabe von Kulturmedium und/oder Nährstoffen (hier: Fed-Batch Medium, vierfach-Konzentrat der Nährstoffe).

5. Erhöhung der zellspezifischen Produktivität

15

Durch das Aufrechterhalten des RQ-Wertes von 1,11 konnte die Produktivität um den Faktor vier erhöht werden. Von einer anfänglichen Produktivität von ca. $1\text{E-}7 \mu\text{g/N/h}$ wurde die Produktivität auf ca. $4\text{E-}7 \mu\text{g/N/h}$ gesteigert.

Somit konnte im RQ-geregelten Fed-Batch gezeigt werden, dass das zuvor im Batch festgestellte Phänomen reproduzierbar ist und für eine RQ-basierte Prozessregelung genutzt werden kann.

20

Eine Onlineüberwachung sowie -regelung des Prozesses konnte ohne Laboranalytik erfolgreich umgesetzt und die Produktivität um 300 % gesteigert werden.

6. Anwendung der Methode

25

Figur 7 zeigt ein Verfahrensfliessbild mit einem als Beispiel für die erfindungsgemäße Anwendung der RQ-Regelung. In diesem Beispiel erfolgt die Produktion in einem Fermenter 1 mit einem Rührer 2. Der Fermenter ist mit einer Zuluft 3 und einer Abluft 4 ausgerüstet. Ferner sind für die Messung des pH und des pO_2 die Elektroden 5 und 22 vorgesehen. In der Abluft 4 ist noch eine Vorrichtung für die Abgasanalytik 7 angeordnet. Anhand des pH-Wertes, der Temperatur und der Ergebnisse der Abgasanalytik 8 lässt sich der RQ als Funktion des OTR, CTR, pH und der Temperatur bestimmen. Mit Hilfe des zuvor in einem Batch-Verfahren bestimmten verfahrensspezifischen RQ erfolgt sodann die Regelung des Zulaufs an Kulturmedien und/oder Nährstoffen 9. Hierbei betätigt der RQ-Regler das Ventil der Nährstoffpumpe 10 für die Zufuhrleitung 11.

30

35

7. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens

Figur 8 zeigt ein Verfahrensfließbild der Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

- 5 Hierbei wird die Gaszusammensetzung und der Gasfluss (Massenfluss) ermittelt. Die durch das Gasmischsystem 21 zusammengesetzte Zuluft 3 wird zunächst durch die Vorrichtung geleitet um den Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt 6-7 der Zuluft zu bestimmen. Anschließend wird das Gas in den Fermenter 1 geleitet.

- Durch die Bestimmung der Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration 14-15 in der Abluft 4
10 ist die Ermittlung der Sauerstoffverbrauchsrate (OTR) 16 sowie der Kohlendioxidbildungsrate (CTR) 17 möglich.

- Die Messung pH-Wertes 5 und der Temperatur 13 im Fermenter ermöglicht in Kombination mit der Berechnung der CTR die Ermittlung der CER 18 und damit des metabolischen RQ 8. Unter Berücksichtigung des RQ-Reglers 20 und einem vorgegebenen Ziel-RQ 19 ist die
15 Zufuhr der Kulturmedien und/oder Nährstoffen aus dem Nährstoffbehälter 9 über die Ansteuerung der Nährstoffpumpe 10 möglich.

Ansprüche

1. Verfahren zur Fermentation von Zellkulturen, bei welchem
 - der metabolische RQ online bestimmt wird,
 - 5 - der metabolische RQ als Istwert für eine Regelung dient,
 - ein Ziel-RQ für die gewünschte Produktivität oder Produkteigenschaft als Sollwert für eine Regelung ermittelt wird und
 - auf Basis der Soll- und Ist-Werte die Zufuhr von Kulturmedium und/oder Nährstoffen so geregelt wird, dass sich eine optimale Zell- oder Produktausbeute
 - 10 und/oder eine gewünschte Produktqualität bzw. Produkteigenschaft einstellt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Ziel-RQ in einem Vorversuch bestimmt wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Ziel-RQ in einem Vorversuch im Batch-Betrieb, Konti-Betrieb oder Chemostat-Betrieb bestimmt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Ziel-RQ im laufenden Prozess bestimmt wird.
- 20 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Ziel-RQ rechnerisch aus der Stöchiometrie des Stoffwechselweges bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der metabolische RQ
- 25 online durch die geeignete Kombination der Gasanalysewerte und in situ Messwerte wie pH und Temperatur bestimmt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Gasanalyse mittels Partialdruckmessung, Massen- und Volumenstrombestimmung oder einer
- 30 beliebigen Kombination von zwei oder mehr der genannten Parameter durchgeführt wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass kontinuierliche Zelllinien oder gentechnisch veränderte Zellen eingesetzt werden.

35

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es mit tierischen- oder pflanzlichen Zellen durchgeführt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Herstellung von Proteinen durchgeführt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentation zur Herstellung von Pharmaproteinen durchgeführt wird.
12. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 umfassend
- a) einen Fermenter (1);
 - b) ein Gasmischsystem (21);
 - c) Zuluftleitungen für Gas (3);
 - d) Abluftleitungen (4);
 - e) Messvorrichtungen zur Bestimmung der Sauerstoff und CO₂-Konzentration und des Massenflusses in der Zuluft (6-7) und in der Abluft (14-15) zur Ermittlung der Sauerstoffverbrauchsrate OTR (16) und der Kohlendioxidbildungsrate CTR (17);
 - f) Vorrichtung zur Messung des pH-Werts (12) und der Temperatur (13);
 - g) Vorrichtung zur Ermittlung des CER (18) und des metabolischen RQ (8) aus den Temperatur-, pH-, Sauerstoffkonzentrations- und Kohlendioxidkonzentrations-Werten;
 - h) ein RQ-Regler (20) zur RQ-basierten Regelung der Zufuhr von Kulturmedium und/oder Nährstoffen (9).

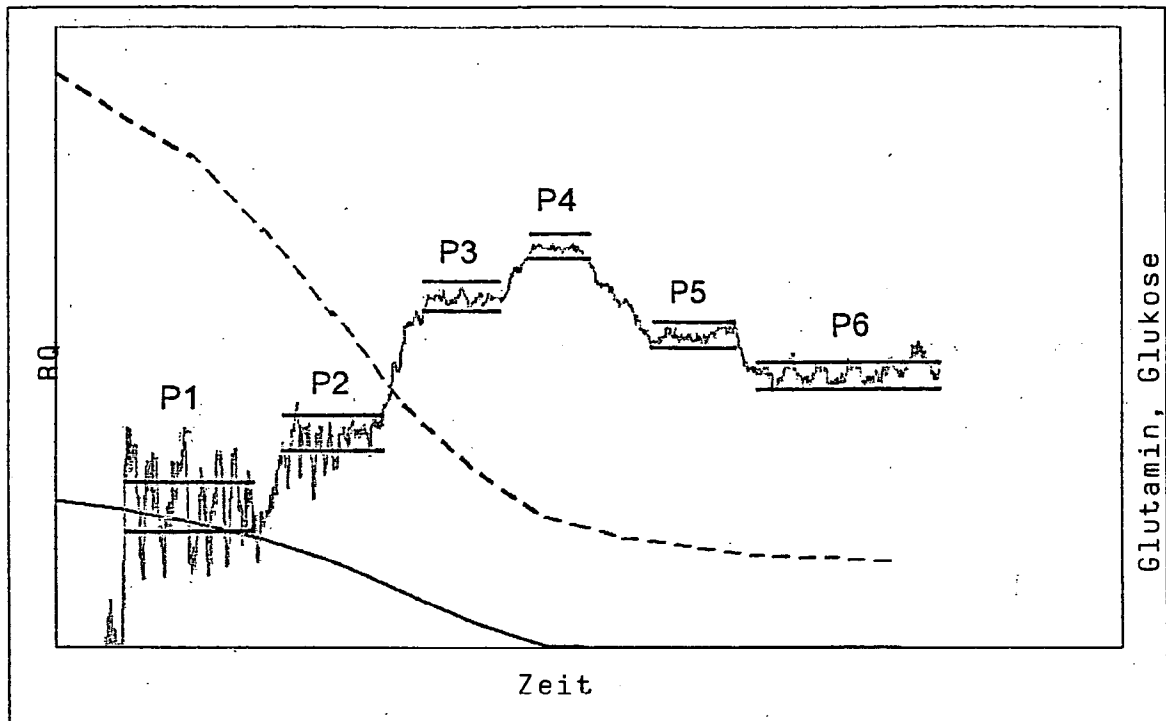


Fig. 1

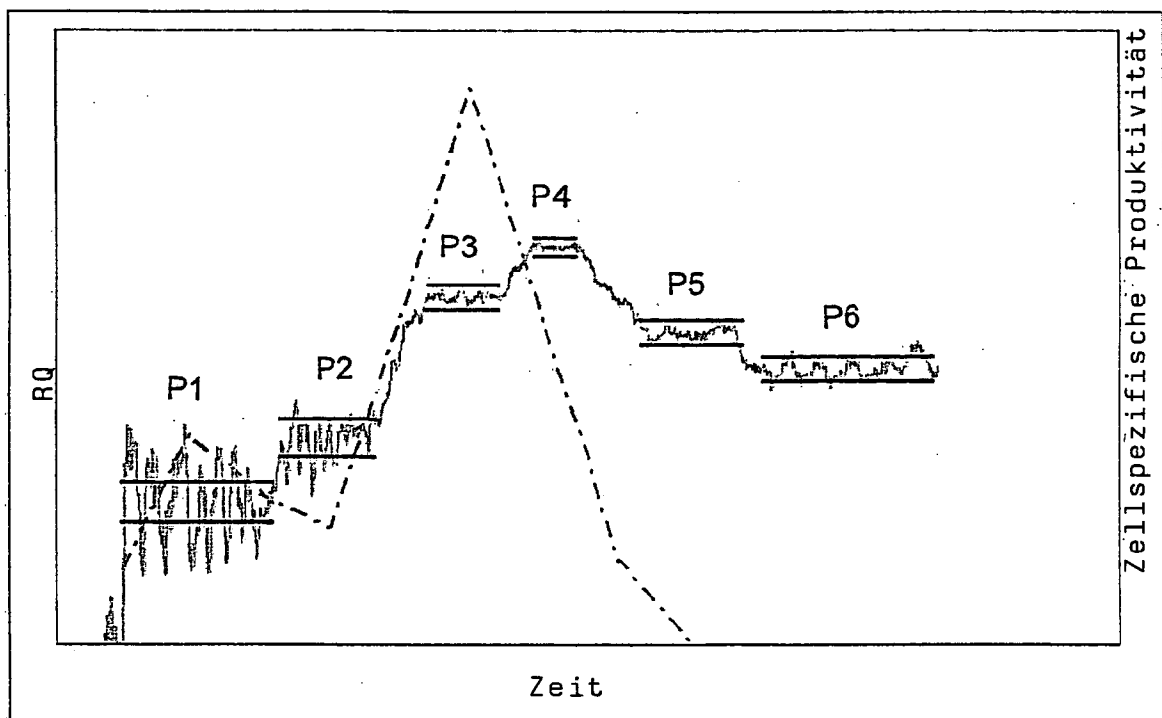


Fig. 2

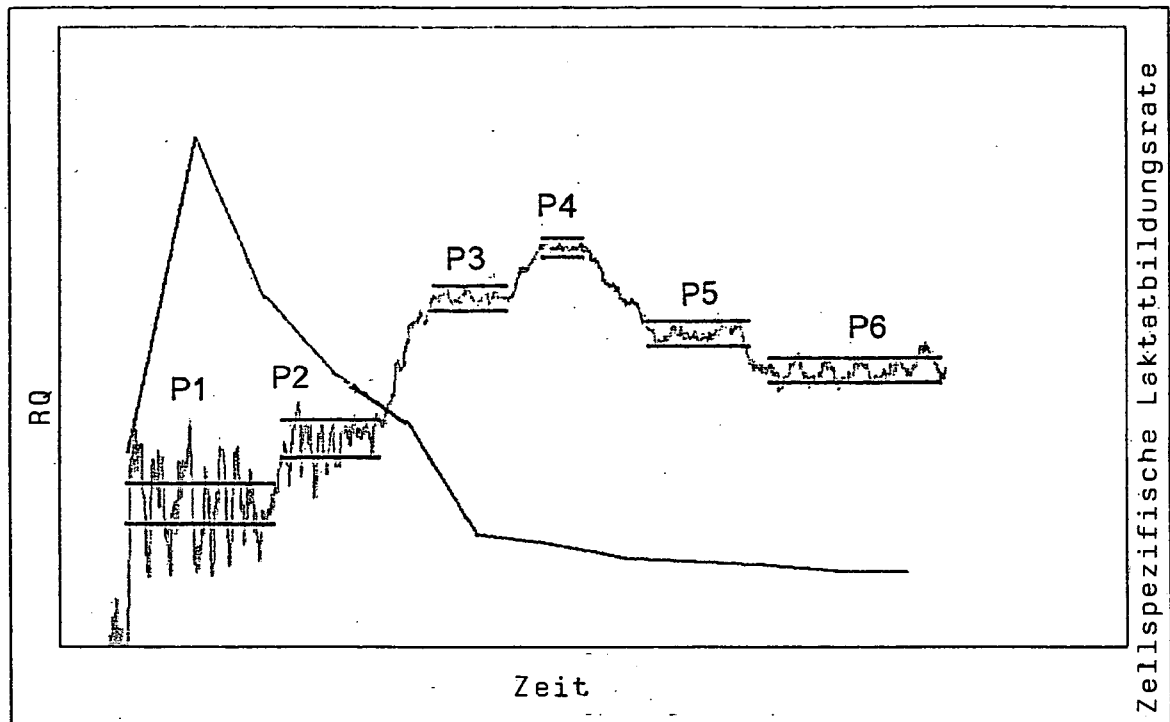


Fig. 3

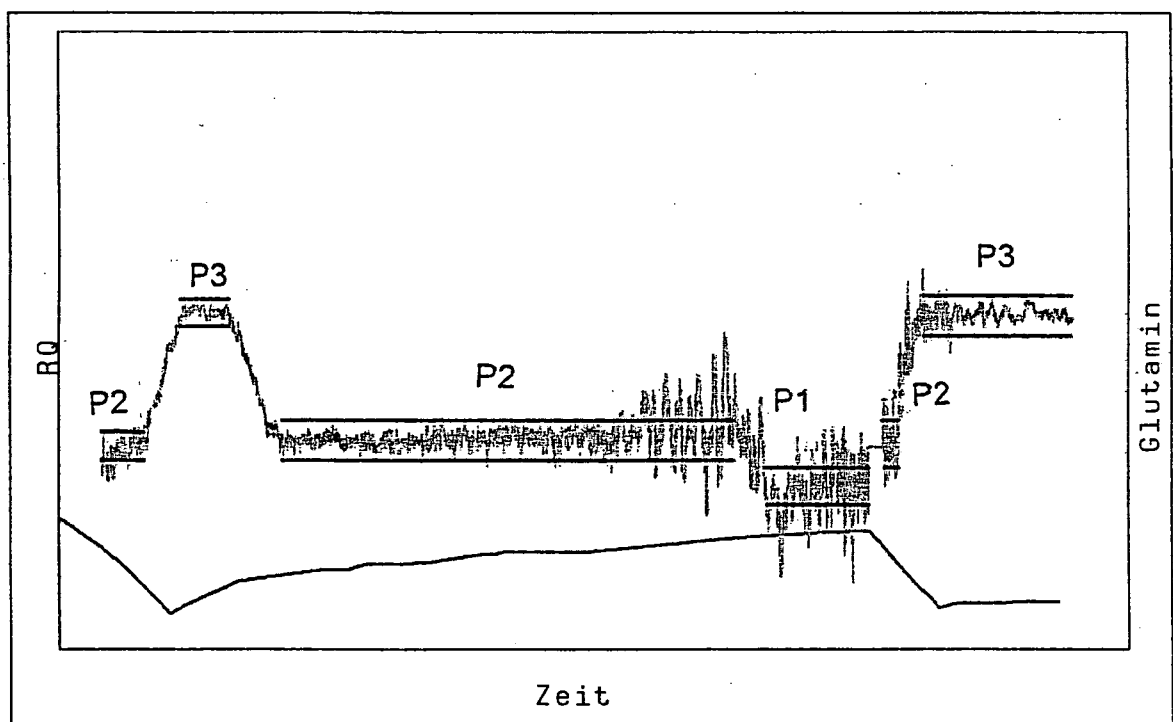


Fig. 4

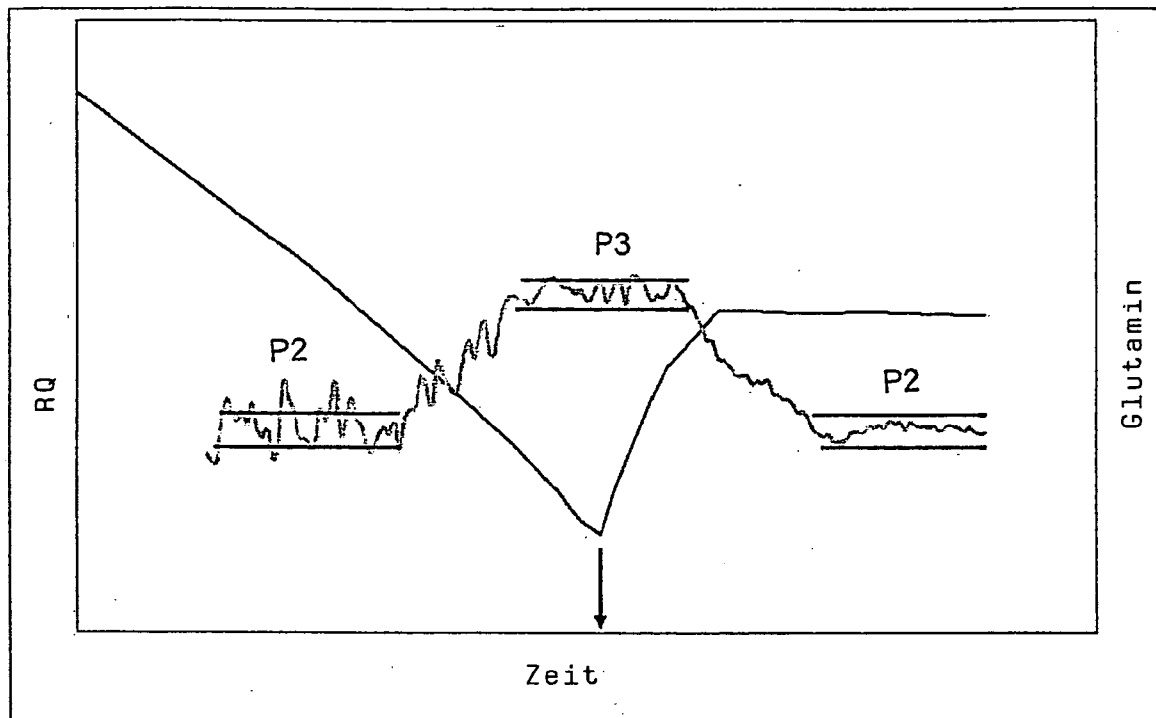


Fig. 5

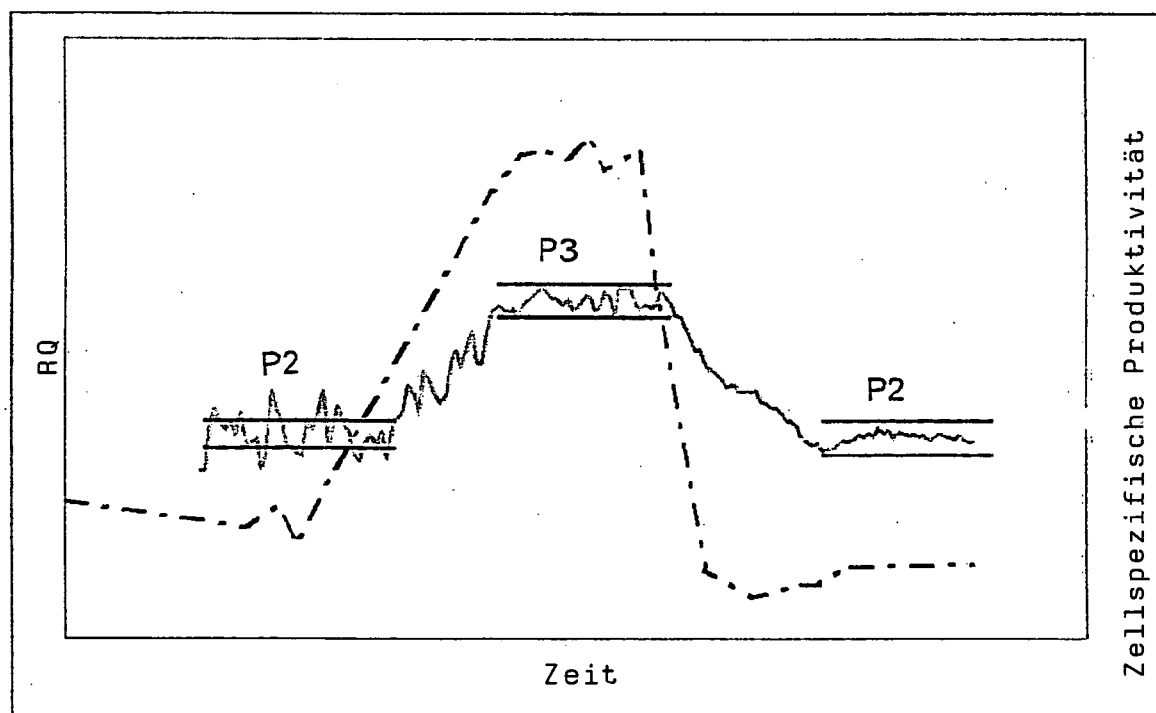


Fig. 6

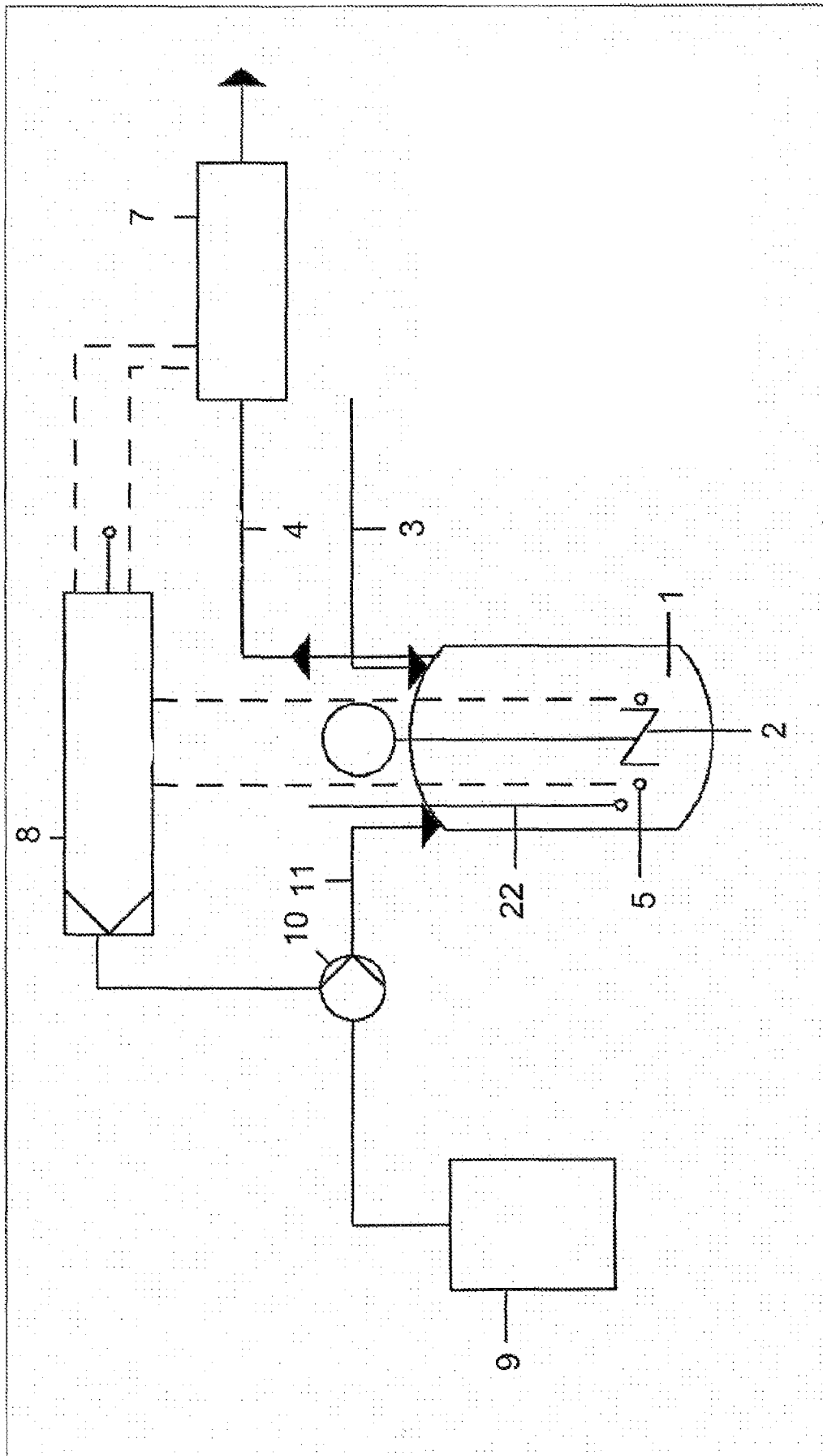


Fig. 7

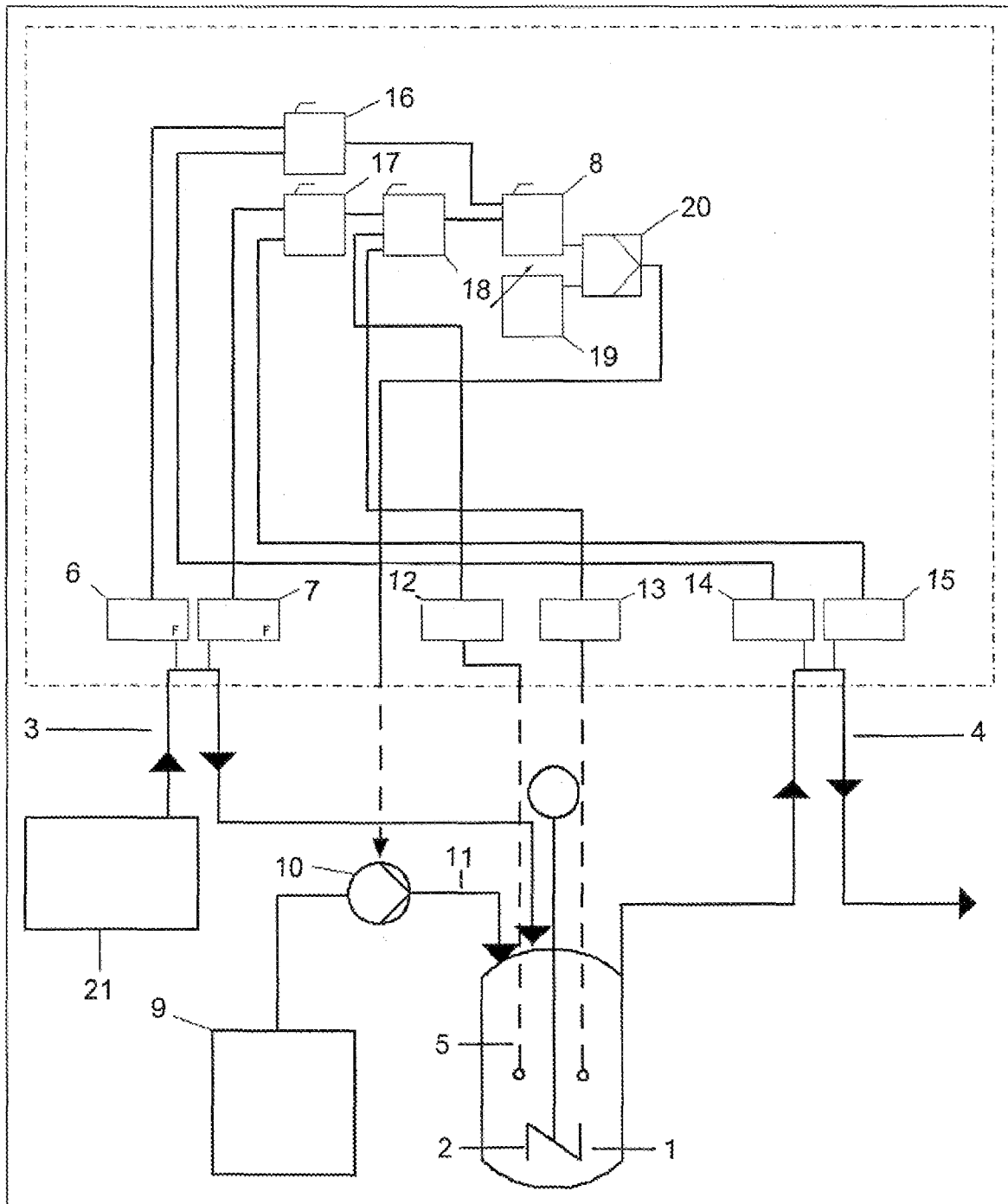


Fig. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/057378

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12M1/36 C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIDEAUX CARINE ET AL: "Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in Saccharomyces cerevisiae, using a metabolic model as a prediction tool" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 72, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 2134-2140, XP002507587 ISSN: 0099-2240 the whole document ----- -/--	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 Dezember 2008

Date of mailing of the international search report

30/12/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Dumont, Elisabeth

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/057378

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BURKE PATRICIA V ET AL: "A fermentor system for regulating oxygen at low concentrations in cultures of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 64, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 1040-1044, XP002507591 ISSN: 0099-2240 abstract figure 1	12
X	HITEC ZANG GMBH: "Bioprozessoptimierung im Schüttelkolben" INTERNET ARTICLE, [Online] 4 May 2007 (2007-05-04), XP002507588 Retrieved from the Internet: URL: http://web.archive.org/web/20070504033731/www.hitec-zang.de/de/fermentationstechnik/ramos.html [retrieved on 2008-12-09] the whole document	1-12
X	WANG H Y ET AL: "COMPUTER AIDED BAKERS YEAST FERMENTATIONS" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 19, no. 1, 1977, pages 69-86, XP002507589 ISSN: 0006-3592 abstract insbesondere figures 1,3; table II	1-12
X	AIBA S ET AL: "FED BATCH CULTURE OF <i>SACCHAROMYCES-CEREVISIAE</i> A PERSPECTIVE OF COMPUTER CONTROL TO ENHANCE THE PRODUCTIVITY IN BAKERS YEAST CULTIVATION" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 18, no. 7, 1976, pages 1001-1016, XP002507590 ISSN: 0006-3592 page 1002, last paragraph page 1010, last paragraph page 1012, last paragraph - page 1015, last paragraph	1-12
X	US 4 891 310 A (SHIMIZU NORIO [JP] ET AL) 2 January 1990 (1990-01-02) figure 5	1-12
A	CANZONERI M ET AL: "Atmungsaktivität von Säugerzellen: Kontinuierliche Onlineermittlung im Schüttelkolben" BIOFORUM, GIT VERLAG, DARMSTADT, DE, vol. 3, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 45-47, XP009109694 the whole document	1-12
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/057378

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	METTLER TOLEDO: "Echtzeitmessung im Fermenter" PHARMACEUTICAL NEWSLETTER 15, [Online] December 2006 (2006-12), pages 1-7, XP002507592 Retrieved from the Internet: URL: http://ch.mt.com/mt_ext_files/Editorial/Generic/0/Process_Pharma_Newsletters_2007_Editorial-Generic_1169470590318_files/Pharmaceutical_Newsletter_15_g_MTD.pdf [retrieved on 2008-12-09] the whole document	1-12
P,X	KARIN KOLLER: "Fermentation im Griff" CAV.DE CHEMIE-ANLAGEN + VERFAHREN, [Online] June 2008 (2008-06), page 20, XP002507593 Retrieved from the Internet: URL: http://www.cav.de/cav/live/cav_infopool/ha_artikel/detail/31487743.html [retrieved on 2008-12-09] the whole document	1-12
P,X	PROF. DR.-ING. WERNER ZANG: "Es ist angerichtet" CAV.DE CHEMIE-ANLAGEN + VERFAHREN, [Online] October 2007 (2007-10), page 62, XP002507594 Retrieved from the Internet: URL: http://www.cav.de/cav/live/cav_infopool/ha_artikel/detail/31208462.html [retrieved on 2008-12-09] the whole document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/057378

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4891310	A	02-01-1990	
		CN 86101928 A	24-09-1986
		DE 3688534 D1	15-07-1993
		DE 3688534 T2	20-01-1994
		EP 0196061 A2	01-10-1986
		JP 1987371 C	08-11-1995
		JP 7008231 B	01-02-1995
		JP 61219379 A	29-09-1986

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/057378

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12M1/36 C12P21/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12M C12P

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BIDEAUX CARINE ET AL: "Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in Saccharomyces cerevisiae, using a metabolic model as a prediction tool" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 72, Nr. 3, März 2006 (2006-03), Seiten 2134-2140, XP002507587 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument ----- -/--	1-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
11. Dezember 2008	30/12/2008

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Dumont, Elisabeth
--	--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/057378

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BURKE PATRICIA V ET AL: "A fermentor system for regulating oxygen at low concentrations in cultures of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 64, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 1040-1044, XP002507591 ISSN: 0099-2240 Zusammenfassung Abbildung 1	12
X	HITEC ZANG GMBH: "Bioprozessoptimierung im Schüttelkolben" INTERNET ARTICLE, [Online] 4. Mai 2007 (2007-05-04), XP002507588 Gefunden im Internet: URL: http://web.archive.org/web/20070504033731/www.hitec-zang.de/de/fermentationstechnik/ramos.html [gefunden am 2008-12-09] das ganze Dokument	1-12
X	WANG H Y ET AL: "COMPUTER AIDED BAKERS YEAST FERMENTATIONS" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 19, Nr. 1, 1977, Seiten 69-86, XP002507589 ISSN: 0006-3592 Zusammenfassung insbesondere Abbildungen 1,3; Tabelle II	1-12
X	AIBA S ET AL: "FED BATCH CULTURE OF <i>SACCHAROMYCES-CEREVISIAE</i> A PERSPECTIVE OF COMPUTER CONTROL TO ENHANCE THE PRODUCTIVITY IN BAKERS YEAST CULTIVATION" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 18, Nr. 7, 1976, Seiten 1001-1016, XP002507590 ISSN: 0006-3592 Seite 1002, letzter Absatz Seite 1010, letzter Absatz Seite 1012, letzter Absatz - Seite 1015, letzter Absatz	1-12
X	US 4 891 310 A (SHIMIZU NORIO [JP] ET AL) 2. Januar 1990 (1990-01-02) Abbildung 5	1-12
A	CANZONERI M ET AL: "Atmungsaktivität von Säugerzellen: Kontinuierliche Onlineermittlung im Schüttelkolben" BIOFORUM, GIT VERLAG, DARMSTADT, DE, Bd. 3, 1. Januar 2006 (2006-01-01), Seiten 45-47, XP009109694 das ganze Dokument	1-12

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/057378

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	METTLER TOLEDO: "Echtzeitmessung im Fermenter" PHARMACEUTICAL NEWSLETTER 15, [Online] Dezember 2006 (2006-12), Seiten 1-7, XP002507592 Gefunden im Internet: URL:http://ch.mt.com/mt_ext_files/Editorial/Generic/0/PROcess_Pharma_Newsletters_2007_Editorial-Generic_1169470590318_files/Pharmaceutical_Newsletter_15_g_MTD.pdf [gefunden am 2008-12-09] das ganze Dokument	1-12
P,X	KARIN KOLLER: "Fermentation im Griff" CAV.DE CHEMIE-ANLAGEN + VERFAHREN, [Online] Juni 2008 (2008-06), Seite 20, XP002507593 Gefunden im Internet: URL:http://www.cav.de/cav/live/cav_infopool/ha_artikel/detail/31487743.html [gefunden am 2008-12-09] das ganze Dokument	1-12
P,X	PROF. DR.-ING. WERNER ZANG: "Es ist angerichtet" CAV.DE CHEMIE-ANLAGEN + VERFAHREN, [Online] Oktober 2007 (2007-10), Seite 62, XP002507594 Gefunden im Internet: URL:http://www.cav.de/cav/live/cav_infopool/ha_artikel/detail/31208462.html [gefunden am 2008-12-09] das ganze Dokument	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/057378

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4891310	A	02-01-1990	
		CN 86101928 A	24-09-1986
		DE 3688534 D1	15-07-1993
		DE 3688534 T2	20-01-1994
		EP 0196061 A2	01-10-1986
		JP 1987371 C	08-11-1995
		JP 7008231 B	01-02-1995
		JP 61219379 A	29-09-1986