



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

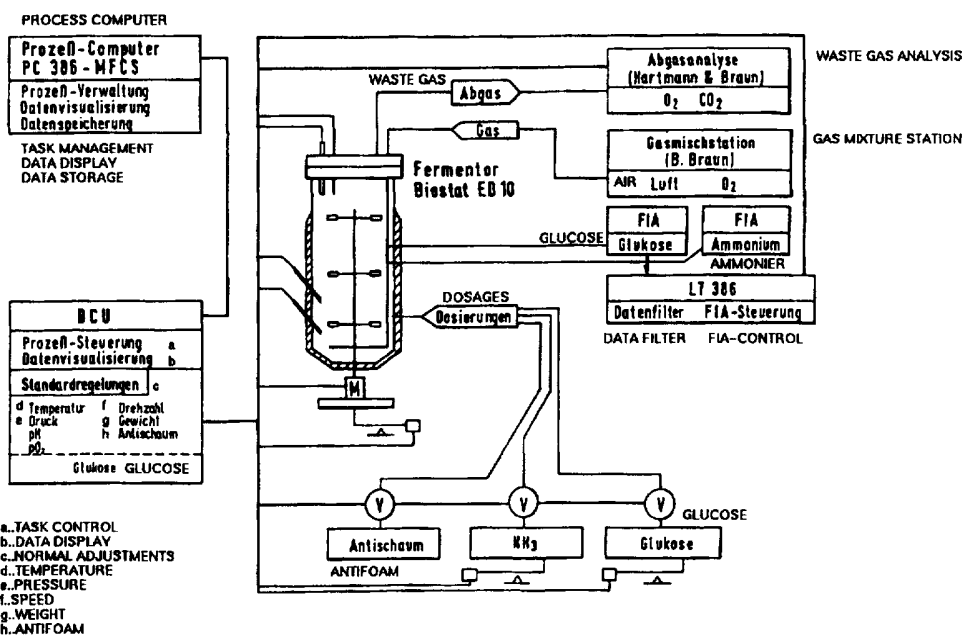
(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12P 21/02, C12N 15/72, 1/21, C07K 16/28 // (C12N 1/21, C12R 1:19)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/21829 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Juni 1997 (19.06.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05260 (22) Internationales Anmeldedatum: 28. November 1996 (28.11.96) (30) Prioritätsdaten: 95119478.6 11. December 1995 (11.12.95) EP (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw. (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STRITTMATTER, Wolfgang [DE/DE]; Neugasse 59, D-64372 Ober-Ramstadt (DE). MATZKU, Siegfried [DE/DE]; Wetzbach 24, D-64673 Zwingenberg (DE). RIESENBERG, Dieter [DE/DE]; Zenkerweg 3, D-07743 Jena (DE). HORN, Uwe [DE/DE]; Manniskestrasse 3, D-06567 Bad Frankenhausen (DE). KNÜPFER, Uwe [DE/DE]; Fritz-Ritter-Strasse 19, D-07747 Jena (DE). KUJAU, Marian [DE/DE]; Anna-Siemens-Strasse 55, D-07747 Jena (DE). WENDEROTH, Rolf [DE/DE]; Dorothea-Veit-Strasse 35, D-07747 Jena	(DE). PLÜCKTHUN, Andreas [CH/CH]; Möhrlistrasse 97, CH-8006 Zürich (CH). KREBBER, Anke [CH/CH]; Fliederstrasse 12, CH-8006 Zürich (CH). (74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, PL, RU, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	

(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF RECOMBINANT PROTEINS IN E.COLI BY HIGH CELL DENSITY FERMENTATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN PROTEINEN IN E. COLI MITTELS HOCHZELLDICHTE-FERMENTATION

(57) Abstract

The invention relates to a fed-batch fermentation method with particular host-vector systems of *E. coli* for effective formation of recombinant proteins, in particular recombinant antibody molecules, preferably antibody fragments such as mini antibodies. In the conditions given the *E. coli* cells can grow at the maximum specific growth rate to very high cell densities. When recombinant product formation starts, only the product formed acts in a limiting manner on growth. Growth limitation by substrates or metabolic by-products does not occur. Consequently, large amounts of recombinant proteins can be produced in relation to space and time.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Fed-Batch Fermentationsverfahren mit speziellen Wirts-Vektor-Systemen von *E. coli* zur effektiven Bildung rekombinanter Proteine, insbesondere rekombinanter Antikörpermoleküle, vorzugsweise Antikörperfragmente wie Miniantikörper. Unter den gegebenen Bedingungen können die *E. coli*-Zellen mit maximaler spezifischer Wachstumsrate bis zu sehr hohen Zelldichten wachsen. Nach Anschaltung der rekombinanten Produktbildung wirkt nur das gebildete Produkt begrenzend auf das Wachstum; eine Wachstumsbegrenzung durch Substrate oder metabolische Nebenprodukte erfolgt nicht. Auf diese Weise können hohe Raum-Zeit-Ausbeuten an rekombinanten Proteinen erzielt werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen in *E. coli* mittels Hochzelldichte-Fermentation

5 Die Erfindung betrifft ein Fed-Batch Fermentationsverfahren mit speziellen Wirts-Vektor-Systemen von *E. coli* zur effektiven Bildung rekombinanter Proteine, insbesondere rekombinanter Antikörpermoleküle, insbesondere Antikörperfragmente, wie z.B. Miniantikörper.

10 Unter den erfindungsgemäßen Bedingungen können die *E. coli*-Zellen mit maximaler spezifischer Wachstumsrate bis zu sehr hohen Zelldichten wachsen. Nach Anschaltung der rekombinanten Produktbildung wirkt nur das gebildete Produkt begrenzend auf das Wachstum; eine Wachstumsbegren-
15 zung durch Substrate oder metabolische Nebenprodukte erfolgt nicht. Auf diese Weise und in Verbindung mit den speziell hierfür angepaßten und hohe Stabilität aufweisenden neuen Expressionvektoren können hohe Raum-Zeit-Ausbeuten an rekombinanten Proteinen erzielt werden, die insbesondere
20 im Fall von Antikörperfragmenten hohe biologische Aktivität aufweisen.

Eine wesentliche Voraussetzung für effektive rekombinante Proteinbildungen ist die Kultivierung von *E. coli* - Zellen zu hohen Zelldichten. Hierfür
25 sind folgende Kultivierungen Stand der Verfahrenstechnik: Nach unlimitiertem Wachstum ($\mu = \mu_{\max}$) in der Batch-Phase wird üblicherweise in der sich anschließenden Fed-Batch-Phase eine Kohlenstoffquelle (Glucose oder Glycerin) so begrenzt zudosiert, daß die Bildung von wachstumsinhibitorischen Nebenprodukten wie z.B. Acetat vermieden wird mit der Konsequenz,
30 daß das Wachstum dann bis zum Erreichen hoher Zelldichten nur substratlimitiert ($\mu < \mu_{\max}$) fortgesetzt werden kann (z.B. Riesenberg et al., 1991. J. Biotechnol., vol.20, 17-28; Strandberg et al. 1994. FEMS Microbiol. Rev.,
35 vol.14, 53-56; Korz et al. 1995. J. Biotechnol.39, 59-65; EP-B-0 511 226). Wachstum mit reduzierter Wachstumsrate hat natürlich lange Fermen-

tationszeiten und somit folglich auch geringere Raum-Zeit-Ausbeuten zur Folge. Bei diesen Fermentationen ist aufgrund des sofortigen Verbrauchs die Konzentration der Kohlenstoffquelle in der Kulturlösung nahezu Null. Nach
5 Anschaltung der rekombinanten Produktbildung ändert sich an den substratlimitierten Verhältnissen nichts.

Es sind auch Fed-Batch Kultivierungen mit *E. coli* bekannt, bei denen die Kohlenstoffquelle diskontinuierlich in größeren Zeitabständen und dann in
10 größeren Mengen zugegeben wird, wobei meist ein Anstieg des pO_2 -Wertes als Indikator für die Substraterschöpfung zur Initialisierung der folgenden Dosierung der C-Quelle verwendet wird (z.B. Eppstein et al. 1989. Biotechnol. 7, 1178-1181). Diese Verfahrensweise bedeutet einen häufigen Wechsel
15 von längerfristigen Substratüberschußbedingungen zu Substratlimitbedingungen und impliziert somit metabolische Imbalancen.

Im folgenden wird auf Fed-Batch Kultivierungen eingegangen, bei denen die Zellen in der Fed-Batch-Phase mit maximaler spezifischer Wachstumsrate
20 ($\mu = \mu_{max}$) wachsen können. Fed-Batch Kultivierungen, bei denen nach off-line Bestimmungen größere Mengen an C-Quelle in größeren Zeitabständen der Kultur zur Vermeidung von Substratlimitationen zugegeben werden, sind experimentell aufwendig und haben den Nachteil, daß sich
25 während der gesamten Fermentation die Konzentration der C-Quelle ständig ändert (z. B. Pack et al. 1993. Biotechnol., vol. 11, 1271-1277, Hahn et al. 1994. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42, 100-107).

Es sind auch Fed-Batch Kultivierungen beschrieben, bei denen die Konzentration der C-Quelle on-line gemessen und geregelt wird, sodaß Limitationen
30 vermieden werden, obwohl sie - insbesondere im Hochzellldichtebereich - mit den nachfolgend beschriebenen Nachteilen behaftet sind. Unlängst ist ein autoklavierbarer Glucose-Biosensor zum Einsatz in mikrobiellen Fermentationen in Rührkesselfermentern beschrieben worden (M. R. Phelps et
35 al. 1995. Biotechnol. Bioeng., vol. 46, 514-524). Er wurde für *E. coli*-

Kulturen eingesetzt. Dieser in-situ-Sensor liefert in einer Zeitverzögerung von etwa 2 Minuten den aktuellen Wert in der Kulturlösung. Das vom Glucose-Sensor gelieferte Signal ist unter anderem pH- und pO_2 -abhängig. Im Hochzelllichtbereich $X > 80 \text{ g / l}$ ist der Sensor nicht erprobt. Erfahrungsgemäß können Bewachungen von in situ-Sonden mit *E. coli* bei sehr hohen Zelldichten zu weiteren Fehlwerten führen. Außerdem ist der Sensor während einer laufenden Fermentation nicht exakt rekalisierbar. Andere Verfahren basieren nicht auf Messungen mit einem in situ-Sensor, sondern gründen sich z.B. auf der Bestimmung der Kohlenstoffquellen mittels on-line-Fließinjektions-Analysatoren (FLA) oder on-line-HPLC in zellfrei gemachter Kulturlösung, die aus dem Fermenter semikontinuierlich entnommen und einer Filtration oder Mikrozentrifugation unterworfen wird (Kleman et al. 1991. Appl. Environ. Microbiol. 57, 910-917 und 918-923; Turner et al. 1994. Biotechnol. Bioeng. 44, 819-829). Vorhersage- und Rückkopplungs-Kontrollalgorithmen verringerten die Schwankungen der Glucosekonzentration beim Wachstum bis $X = 65 \text{ g/l}$ (Kleman et al. 1991. Appl. Environ. Microbiol. vol. 57, 910-917.). Im Bereich sehr hoher Zelldichten (ab ca. 80 g / l bis 150 g / l) wird die Separation von Zellen und Nährlösung zunehmend schwieriger und zeitaufwendiger, so daß auch die Zeitverzögerung zur Bestimmung des aktuellen Glucosewertes im Fermenter biomasseabhängig zunimmt und die Konstanzhaltung des Glucosespiegels erschwert bzw. unmöglich macht. Mit konstanter und kurzer Zeitverzögerung dagegen wird die Glucosekonzentration gemessen bei einer Apparatur, die auf diese Zellseparation verzichtet (Pfaff et al. 1995. p. 6-11. In: Proceedings of the 6th International Conference on Computer Appl. in Biotechnol. Garmisch-Partenkirchen, FRG). Nach Pfaff et al. wird in unmittelbarer Nähe der Probennahmestelle nach Verdünnung der Kultur mit einem Wachstumsinhibitor eine FIA mit enzymatisch-amperimetrischem Glucose-sensor zum Einsatz gebracht .

Bei der aeroben Kultivierung bilden *E. coli*-Zellen, die nicht durch Dosierungsregime zum substratlimitierten Wachstum gezwungen werden, üblicherweise verstärkt das metabolische Nebenprodukt Acetat (Riesenberg
5 1991. Curr. Opinion Biotechnol., vol. 2, 380-384.), das sich in der Nährlösung akkumuliert und in größeren Mengen wachstumsinhibitorisch wirkt (Pan et al. 1987. Biotechnol. Lett., vol. 2, 89-94). Deshalb sind bisher diese Fed-Batch-Kultivierungen zu hohen Zelldichten nur mit besonderen *E. coli*-
10 Stämmen möglich, deren Acetat-Akkumulation durch gezielte genetische Veränderungen reduziert wurde bei Tolerierung anderer damit verbundener Nachteile. Zu den Abkömmlingen von *E. coli* K12 gehören phosphotransacetylase-negative Mutanten (Bauer et al. 1990. Appl. Environ. Microbiol., vol.
15 56, 1296-1302; Hahm et al. 1994. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, 100-107.), die jedoch in Glucose-Mineralsalzmedien stark im Wachstum reduziert sind. Phelps und Mitarbeiter (s.o.) verwendeten als Wirt den *E. coli* Stamm TOPP5 für die nicht substratlimitierte Kultivierung bis zu einer
20 Biomasse von $X = 85$ g/l. Dieser *E. coli* Stamm, der offenbar nicht stark Acetat akkumuliert, ist jedoch kein K-12 Stamm. *E. coli* TOPP5 bildet Hämolysin und ist somit ein pathogener Stamm, der aus Sicherheitsgründen nicht als Wirt für die Bildung rekombinanter DNA-Produkte im Industriesektor in Frage kommt. Durch Transformation von *E. coli*-Zellen mit einem
25 Plasmid, das ein Gen zur Codierung von Acetolactatsynthase (ALS) enthält, konnte durch gezielte Reorientierung des intermediären Stoffwechsels eine Reduktion der Acetatakkumulation erzielt werden (San et al. 1994. In: Ann-N-Y-Acad-Sci, vol.721, 257-267). Diese Verfahrensweise ist aber mit dem
30 Nachteil behaftet, daß bei Verwendung eines ALS-codierenden Plasmides in Kombination mit einem zweiten, das "Produktions"-Gen tragenden Plasmids unter Hochzelldichtebedingungen üblicherweise Instabilitäten auftreten. Durch Plasmidinstabilitäten, die insbesondere bei der Kultivierung zu sehr
35

hohen Zelldichten verstärkt auftreten, wird die Effizienz von rekombinanten Produktbildungen häufig verringert.

Antikörper oder Antikörperfragmente, wie Fab', F(ab')₂, Miniantikörper oder
5 single-chain Fv's, erlangen im zunehmenden Ausmaß Bedeutung im medizinischen und biotechnischen Bereich. Unter Miniantikörper ist im folgenden erfindungsgemäß ein bivalenter oder bispezifischer über pseudo-Hinge-Region verknüpftes single-chain Fv-Fragment zu verstehen. Dabei kann es
10 wichtig werden, wie zum Beispiel in der Krebstherapie, große Mengen an Antikörpern (etwa 1 g / Dosis) zur Verfügung zu stellen. In *E. coli* können nun besonders leicht und gut monovalente Antikörperfragmente oder Fusionsproteine von diesen, bzw. multimere oder multispezifische Varianten
15 davon, hergestellt werden. Diese Fragmente bzw. Varianten weisen eine kleine Größe verbunden mit einer hohen spezifischen Bindungsfähigkeit auf. (z.B. Plückthun A.; 1992, Immunol. Rev. 130, 151-188; Pack et al, 1995, J. Mol. Biol. 246, 28-34). Proteine und insbesondere Antikörper müssen aber
20 richtig gefaltet sein, um biologisch und funktionell wirksam zu sein. Dieses Problem muß bei der Ausbeutebetrachtung von gebildetem Antikörperfragment pro Zelle in Zusammenhang mit der Zelldichte beachtet werden. Ferner spielt die Primärsequenz des Antikörpers eine wichtige Rolle bei der
25 Bestimmung der Ausbeute *in vitro* und der Faltung *in vivo* (Knappik A. und Plückthun A., 1995, Protein Engin. 8, 81-89). So werden z.B. Fab-Fragmente als unlösliche cytoplasmatische oder periplasmatische Aggregate exprimiert und *in vitro* rückgefaltet. So wird über Ausbeuten von etwa 0.14
30 g / l bei niedriger Zelldichte (Condra et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, 2292-2295) und bis etwa 1-2 g / l unlöslicher Antikörper bei mittlerer Zelldichte (Shibui et al, 1993, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 770-775) berichtet. Auch bivalente Miniantikörper (Pack et al., 1993, Biotechnol. 11, 1993, 1271-1277) können in biologisch-funktioneller Form in Ausbeuten von etwa
35

0.2 g / l in *E. coli* erhalten werden. Durchschnittlich sind bei diesen Ausbeuten ca. 5 - 45 % ordnungsgemäß rückgefaltet.

5 In den bekannten *E. coli*-Systemen wird die Fremdprotein-Bildung in der Regel auf geeignete Weise nach Erreichen angemessener Zelldichten entsprechend dem Expressionssystem durch ein regulierbares Promotersystem an-
geschaltet. Hier sind beispielsweise zu nennen (i) der *araBAD* Promoter in
Gegenwart des *AraC* Repressors (induzierbar durch Arabinose) (z.B. Better
10 et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90, 457-461), (ii) der *phoA*-
Promoter (induzierbar durch Phosphat-Entzug) (z.B. Carter et al, 1992,
Biotechnol. 10, 163-167), und (iii) das *lac*-Promotersystem (induzierbar
durch IPTG) (Pack et al, 1993, l.c.). Das *lac*-System, das in der Regel eine
15 gute Expression bewirkt, hat aber den Nachteil, daß einerseits eine uner-
wünschte Grundexpression vor Induktion des Promoters und andererseits eine
Plasmidinstabilität nach Induktion mit IPTG zu beobachten ist.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird ein spezieller
20 Vektor (pHKK) beschrieben, der als Fremdgen Sequenzen enthält, die für
Fragmente des murinen bzw. humanisierten Antikörpers MAb 425 codie-
ren. MAb 425 (ATCC HB 9629) ist ein muriner monoklonaler Antikörper,
der aus der bekannte menschlichen A432 Krebszelllinie (ATCC CRL 1555)
25 isoliert wurde und an das Epitop des humanen epidermischen Wachstums-
faktor-Rezeptors (EGFR, ein Glycoprotein von etwa 170 kD) bindet unter
Inhibierung der Bindung des natürlichen Liganden EGF. Es ist gezeigt wor-
den, daß MAb 425 cytotoxische Wirkung auf Tumorzellen hat, bzw. diese
30 am Wachstum zu hindern vermag (Rodeck et al., *Cancer Res.* 1987. 47:
3692). Aus der WO 92/15683 sind humanisierte sowie chimere Formen des
MAb 425 bekannt, einschließlich der DNA- und Aminosäuresequenzen ihrer
leichten und schweren Ketten.

35

5 Ziel der Erfindung war es nun, ein Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen, insbesondere Antikörperfragmenten, in rekombinanten *E. coli*- Zellen unter Hochzelldichte-Bedingungen (HCDC = High Cell Density Culture) mit hohen Raum-Zeit-Ausbeuten und ohne wesentliche Wachstumsbeeinträchtigung durch Substrate oder Metaboliten und ohne
10 nennenswerte Plasmidverluste, bzw. Plasmidinstabilitäten unter Gewährleistung eines großen Prozentsatzes an wirksamer biologischer Aktivität (Bindungsfähigkeit, korrekte Faltung) des exprimierten Proteins zur Verfügung zu stellen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist ein mehrstufiges Batch-Verfahren, daß sich in erster Linie dadurch auszeichnet, daß die Zellen während des gesamten
15 Batches maximal wachsen können ($\mu = \mu_{\max}$). So können mit dem beschriebenen Verfahren letztlich Zelldichten von 100 bis 150 g / l (Bio-trockenmasse) erreicht werden. Das Wachstum wird auch nicht wesentlich durch Acetat-Akkumulation inhibiert, da eine solche unter den gewählten
20 Bedingungen überraschenderweise nicht besonders ausgeprägt ist, insbesondere bei Verwendung von *E. Coli*- Stämmen, die ohnedies nur zu verminderter Acetatbildung während der Fermentation neigen. Dies wird auch unter einer Reihe anderer zusätzlicher Maßnahmen vorallem dadurch erreicht, daß
25 in der einer Batch-Phase nachgeschalteten Fed-Batch-Phase die Konzentration der Kohlenstoffquelle im Medium in einem definierten Bereich unter Beibehaltung von unlimitiertem Wachstum der Zellen konstant gehalten wird. Durch entsprechende Gestaltung des entsprechenden Expressionsvektors kann auch die unerwünschte Basalexpression von Protein vor Anschal-
30 tung der Proteinsynthese durch ein regulierbares Promotersystem nahezu ausgeschaltet werden, ebenso wie der zum Teil erhebliche Plasmidverlust, der, wie oben bereits erwähnt, normalerweise in Expressionssystemen mit starken Promotern wie z.B. das *lac*-Promotersystem, zu beobachten ist.
35

Es können durchschnittlich Proteinausbeuten von 3 bis 5 g / l nach ca. 25 bis 35 Stunden Gesamtkultivierung erreicht werden. Im Falle der wegen ihrer Faltungskriterien besonders kritischen Antikörperfragmente, insbesondere Miniantikörper, sind etwa 80 % des synthetisierten Materials biologisch
5 aktiv und korrekt gefaltet.

Gegenstand der Erfindung ist somit Verfahren zur Herstellung von Fremdprotein in *E. coli*- Zellen, die mit einem das Fremdgen und einen induzierbaren Promoter tragenden Plasmid transformiert wurden, mittels
10 Hochzelldichtefermentation über Batch- und Fed-Batch Stufen ohne jegliche Wachstumsbegrenzung durch Substrate oder metabolische Nebenprodukte, und Isolierung und Aufreinigung des exprimierten Proteins aus dem Kulturmedium, wobei die Konzentration an Substraten in der Fed-Batch Phase über ein kontinuierliches automatisches oder semi-automatisches Analyse- und Zugabesystem gesteuert wird, wobei in der Fed-Batch Phase (i) die
15 Konzentration der Kohlenstoffquelle im Medium in einem Bereich zwischen 0.1 g / l und 25 g / l unter Beibehaltung von unlimitiertem Wachstum der Zellen ($\mu = \mu_{\max}$) konstant gehalten wird, (ii) die Produktion des Fremdproteins innerhalb besagter Fed-Batch-Phase bei einer Zelldichte zwischen 10 und 80 g / l durch Induktion des Promoters gestartet wird, und (iii)
20 nach erfolgter Produktsynthese-Induktion verwertbarer Stickstoff und Phosphat sowie Salze von Spurenelementen kontinuierlich zugefüttert werden, wobei (iv) während der gesamten Fed-Batch Phase der pO_2 -Wert durch entsprechende Sauerstoffeinleitung in die Fermentationsbrühe zwischen 5 und
25 25 % eingestellt wird.

Die erfindungsgemäßen Werte für die erforderliche Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Fed-Batch-Phase liegt in einem Bereich zwischen 0.1 g bis 25 g / l. Ein bevorzugter Bereich liegt zwischen 0.5 und 15 g
35 / l, insbesondere zwischen 1.0 bis 5 g / l, bzw. zwischen 1.0 bis 3 g / l. Die besonders bevorzugte Konzentration ist 1.5 g / l. Als Kohlenstoffquelle sind

vorzugsweise Glucose oder Glycerin oder Gemische aus beiden zu nennen. Erfindungsgemäß erfolgt die Zugabe der Kohlenstoffquelle mittels eines automatischen oder halbautomatischen Zugabe- und Analysesystems in kontinuierlicher Weise (on-line). Vorzugsweise wird ein on-line Fließinjektionsanalyse-System (FIA) eingesetzt.

Die Zufütterung von verwertbarem Stickstoff, vorzugsweise Ammonium-Stickstoff und Phosphat, beispielsweise Diammoniumhydrogenphosphat oder Ammoniumdihydrogenphosphat, sowie Spurenelementen, beispielsweise im Medium lösliche Salze von Bor, Mangan, Kupfer, Molybdän und Kobalt Eisen oder Zink, erfolgt in der der Batch-Phase nachgeschalteten Fed-Batch-Phase, vorzugsweise nach Anschaltung der Proteinsynthese durch den regulierbaren Promoter bei einer Zelldichte von 50 bis 80 g / l (Biotrockenmasse), vorzugsweise bei etwa 70 g / l bei einer Gesamtwachstumsrate von 100 bis 150, vorzugsweise 140 g / l.

Das Anschalten der Proteinsynthese durch Aktivierung des regulierbaren Promotersystems erfolgt erfindungsgemäß bei einer Zelldichte von 10 bis 80 g / l, vorzugsweise zwischen 20 bis 60 g / l; ganz besonders bevorzugt ist der Bereich von 40 bis 50 g / l.

Der Partialsaurestoffdruck liegt während der Fed-Batch-Phase zwischen 5 und 25%, vorzugsweise zwischen 15 und 25%, ganz besonders bevorzugt bei 20 %.

Der pH-Wert des Fermentationsmediums ist erfindungsgemäß während des gesamten Batches zwischen 6.5 und 7.0, vorzugsweise zwischen 6.7 und 6.9, insbesondere bei 6.8, einzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein entsprechendes Verfahren bei dem ein Expressionsvektor mit einer von zwei Terminatorsequenzen flankierten das Fremgen enthaltenden Expressionskassette eingesetzt wird. Diese Terminator-Sequenzen, insbesondere die "upstream" positionierte, verhindern er-

folgreich eine unerwünschte Expression von Protein vor der Anschaltung durch das Promotersystem. Besonders geeignet ist der Terminator t_{hp} (Nohno et al., 1988, J. Bacteriol. 170, 4097-4102) aber auch andere bekannte Terminator-Sequenzen können eingesetzt werden.

5

Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem der verwendete Expressionsvektor zusätzlich ein Suizidsystem enthält. Das Suizidsystem produziert ein Protein, welches ohne das Vorhandensein des Plasmids in der Zelle für diese toxisch ist. Geeignete Suizidsysteme sind in der Literatur bekannt. Ein für die Erfindung besonders geeignetes Suizidsystem ist das *hok-sok*-System (z. B. Gerdes K., 1988, Biotechnol. 6, 1402-1405). Für das Verfahren zur effektiven Bildung rekombinanter Proteine, insbesondere von Antikörpermolekülen, ist es nämlich wichtig, daß das Wirtsvektor-System sich im Hochzelllichtbereich durch eine hohe Plasmidstabilität, geringe rekombinante Basalexpression und hohe Produktbildung auszeichnet. Suizid-Systeme in Kombination mit rekombinanten, durch Terminatoren flankierten Expressionskassetten sind dabei vektorspezifisch.

10

15

20

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein entsprechendes Verfahren, bei dem ein Fremdgen eingesetzt wird, das für ein Antikörperfragment, insbesondere einen Miniantikörper codiert

25

Weiter ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem Expressionsvektoren mit zusätzlichen, unten beschriebenen Merkmalen eingesetzt werden.

30

Prinzipiell sind die meisten bekannten, für die Rekombinationstechnik und für die Produktion im technischen Maßstab geeigneten *E. coli*- Stämme einsetzbar. Vorteilhafterweise finden solche Stämme bevorzugte Verwendung, die bei Wachstum zu hohen Zelldichten relativ wenig Acetat akkumulieren. Besonders geeignet sind Stämme, die eine Acetatanreicherung von unterhalb 5 g / l aufweisen. Überraschenderweise kann durch die gewählten Bedingungen des erfindungsgemäßen Verfahrens die Acetatakkumulation beson-

35

ders tief gehalten werden. Besonders geeignet in dieser Hinsicht ist der allgemein bekannte und käuflich erhältliche *E. coli*-Stamm RV308 (ATCC 31608) sowie seine wirkungsgleichen Varianten.

5 Gegenstand der Erfindung ist so insbesondere ein entsprechendes Verfahren, bei dem ein *E. coli*-Stamm mit einer Acetat-Akkumulation von unter 5 g / l im Kulturmedium während der Fermentation eingesetzt wird.

10 Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein *E. coli*-Expressionsvektor, geeignet für die Expression von Fremdproteinen unter Hochzelldichtefermentations-Bedingungen, der folgende Merkmale aufweist:

- (i) eine „upstream“- und eine „downstream“- Terminatorsequenz,
- 15 (ii) das lac Promoter/Operatorsystem,
- (iii) T7g10- Shine Delgarno-Sequenz,
- (iv) die pelB- oder ompA-Signalsequenz,
- (v) die Sequenz des Fremdgens,
- 20 und in einer bevorzugten Ausführungsform zusätzlich, ein Suizidsystem, insbesondere das *hok-sok*-Suizidsystem.

Erfindungsgemäß kann das Promotersystem auch durch andere geeignete, beispielsweise oben genannte Systeme ersetzt werden. Ebenso werden von
25 der Erfindung auch andere gleichwirkende Signal-und Steuerungssequenzen umfaßt.

Als spezielle Ausführungsformen sind letztlich Gegenstand der Erfindung
30 der durch seine Konstruktion definierte Expressionsvektor pHKK (Abb. 2), der die Sequenzen für den Miniantikörper, welcher sich aus MAb 425 ableitet, enthält, sowie ein spezieller rekombinater *E. coli*-Wirt RV308[pHKK].

35

Beschreibung der Abbildungen:

Abb. 1: Experimenteller Versuchsaufbau des Bioreaktors zur Herstellung von Proteinen unter Hochzell-dichte-Bedingungen. Das System ist mit einer Meß-, Anzeige-, Kontroll- und Dosierungsvorrichtung ausgestattet.

Abb. 2: Optimierter Expressionvektor pHKK sowie Teilstücke seiner Konstruktion. Der Vektor setzt sich im wesentlichen aus Teilstücken der bekannten Vektoren pASK40, pAK100 und pKG1022 zusammen.

Abb. 3(a-d): HCD-Kultivierung von rekombinanten *E. coli* am Beispiel von *E. coli* RV308[pHKK]: zeitlicher Verlauf von Biomasse, Glucose, Ammonium-Stickstoff, Phosphat, Acetat, Rührergeschwindigkeit, pO_2 , O_2 und CO_2 im Abgas, Plasmidstabilität (ausgedrückt durch % von β -lactamase-positive Kolonien) und Bildung von Protein (hier: scFv_{425dhlx}). Die Batch- und Fed-Batch-Phasen sind in 5 Subphasen unterteilt. Der IPTG-Pfeil gibt den Start der Proteinproduktion an.

Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet transformierte *E. coli*- Wirtszellen. Die ausgewählten Plasmidkonstruktionen richten sich nach der Art des zu exprimierenden Proteins. Besonders günstige Merkmale solcher Plasmidkonstruktionen werden weiter unten beschrieben. Die für die Plasmid-Konstruktion und die Wirtszellen-Transformation erforderlichen Techniken und Methoden sind allesamt bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (z.B. Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor). Sie sind zudem anhand der besonderen Ausführungsformen der Erfindung in den Beispielen dargelegt. Ausgangsplas-

mide oder Plasmidteile sind entweder käuflich erhältlich oder können nach Standardmethoden auf Basis von bekannten Konstruktionsschemata ohne weiteres konstruiert werden.

5

10

15

20

25

30

35

Die vorangeschaltete Batch-Phase einer typischen erfindungsgemäßen Fermentation von transformierten *E. coli* Zellen ist in zwei Subphasen unterteilt. Nach Animpfung mit einer entsprechenden Vorkultur ist Subphase I gekennzeichnet durch eine Lag-Phase, in der sich die Zellen adaptieren und die Wachstumsrate μ anschließend auf $\mu_{\max}$ ansteigt. Während der Subphase II wachsen die Zellen exponentiell bei $\mu = \mu_{\max}$. Nach einem Abfall von pO_2 von 100% Sättigung auf unter 5-15 % wird der pO_2 -Wert durch Kontrollieren der Geschwindigkeit des pO_2 -Rührers auf vorzugsweise auf pO_2 -Werte zwischen 15 bis 25%, insbesondere um 20 % eingestellt (Abb. 3c). Diese Einstellung (durch Einleiten von mit reinem Sauerstoff angereicherter Luft) sollte etwa nach 6 bis 12 Stunden nach Beginn der Fermentation der Hauptkultur vorgenommen werden. Die Glucose-Konzentration, die anfänglich vorzugsweise zwischen 20 bis 35 g / l gelegen ist, sinkt bis zum Ende der Subphase II, welche auch das Ende der der Fed-Batch-Phase vorangeschalteten Batch-Phase darstellt, ab. Dabei sollten Werte von 0.1 g / l auf keinen Fall unterschritten werden. Dies wird von nun an verhindert durch entsprechendes Zufüttern von Glucose (Subphase III, Abb. 3a, Start der Fed-Batch-Phase). Erfindungsgemäß wird der Glucosewert zwischen 0.1 und 25 g / l, vorzugsweise aber zwischen 1 und 3 g / l konstant gehalten werden. Hierzu kann beispielsweise das Zufütterungsmedium FS1 (Tab. 1) verwendet werden. Da dieser Glucose-Konzentrationsbereich weit genug über dem K_s -Wert für Glucose liegt (Bergter, 1983, "Wachstum von Mikroorganismen", S. 41, Gustav Fischer Verlag, Jena), können die Zellen weiterhin bei $\mu_{\max}$ wachsen. Die Kontrolle und Regelung der Glucosekonzentration erfolgt erfindungsgemäß mit einem automatischen oder halbautomatischen System.

Besonders geeignet sind Fließinjektionsanalysator-Systeme im on-line-Betrieb. Rein manuelle oder weitgehend manuelle Systeme haben sich als ungünstig erwiesen. Die Fed-Batch-Phase beginnt etwa zwischen der 15. und 22. Stunde, hängt aber letztlich von verschiedenen individuellen Faktoren wie Temperatur, Medienzusammensetzung und -Konzentration, Reaktorgroße usw. ab, insbesondere aber auch von der Art des verwendeten *E. coli*-Stammes. Vorteilhafterweise erfolgt etwa 4 bis 8 Stunden nach Beginn der Fed-Batch-Phase das Anschalten der Synthese des Fremdproteins. Der genaue Zeitpunkt richtet sich aber letztlich nach der zu diesem Zeitpunkt bereits erreichten Zelldichte der Kultur. Zelldichten zwischen 10 und 80 g / l, vorzugsweise zwischen 20 und 60 g / l sind besonders günstig, falls finale Zelldichten von 100 bis 150 g / l erreicht werden können. Allgemein günstig für das Starten der Proteinsynthese ist es somit, wenn etwa 10 bis 60 % der maximal zu erreichenden Zelldichte zum Induktionszeitpunkt vorliegen.

Die Proteinsynthese wird durch Anschalten des regulierbaren Promotersystems bewirkt. Dieses Anschalten erfolgt je nach verwendetem System in der Regel durch Zugabe einer Substanz oder durch Veränderung einer physikalischen Größe. Im Falle des bevorzugten lac-Systems (Promoter, Operator, Induktor) durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-thio-galactopyranosid). Das weitere Wachstum der Zellen ist jetzt nur noch durch das sich akkumulierende Produkt begrenzt. Deshalb ist es erfindungsgemäß wichtig, daß vor Induktion keine nennenswerte Basalexpression stattfinden kann, die auf das Gesamtwachstum und damit auf die Gesamtausbeute einen ungünstigen Einfluß ausüben würde. Dies wird erfindungsgemäß dadurch bewerkstelligt, daß die Expressionskassette in dem Plasmid von wirksamen Terminatorsequenzen flankiert wird.

Ab dem Zeitpunkt der Glucose-Zufütterung verarmt das Fermentationsmedium an Stickstoff und Phosphat (Abb. 3a,b). Um Limitationen jeglicher Art zu vermeiden, wird Stickstoff und Phosphat vorzugsweise ebenfalls über ein

entsprechendes kontinuierliches Verfahren zugefüttert. Stickstoff wird zweckmäßigerweise in Form von Ammoniumsalzen zugeführt, da hierdurch gleichzeitig auch auf den pH-Wert Einfluß genommen werden kann (6.5 bis 7.0, vorzugsweise 6.8). Beispielsweise eignet sich die Lösung FS2 (Tab. 1).
5 Subphase IV ist gekennzeichnet durch erfindungsgemäßer Zuführung von Spurenelementen (z.B. Bor, Mangan, Eisen, Cobalt, Molybdän, Zinn) in Form ihrer löslichen Salze. Die Zugabe erfolgt in der Regel kontinuierlich mit einer konstanten Rate. Subphase V ist gekennzeichnet durch ein vermindertes Wachstum, in erster Linie bedingt durch Produktakkumulation. Außerdem ist ein geringfügiges Ansteigen der Acetatkonzentration zu beobachten. Dennoch ist die Acetatakkumulation bzw. -Konzentration im Medium überraschend niedrig. Dies ist auch auf die speziellen Verfahrensbedingungen
10 zurückzuführen. *E. coli*-Stämme mit einer maximalen Acetatanreicherung von < 5 g / l während der Fermentation verstärken diesen Effekt noch deutlich.

Die Ausbeuten an Protein variieren je nach Art des Proteins durchschnittlich zwischen 2 und 6 g / l. Davon sind, wiederum je nach Art des Proteins, zwischen 50 und 95 % biologisch aktiv. Im Falle von Antikörperfragmenten erhält man über 80 % rückgefaltetes Protein. Diese Werte übersteigen deutlich die bisher im Stand der Technik beschriebenen vergleichbaren Verfahren.
25

Vorzugsweise können mit dem geschilderten Verfahren unter Einbezug der speziell hierfür konstruierten und angepaßten Expressionsplasmide Antikörperfragmente, insbesondere Miniantikörper, effektiv hergestellt werden. Aber auch die Herstellung vieler anderer Proteine, Fusionsproteine oder Enzyme ist gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens in vorteilhafter Weise möglich. Beispiele für solche geeigneten Proteine sind Hybridstreptokinase, Glucosedehydrogenase oder auch Proteine, die Wirkung auf die Blutgerinnung haben, wie z. B. Hirudin, Thrombin, Hementin oder Theromin.
30
35

Tabelle 1: Zusammensetzung der Medien; FS1, FS2 und FS3 stellen die Zufütterungs-Medien dar, die in den verschiedenen Subphasen der Fed-Batch-Phase verwendet werden.

	Verbindung	Vorkult- ur- Medium mg / l	Haupt- Kultur- Medium mg / l	FS1 mg / l	FS2 mg / l	FS3 mg / l
1	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.6×10^3				
2	K_2HPO_4	3×10^3	16.6×10^3			
3	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$		4×10^3		227×10^3	
4	$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$				169.5×10^3	
5	NH_4Cl	1×10^3				
6	NaCl	5×10^2				
7	Zitronensäure		2.1×10^3			
8	Fe(III)-citrat-hydrat	60.0	75.0			5×10^3
9	H_3BO_3	3.0	3.8			250
10	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	15.0	18.8			125
11	$\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.4	10.5			700
12	$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1.5	1.9			125
13	$\text{Na}_2\text{MO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2.5	3.1			213
14	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	2.5	3.1			213
15	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.0	10			668
16	Glucose	10×10^3	25×10^3	670×10^3		
17	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	600	1.5×10^3	19.8×10^3		
18	Ampicillin	100	100			

Beispiel 1:

Zur Herstellung eines rekombinanten *E. coli*-Wirts wurde der prototrophe *E. coli*-K12-Stamm RV308 (lac74-galISII::OP308strA), (Maurer et al., 1980, J. Mol. Biol. 139, 147-161; ATCC 31608) verwendet. Die Transformation mit einem zur Expression geeigneten Vektor sowie alle anderen erforderlichen DNA-Manipulationen erfolgten, sofern nicht anderswo erläutert, nach Standardmethoden. Plasmidfreie *E. coli* RV308 Zellen wurden als Kontrolle in einer entsprechenden Hochzelldichte-Fermentation eingesetzt.

Der Vektor pHKK wurde, wie folgt, konstruiert (Abb. 2): das kleine MluI-Fragment aus pAK100 (Krebber u. Plückthun, 1995), das den starken transkriptionalen Terminator t_{HP} (Nohno et al., s. o.) in der "upstream"-Region von lac p/o enthält, wurde in das Plasmid pASK40 (Skerra et al., 1991, Biotechnol. 9, 273-278) inseriert. Die Insertion von *hok-sok* DNA wurde durch zwei weitere Klonierungsschritte bewerkstelligt: das *aphA*-Gen aus pKG1022 (Gerdes, 1988, s. o.) wurde durch zweifache Verdauung mit XhoI und EcoRI entfernt, mit DNA Polymerase I (Klenow Fragment) aufgefüllt und religiert. In einem zweiten Schritt wurde das modifizierte BamHI-Fragment aus pKG1022 in die einzige BamHI-Schnittstelle des ersten Klonierungsproduktes kloniert. Der Miniantikörper stammt von einem single-chain Fragment ab, in dem die variablen Domänen in V_H - V_L -Richtung mit einem flexiblen Linker (gly₄ser)₃ verbunden wurden, gefolgt von einer prolinreichen Hinge-Region und einer abgewandelten "helix-turn-helix"-Domäne (dhlx) (Pack et al., 1993, Biotechnol. 11, 1271-1277). Die DNA-Sequenzen, Primer, Amplifikationen und Klonierungen der leichten und schweren Kette von murinem/humanisiertem MAb 425 ist in der WO 92/15683 ausführlich beschrieben. Zur Sekretion des scFv425dhlx-Fragmentes in das Periplasma wurde die V_H -Domäne N-terminal an die *pelB*-Signalsequenz fusioniert. Die T7g10-Ribosomen-Bindungsstelle (Shine Dalgarno) wurde mittels PCR-Methodik in die XbaI und SfiI -Schnittstellen von pEG1 (Strittmatter et al, 1995) kloniert. Die fertige scFv425dhlx Expressionskassette wurde zwischen die XbaI und HindIII Schnittstellen kloniert. Hieraus ergab sich der Expressionsvektor pHKK gemäß Abb. 2.

Beispiel 2:

Die Zusammensetzungen der Medien für die Vorkulturen in Erlenmeyer-Kolben, der Hauptkultur in einem mit Rührmechanik ausgestatteten Tankreaktor (Biostat ED10, B. Braun, Biotech International, Melsungen, FRG) sowie der Zufütterungsmedien FS1, FS2 und FS3 sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Das Hauptkulturmedium (8 l) wurde im Vergleich zu dem Medium bei Riesenberg et al., 1991 (s. o.) modifiziert. Um Prezipitationen zu verhindern, wurden die Bestandteile in der angegebenen Reihenfolge der Tab. 1 hinzugegeben. Glucose und Magnesiumsulfat wurden als separat autoklavierte Lösungen hinzugegeben. Der Reaktor wurde bei 26° C, einem Druck von 0.15 MPa, einem pH-Wert von 6.8 und einer durchschnittlichen Belüftungsrate von 10 l / min betrieben. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde 25% -iger wäßriger Ammoniak verwendet. Ammoniak und Ucolub N115® (Fragol Industrieschmierstoffe GmbH, Mühleim/Ruhr, FRG) wurden mittels Sensorkontrolle während der Fermentation zur pH-Regulierung, bzw. als Antischaummittel hinzugegeben. FS1 wurde wie folgt, hergestellt: 750 g Glucose und 22.2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ wurden getrennt in 600 ml bzw. 50 ml H_2O gelöst. Die Lösungen wurden nach erfolgter Autoklavierung miteinander gemischt. FS2 wurde hergestellt durch Auflösen von 227 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ und 169.5 g $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ in Wasser unter Hinzufügung von 60 ml 25%-igem NH_3 , um den pH-Wert auf 6.8 vor dem Autoklavieren einzustellen. FS3 wurde aus Stocklösungen in folgender Reihenfolge zubereitet: 50 ml Fe(III)-citrat-hydrat (6 g / l), 0.5 ml H_3BO_3 (30 g / l), 0.5 ml $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (10 g / l), 0.5 ml EDTA $\times 2\text{H}_2\text{O}$ (84 g / l), 0.5 ml $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (15 g / l), 0.5 ml $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (25 g / l), 0.5 ml $\text{CoCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (25 g / l) und 10 ml $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (4 g / l).

Beispiel 3:

Mehrere Kolonien aus einer Petrischale, gewachsen auf LB-Agar bei 26 °C, dienten dazu, 20 ml Flüssig-LB-Medium zu überimpfen. Nach 5-stündigem Schütteln (200 rpm, 26 °C) wurde 1ml in 100 ml Vorkulturmedium in einen 500 ml Kolben überführt und weiterinkubiert. 10 ml dieser Vorkultur wurden benutzt, um 100 ml neues Vorkulturmedium zu überimpfen. Auf diese Weise wurden 9 Vorkulturen erzeugt, die dazu benutzt wurden, zusammen 8 l Hauptkulturmedium im Fermenter mit einem anfänglichen $\text{OD}_{550} \approx 0.2$ zu überimpfen.

Beispiel 4

Der Aufbau des 10 l-Bioreaktors mit Zubehör und Kontrolleinrichtungen ist in Abb. 1 dargestellt. Die Kultivierung im Hochzelllichtfermentations-
Maßstab erfolgte mittels einer digitalen Meß- und Kontrolleinheit (DCU), ei-
nem Multi fermenter-Kontrollsystem (MFCS) und einer Gasfluß-
Kontrolleinheit. CO₂- und Sauerstoff-Abgabe wurden ständig gemessen.
Nach Überimpfung diente der Bioprobensammler MX-3 (New Brunswick
Scientific, Watford, UK), um aseptische Proben zu nehmen und off-line
Datenanalyse zu ermöglichen (Webb et al., 1990, Biotechnol. 8, 926-928).
Die Kontrolleinheiten hielten eine Einstromgasflußrate von 10 l / min, einen
pH-Wert von 6.8, eine Temperatur von 26°C und einem Druck von 0.15
MPa aufrecht. Zwei Kontrollschleifen garantierten aerobe Wachstumsbedin-
gungen bei einem pO₂-Wert von 20%. Alle wichtigen physikalischen Grö-
ßen wurden während der ganzen Fermentation angezeigt und aufgezeichnet.

Während der Fed-Batch-Phase wird die Glucose-Konzentration in der Kul-
tur bei 1.5 g / l gehalten. Hierzu wurde ein modifiziertes Flußinjektionsana-
lysegerät (FIAstar 5020 Analyzer mit Photometer und Detektionkontrollein-
heit, Tecator AB, Schweden) eingesetzt. Details dieses Systems und seiner
Arbeitsweise sind im Stand der Technik beschrieben (z. B. Pfaff et al.,
1995, In Munack A., Schügerl K (eds.): Computer Applications in Biotech-
nology, Elsevier Science Ltd., Oxford, 6-11).

Die Zelldichte wurde aus Messung der optischen Dichte bei 550 nm errech-
net. Die Plasmidstabilität wurde nach Pack et al, 1993 (s. o.) bestimmt.

Beispiel 5:

Die quantitative Bestimmung der synthetisierten Miniantikörper erfolgte
nach der Methode von Pack et al., 1993 (s. o.). Die Menge der funktionsfä-
higen Miniantikörper wurde durch ELISA, die Gesamtmenge an Minianti-
körper durch SDS-PAGE in 12 % Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970)
gefolgt von Gelscannen. Für die ELISAs wurden Mikrotiterplatten mit hu-
manen EGFR-Rezeptor (z.B. aus WO 92/15683) beschichtet. Die gebunden-
en Miniantikörper wurden mit anti-scFv425 Kaninchen-Serum und Per-
oxidase-konjugiertem Ziegen anti-Kaninchen IgG (Jackson Immunorese-
arch Inc, USA) detektiert. Die Ausbeute von aktiven Miniantikörpern wurde
aus Verdünnungsreihen der aufgereinigten Miniantikörper errechnet. In ei-

ner Kontrolle wurde gezeigt, daß das anti-scFv425 Kanninchen-Serum keine feststellbare Kreuzreaktion mit anderen Komponenten des plasmidfreien Rohextraktes von *E. coli* RV308 aufweist. Ferner hatte der Zusatz von diesem Rohextrakt zu einer Verdünnungsreihe des gleichen Antikörpers in aufgereinigter Form keinen Effekt auf die ELISA-Signale. Zur Bestimmung der Gesamtmenge an Miniantikörper wurden Coomassie Brilliantblau gefärbte Gele photometrisch detektiert und die Konzentration der Miniantikörper wurde aus einer Verdünnungsreihe des aufgereinigten Miniantikörpers, der auf demselben Gel aufgetrennt worden war, errechnet. Als Kontrolle diente ein analoger Ansatz, bei dem *E. coli* Wirtszellen verwendet wurden, die keine Miniantikörper produzierten,

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Fremdprotein in *E. coli*- Zellen, die mit ei-
nem das Fremdgen und einen induzierbaren Promoter tragenden Plasmid
transformiert wurden, mittels Hochzelllichtfermentation über Batch- und
Fed-Batch Stufen ohne jegliche Wachstumsbegrenzung durch Substrate oder
metabolische Nebenprodukte, und Isolierung und Aufreinigung des expri-
mierten Proteins aus dem Kulturmedium, wobei die Konzentration an
Substraten in der Fed-Batch Phase über ein kontinuierliches automatisches
oder semi-automatisches Analyse- und Zugabesystem geregelt und / oder
gesteuert wird, dadurch gekennzeichnet, daß
in der Fed-Batch Phase (i) die Konzentration der Kohlenstoffquelle im Me-
dium in einem Bereich zwischen 0.1 g / l und 25 g / l unter Beibehaltung
von unlimitiertem Wachstum der Zellen ($\mu = \mu_{\max}$) konstant gehalten wird,
(ii) die Produktion des Fremdproteins innerhalb besagter Fed-Batch Phase
bei einer Zelldichte zwischen 10 und 80 g / l durch Induktion des Promoters
gestartet wird, und (iii) nach erfolgter Produktsynthese-Induktion verwertba-
rer Stickstoff und Phosphat sowie Salze von Spurenelementen kontinuier-
lich zugefüttert werden, wobei (iv) während der gesamten Fed-Batch Phase
der pO₂-Wert durch entsprechende Sauerstoffeinleitung in die Fermentati-
onsbrühe zwischen 5 und 25 % eingestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration
der Kohlenstoffquelle während der Fed-Batch Phase in einem Bereich zwi-
schen 1 und 3 g / l konstant gehalten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Stickstoff,
Phosphat und Spurenelemente bei einer Zelldichte zwischen 50 und 80 g / l
zugemischt werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelldichte gemäß (ii) aus Anspruch 1 20 bis 60 g / l beträgt.
- 5
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß Zelldichten zwischen 100 und 150 g / l in der Fed-Batch Phase erreicht werden können.
- 10
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Expressionsvektor mit einer von zwei Terminatorsequenzen flankierten das Fremdgen ~~enthaltenden~~ Expressionskassette eingesetzt wird.
- 15
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der verwendete Expressionsvektor zusätzlich ein Suizidsystem, vorzugsweise das *hok-sok*-Suizidsystem enthält.
- 20
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Fremdgen eingesetzt wird, das für ein Antikörperfragment, insbesondere einen Miniantikörper codiert.
- 25
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Expressionsvektor gemäß einem der Ansprüche 12 - 16 eingesetzt wird.
- 30
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein *E. coli*-Stamm eingesetzt wird, der während der Fermentationsphase nicht mehr als 5 g / l Acetat im Kulturmedium akkumuliert.
- 35

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der *E. coli*-Stamm RV308 (ATCC 31608) eingesetzt wird.
- 5 12. *E. coli*-Expressionsvektor, geeignet für die Expression von Fremdproteinen unter Hochzelldichtefermentations-Bedingungen, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Merkmale enthält:
- (i) eine upstream- und eine downstream-Terminatorsequenz,
 - 10 (ii) das lac Promoter/Operatorsystem,
 - (iii) T7g10- Shine Dalgarno-Sequenz,
 - (iv) die pelB- oder ompA-Signalsequenz,
 - (v) die Sequenz des Fremdgens,
- 15 13. Vektor nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich ein Suizid-System, insbesondere das *hok-sok* Suizidsystem-Sequenz enthält.
- 20 14. Vektor nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die „upstream“- Terminatorsequenz t_{HP} und „downstream“-Terminatorsequenz t_{LPP} ist.
- 25 15. Vektor nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Fremdgen eine Sequenz enthält, die für die V_H - und die V_L -Kette eines Miniantikörpers codiert.
- 30 16. Expressionsvektor mit der Bezeichnung pHKK gemäß dem Konstruktionsschema der Abb. 2.
- 35 17. Transformierter *E. coli*-Expressionswirt RV308[pHKK], erhältlich durch Transformation von RV308 (ATCC 31608) mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 14.

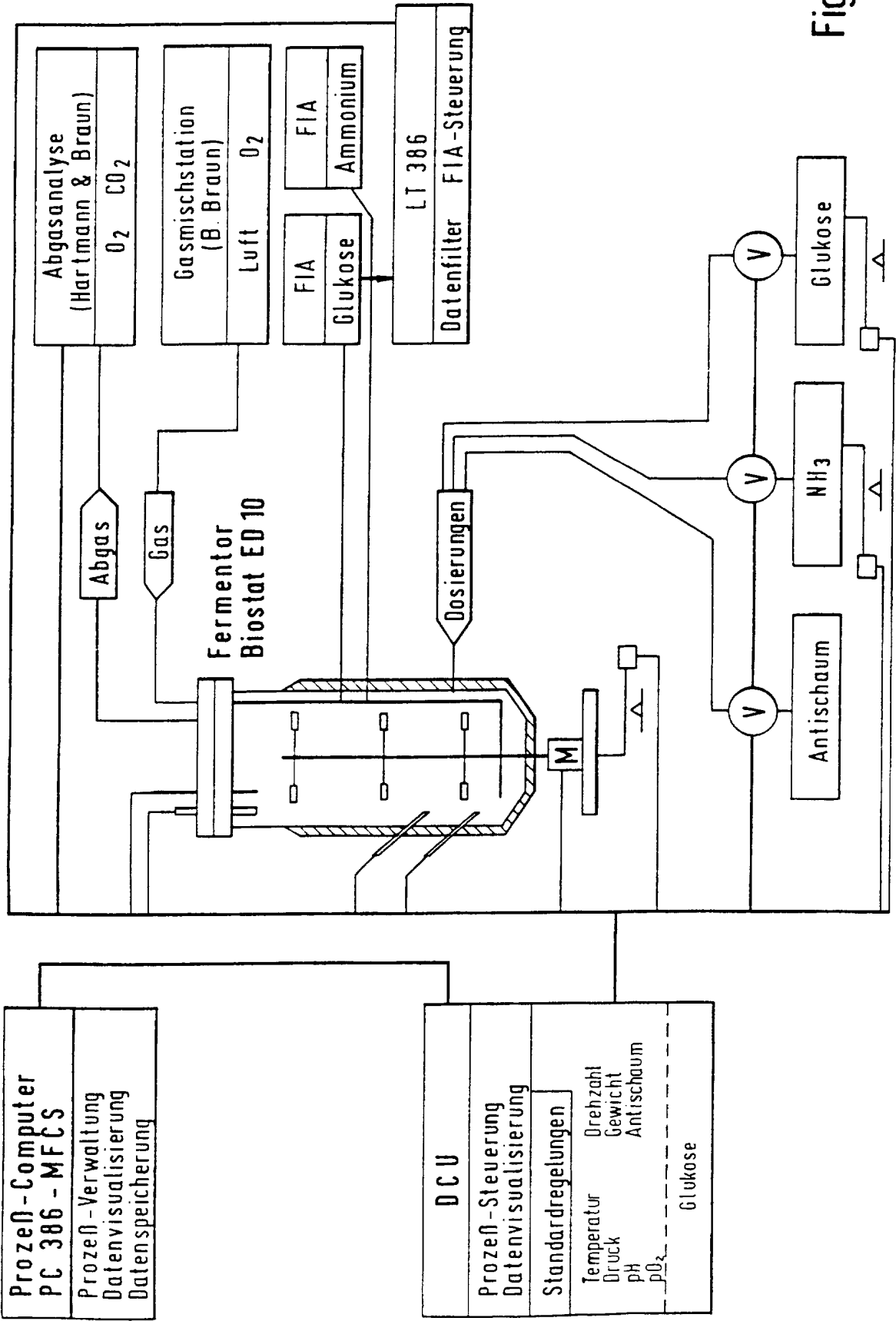
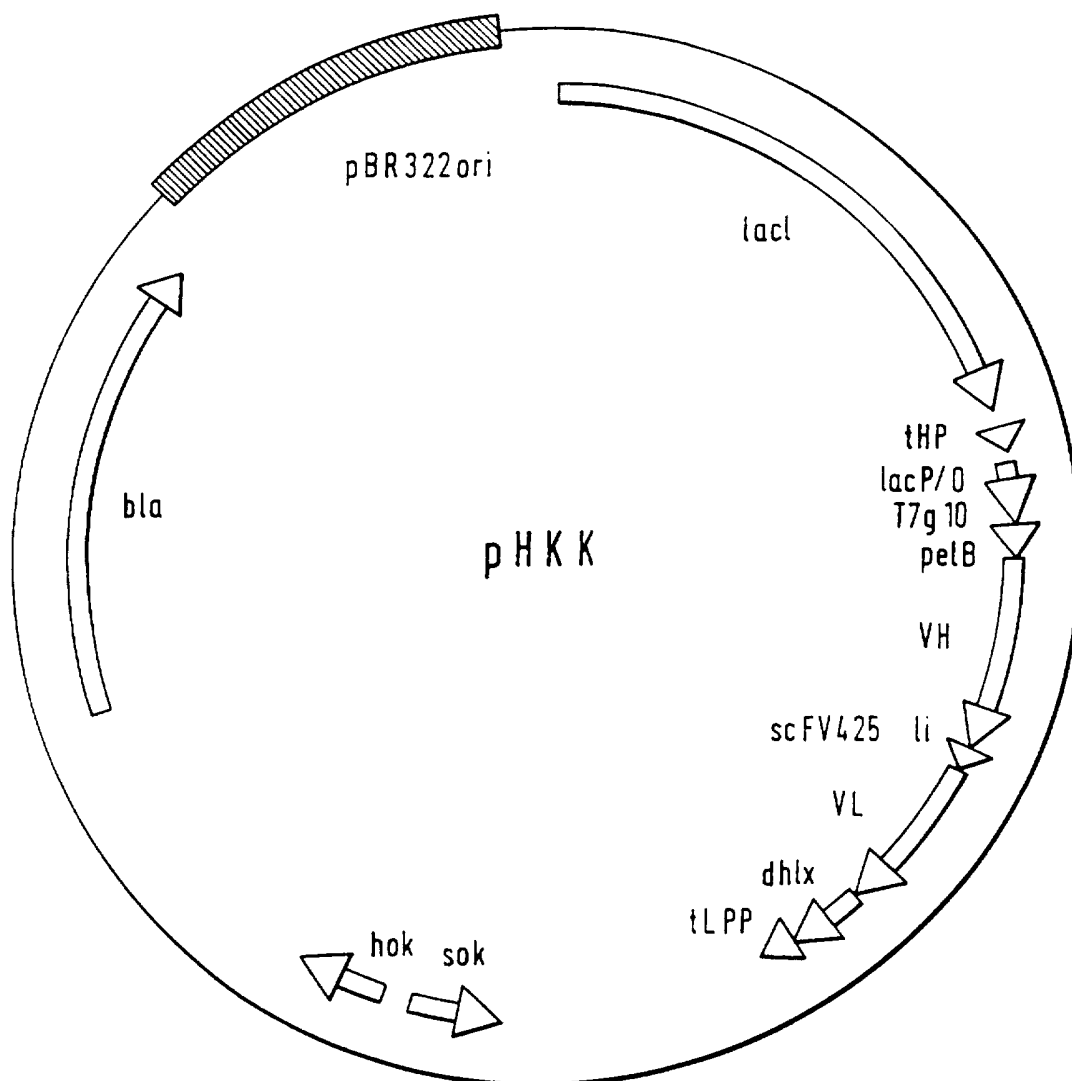


Fig.1

Fig. 2



3 / 4

Fig.3a

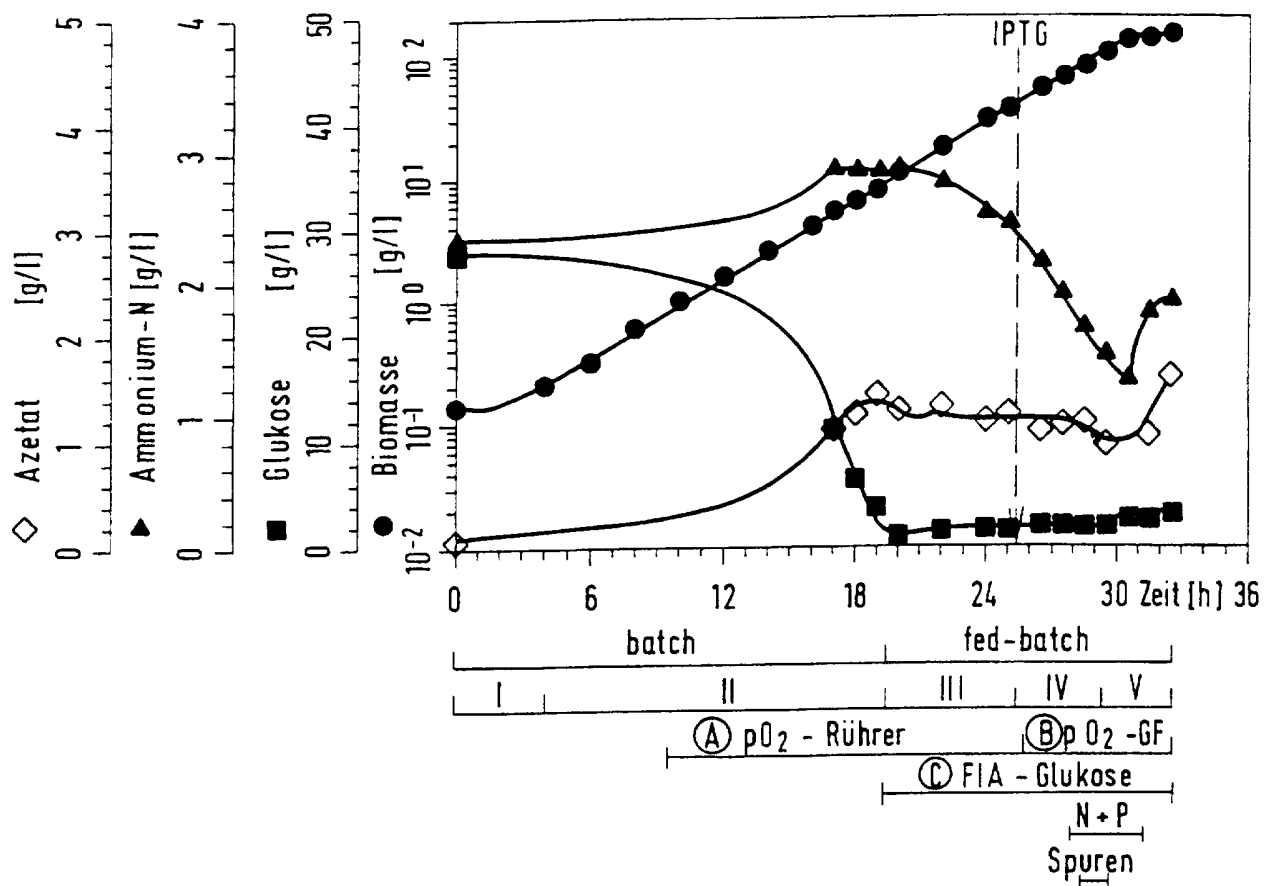
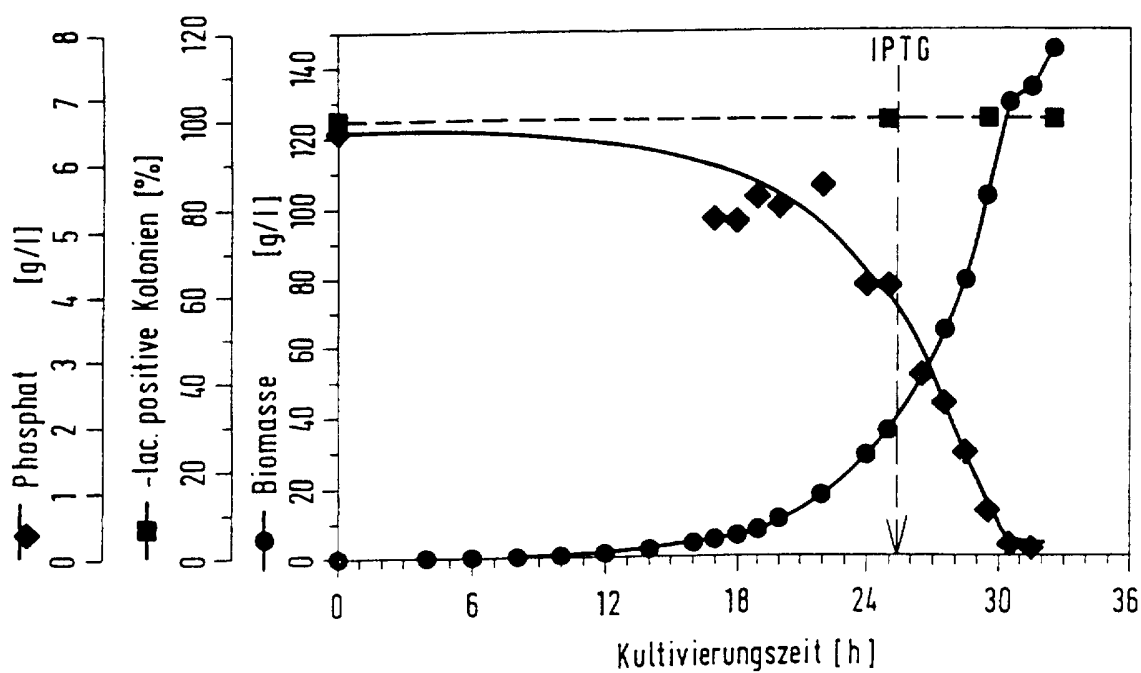


Fig.3b



4/4

Fig. 3c

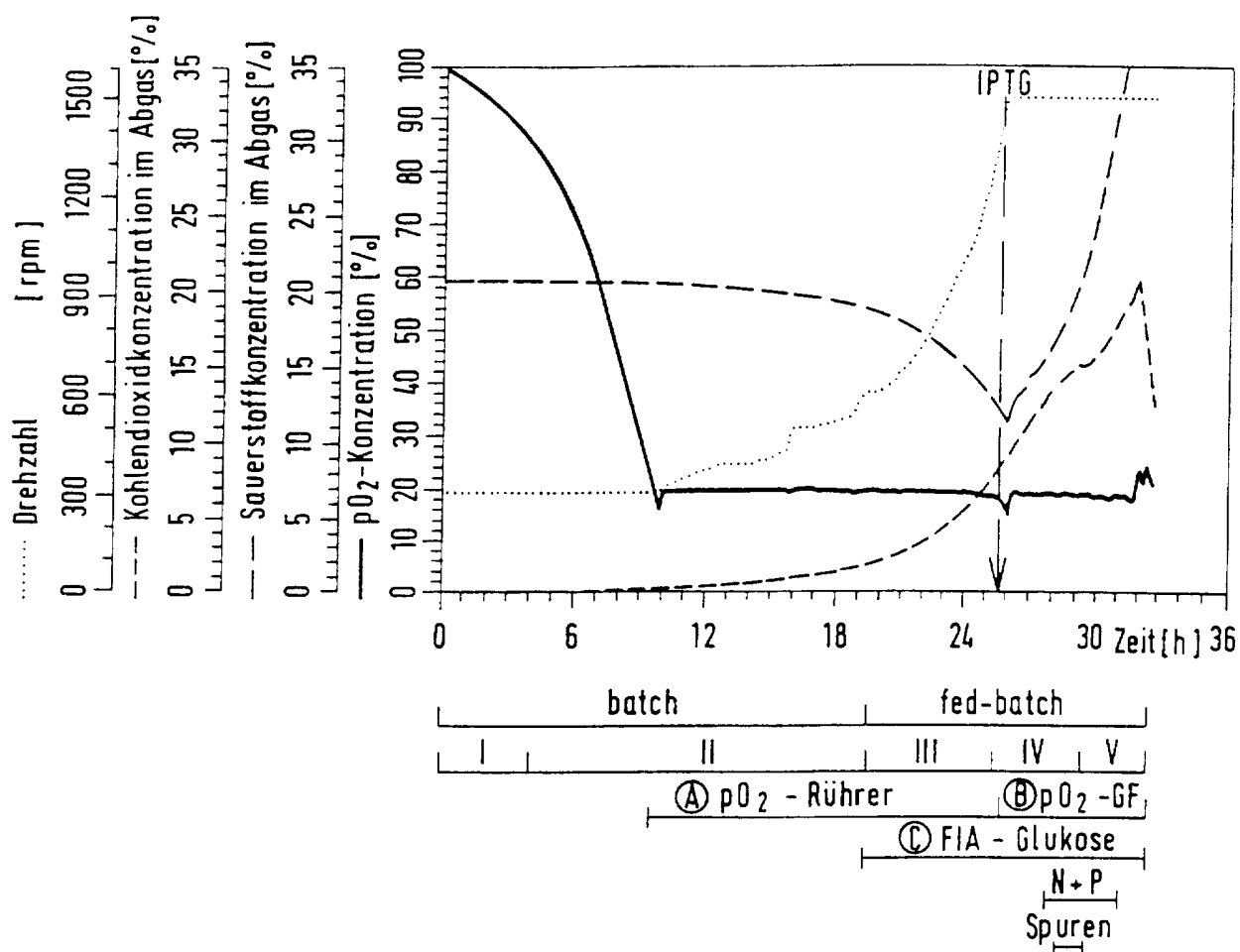
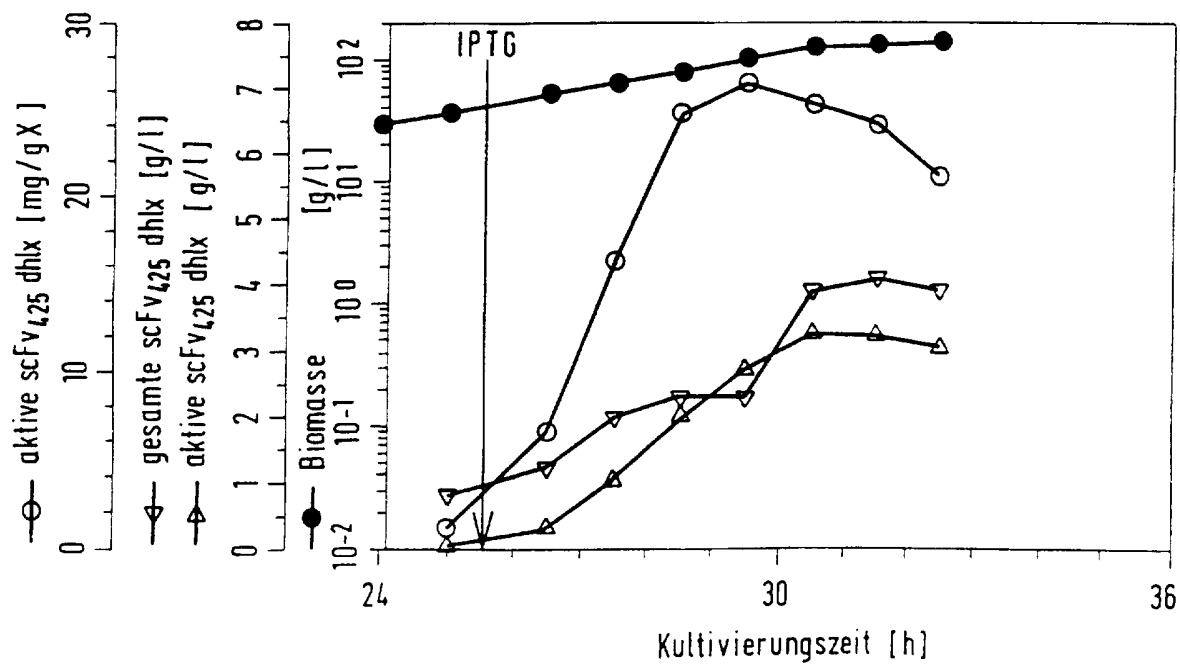


Fig. 3d



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PC 1/EP 96/05260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12P21/02 C12N15/72 C12N1/21 C07K16/28 //(C12N1/21,
C12R1:19)

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)
IPC 6 C12P C12N C07K

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIO/TECHNOLOGY, vol. 11, no. 11, 1 November 1993, pages 1271-1277, XP000608190 PACK P ET AL: "IMPROVED BIVALENT MINIANTIBODIES, WITH IDENTICAL AVIDITY AS WHOLE ANTIBODIES, PRODUCED BY HIGH CELL DENSITY FERMENTATION OF ESCHERICHIA COLI" cited in the application see the whole document ---	1-17
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 39, no. 1, 21 February 1995, pages 59-65, XP002026053 KORZ D. ET AL.: "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli" cited in the application see the whole document --- -/-	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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

25 February 1997

Date of mailing of the international search report

11.03.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 96/05260

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 32, no. 3, 28 February 1994, pages 289-298, XP002026054 HELLMUTH K.: "Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of Escherichia coli TG1" see the whole document ---	1-11
A	WO 92 15683 A (MERCK PATENT GMBH) 17 September 1992 cited in the application see the whole document ---	15,16
A	BIO/TECHNOLOGY, vol. 6, December 1988, pages 1402-1405, XP002026055 GERDES K.: "The PARB (HOK/SOK) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system" cited in the application see the whole document -----	12-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/EP 96/05260

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9215683 A	17-09-92	AU 658396 B	13-04-95
		AU 1340392 A	06-10-92
		CA 2082160 A	07-09-92
		CZ 9203327 A	16-02-94
		EP 0531472 A	17-03-93
		HU 65687 A	28-07-94
		SK 332792 A	03-07-96
		US 5558864 A	24-09-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/EP 96/05260

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12P21/02 C12N15/72 C12N1/21 C07K16/28 //(C12N1/21, C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12P C12N C07K

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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BIO/TECHNOLOGY, Bd. 11, Nr. 11, 1. November 1993, Seiten 1271-1277, XP000608190 PACK P ET AL: "IMPROVED BIVALENT MINIANTIBODIES, WITH IDENTICAL AVIDITY AS WHOLE ANTIBODIES, PRODUCED BY HIGH CELL DENSITY FERMENTATION OF ESCHERICHIA COLI" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-17
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 39, Nr. 1, 21. Februar 1995, Seiten 59-65, XP002026053 KORZ D. ET AL.: "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-11
-/-		

☒ 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 erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher 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

25. Februar 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11.03.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 32, Nr. 3, 28. Februar 1994, Seiten 289-298, XP002026054 HELLMUTH K.: "Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of Escherichia coli TG1" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	WO 92 15683 A (MERCK PATENT GMBH) 17. September 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	15,16
A	BIO/TECHNOLOGY, Bd. 6, Dezember 1988, Seiten 1402-1405, XP002026055 GERDES K.: "The PARB (HOK/SOK) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	12-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05260

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9215683 A	17-09-92	AU 658396 B	13-04-95
		AU 1340392 A	06-10-92
		CA 2082160 A	07-09-92
		CZ 9203327 A	16-02-94
		EP 0531472 A	17-03-93
		HU 65687 A	28-07-94
		SK 332792 A	03-07-96
		US 5558864 A	24-09-96
