



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **236 942 A5**

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 N / 279 990 3	(22)	26.08.85	(44)	25.06.86
(31)	644,435	(32)	27.08.84	(33)	US
	734,450		15.05.85		

(71)	siehe (73)
(72)	Bartfeld, Daniel; Blumberg, Shmaryahu; Gorecki, Marian; Hadary, Dan; Zeevi, Menachem, IL
(73)	Bio-Technology General Corp., 375 Park Avenue, Suite 3303, New York, N. Y. 10152, US

(54) Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten eukaryotischen Wachstumshormons

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten eukaryotischen Wachstumshormons oder eines Analogen desselben aus einer Bakterienzelle, in der das Wachstumshormon oder Analoge desselben durch Expression einer DNA-Sequenz mit Kodierung für das Hormon oder Analoge desselben hergestellt wurde. Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendbare geeignete hormonproduzierende Bakterienzellen sind genetisch modifizierte Stämme von Escherichia coli. Als Wachstumshormone können erfindungsgemäß Rinder-, Schweine- und Hühnerwachstumshormone sowie menschliche Wachstumshormone und jeweils deren Analoge gewonnen und reindargestellt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten eukaryotischen Wachstumshormons oder Analogen desselben aus einer Bakterienzelle, in der das eukaryotische Wachstumshormon oder Analoge desselben durch Expression einer DNA-Sequenz mit Kodierung für das betreffende Hormon oder Analoge desselben erzeugt wurde, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - a) die Zellwand der Bakterienzelle oder von Fragmenten derselben zur Gewinnung eines Lysats aufbricht;
 - b) aus dem Lysat ein teilchenförmiges und unlösliches Material enthaltenden Niederschlag abtrennt;
 - c) eine Suspension des abgetrennten Niederschlags in einer geeigneten Pufferlösung zubereitet;
 - d) die Suspension zur Herbeiführung eines Kontakts zwischen Flüssigkeit und Feststoffen behandelt;
 - e) von der Suspension, in der ein Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakt stattgefunden hat, ausgefallenes Material teilweise oder vollständig abtrennt;
 - f) den abgetrennten Niederschlag zur Bildung einer Lösung in ausreichender Menge in einer wäßrigen Lösung in Lösung bringt und den pH-Wert auf einen geeigneten alkalischen Wert einstellt;
 - g) das löslich gemachte Hormon oder Analoge desselben von sonstigen Zellkomponenten durch Ultrafiltration unter geeigneten Bedingungen abtrennt, um ein Ultrafiltrat mit dem Hormon oder Analogen desselben und einen Rückstand zu erhalten, und
 - h) das löslich gemachte Hormon oder Analoge desselben zu seiner weiteren Reinigung und Konzentration einer Behandlung unterwirft, um dabei gereinigtes Hormon oder gereinigtes Analoges desselben reindarzustellen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Hormon oder Analoges desselben ein tierisches Wachstumshormon oder Analoges desselben herstellt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Hormon oder Analoges desselben Rinderwachstumshormon oder ein Analoges desselben herstellt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Analoge die an das N-Ende der Phenylalaninform von natürlichem Rinderwachstumshormon addierte Aminosäuresequenz Met-Asp-Gln aufweist und daß man als Bakterienzelle *Escherichia coli* Stamm ATCC Nr. 39806 verwendet.
5. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Analoge einen an das N-Ende der Phenylalaninform von natürlichem Rinderwachstumshormon addierten Methioninrest aufweist und daß man als Bakterienzelle *Escherichia coli* Stamm ATCC Nr. 39785 verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Hormon oder Analoges desselben menschliches Wachstumshormon oder ein Analoges desselben herstellt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Analoge die Aminosäuresequenz von natürlichem menschlichem Wachstumshormon beginnend bei Met¹⁴ aufweist und daß man als Bakterienzelle *Escherichia coli* Stamm ATCC Nr. 39386 verwendet.
8. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Analoge die Aminosäuresequenz von natürlichem menschlichem Wachstumshormon mit vorrangierendem Methionin am N-Ende aufweist und daß man als Bakterienzelle *Escherichia coli* Stamm ATCC Nr. 39384 verwendet.
9. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Hormon Schweinewachstumshormon oder ein Analoges desselben herstellt.
10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Analoge einen an das N-Ende der Phenylalaninform von natürlichem Schweinewachstumshormon addierten Methioninrest aufweist und daß man als Bakterienzelle *Escherichia coli* Stamm ATCC Nr. 39804 verwendet.
11. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Hormon oder Analoges desselben Hühnerwachstumshormon oder ein Analoges desselben herstellt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Analoge einen an das N-Ende der Phenylalaninform von natürlichem Hühnerwachstumshormon addierten Methioninrest aufweist und daß man als Bakterienzelle *Escherichia coli* Stamm ATCC Nr. 39792 verwendet.
13. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man vor Stufe (a) die Bakterienzelle oder Bruchstücke derselben in der Gärmaße in Suspension hält oder in einer geeigneten gepufferten Lösung bei einem neutralen pH-Wert suspendiert.
14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als neutralen pH-Wert etwa 7,4 wählt.
15. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man in Stufe (a) die Zellen mechanisch aufbricht.
16. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Lysat vor der Abtrennung des teilchenförmigen Materials mit einer geeigneten Menge entionisierten Wassers verdünnt.
17. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Abtrennung in Stufe (b) oder in Stufe (e) durch Zentrifugieren bewirkt.
18. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Abtrennung in Stufe (b) oder in Stufe (e) durch Ultrafiltration bewirkt.
19. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man in Stufe (d) zusätzlich die Suspension eine geeignete Zeit lang mit einem zum Verdauen von in der Suspension enthaltenen Polysacchariden fähigen Enzym in Kontakt bringt.
20. Verfahren nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Enzym Lysozym verwendet.
21. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Behandlung in Stufe (d) zur Herbeiführung eines Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakts als Beschallung durchführt.
22. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man vor Herbeiführung eines Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakts der Suspension in Stufe (d) die Suspension mit einer geeigneten Menge eines geeigneten Netzmittels versetzt und ferner die Suspension eine geeignete Zeit lang inkubiert.
23. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das aus der Suspension, in der ein Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakt stattgefunden hat, in Stufe (e) teilweise oder vollständig abgetrennte ausgefallene Material in einer geeigneten Menge eines geeigneten Mediums resuspendiert, die erhaltene Suspension unter geeigneten Bedingungen einer Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung unterwirft und das dabei angefallene ausgefallene Material von der einer Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung unterworfenen Suspension vor dem Einlösen in Stufe (f) abtrennt.

24. Verfahren nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als geeignetes Medium eine gepufferte oder nicht-gepufferte wäßrige Lösung verwendet.
25. Verfahren nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den angefallenen Niederschlag mindestens ein weiteres Mal resuspendiert, einer Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung unterwirft und abtrennt.
26. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man beim Inlösungbringen in Stufe (f) einen alkalischen pH-Wert von etwa 9,0–12,0 wählt.
27. Verfahren nach Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß man nach dem Inlösungbringen des Niederschlags bei einem pH-Wert von etwa 9,0–12,0 den pH-Wert auf etwa 10,5 senkt.
28. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man der in Stufe (f) erhaltenen Lösung eine geeignete Menge einer geeignet konzentrierten wäßrigen Natriumboratlösung einverleibt.
29. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die in Stufe (f) angefallene Lösung durch Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakt unter geeigneten Bedingungen klärt, die einem Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakt unterworfenen Lösung unter geeigneten Bedingungen zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abtrennt und die Flüssigkeit filtriert, um eine das Hormon oder dessen Analoges enthaltene geklärte Lösung zu gewinnen.
30. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Abtrennung durch Ultrafiltration in Stufe (g) mit einer geeigneten Membran eines Schnittpunktes (cut-off point) von etwa 100 K Molekulargewicht durchführt.
31. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der in Stufe (g) angefallene Rückstand vor oder nach Durchführung der Behandlung in Stufe (h) mindestens noch einmal einer Ultrafiltration unterwirft.
32. Verfahren nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den Rückstand vor der erneuten Ultrafiltration mit einem geeigneten Puffer bei einem geeigneten alkalischen pH-Wert verdünnt.
33. Verfahren nach Anspruch 32, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als alkalischen pH-Wert etwa 9,0–12,0 wählt.
34. Verfahren nach Anspruch 32, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Verdünnung und Ultrafiltration mindestens einmal wiederholt.
35. Verfahren nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den Rückstand während der Ultrafiltration bei praktisch konstantem Volumen hält.
36. Verfahren nach Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Ultrafiltration bei praktisch konstantem Rückstandsvolumen mindestens noch einmal wiederholt.
37. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Behandlung des in Lösung gebrachten Hormons in Stufe (h) als Ionenaustauschchromatographie durchführt.
38. Verfahren nach Anspruch 37, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Ionenaustauschchromatographie mit einem aminhaltigen Ionenaustauscherharz durchführt.
39. Verfahren nach Anspruch 38, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als aminhaltiges Ionenaustauscherharz Diethylaminoethyl-dextran oder -sepharose verwendet.
40. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das gereinigte Hormon oder Analoge desselben durch Ultrafiltration konzentriert.
41. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das gereinigte Hormon oder Analoge desselben durch Dialyse und anschließende Trocknung weiter reinigt.
42. Verfahren nach Anspruch 41, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Dialyse gegen eine Lösung mit einer geeigneten Konzentration eines geeigneten Salzes durchführt.
43. Verfahren nach Anspruch 42, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als geeignetes Salz Ammoniumhydroxid oder Ammoniumbicarbonat verwendet.
44. Verfahren nach Anspruch 41, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Trocknung als Lyophilisierung durchführt.
45. Verfahren nach Anspruch 41, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Trocknung als Sprühtrocknung unter geeigneten Bedingungen durchführt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten eukaryotischen Wachstumshormons oder Analogens desselben aus einer Bakterienzelle.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Ein Ziel gentechnologischer Forschung bestand in der Entwicklung von Verfahren zur Gewinnung von in der Natur lediglich in höheren Organismen gebildeten Proteinen in Mikroorganismen. Dieses Ziel wurde bei bestimmten eukaryotischen Wachstumshormonen oder Analogen derselben erreicht. Bei der American Type Culture Collection in Rockville, MD. sind Stämme genetisch modifizierter Bakterien, beispielsweise *Escherichia coli*, die bei Züchtung und Induktion zur Bildung verschiedener Wachstumshormone oder Analogens derselben fähig sind, hinterlegt. Solche Hormone sind von möglicherweise großem Interesse auf landwirtschaftlichem Gebiet, beispielsweise zur Steigerung der Milch- und Fleischproduktion in der Viehwirtschaft, sowie auf medizinischem Gebiet, beispielsweise zur Behandlung von Zwergenwuchs bei Menschen.

Die Gewinnung eines Wachstumshormons mittels eines Mikroorganismus umfaßt folgende allgemeine Stufen:

1. Fremd-DNA, die mit den genetischen Anweisungen für die Produktion des gewünschten Hormons kodiert ist, wird in einem geeigneten Mikroorganismus, z. B. *Escherichia coli*, eingebaut;
2. der Mikroorganismus wird unter geeigneten Bedingungen gezüchtet und liefert und lagert das Hormon in großen Mengen; und
3. das Hormon wird aus dem Mikroorganismus gewonnen und gereinigt.

Die Gewinnung und Reinigung des Hormons besteht im allgemeinen in einem Aufbrechen der Zelle, in einer Abtrennung des Wachstumshormons von den sonstigen Zellbestandteilen und in einer weiteren Reinigung des gewonnenen Hormons. Unerwünschte Zellbestandteile können mit Enzymen verdaut, mit Netzmitteln in Lösung gebracht und von dem Hormon durch Zentrifugieren abgetrennt werden. Schließlich läßt sich das Wachstumshormon mit den verschiedensten Reinigungstechniken für Proteine bis zu verschiedenen Reinigungsgraden reinigen. Solche üblichen Proteinreinigungsmaßnahmen sind beispielsweise Dialyse, Zonenzentrifugieren, Molekülausschlußchromatographie, isoelektrische Fällung, Ein- und Aussalzen, Lösungsmittelfraktionieren, Elektrophoresemaßnahmen, Ionenaustauschchromatographie und/oder Affinitätschromatographie. Die geschilderten Techniken unterscheiden sich voneinander durch ihre wirtschaftliche Durchführbarkeit und den erreichbaren Reinigungsgrad.

In der DDR-Patentanmeldung AP-C 12 N/265 320/4 ist ein Verfahren zur Gewinnung und Reinigung von Rinderwachstumshormon beschrieben. Bei diesem Verfahren erfolgt eine Gewinnung des Hormons durch mechanisches Aufbrechen einer durchgemischten Zellsuspension und eine Inkubation des Niederschlags mit Lysozym und dann mit Desoxyribonuklease. Die Reindarstellung des Hormons erfolgt dann durch Beschallung des in Lösung gebrachten Hormons, Klären der Lösung durch Zentrifugieren und Unterwerfen der das Hormon enthaltenden Lösung einer Gelchromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Dialyse und Lyophilisierung.

Das geschilderte Verfahren erfordert ziemlich große Mengen an Lysozym und folglich wiederholte und zeitaufwendige Waschvorgänge zur Gewinnung von gereinigtem Hormon. Selbst dann fällt das gereinigte Hormon lediglich in relativ geringer Ausbeute (etwa 10–15%, bezogen auf das Hormongewicht in den Zellen am Ende der Fermentierung) an. Ein weiterer Nachteil des beschriebenen Verfahrens ist seine Abhängigkeit von einer Desoxyribonukleaseverdauung. Desoxyribonuklease ist ein kostspieliges Enzym, das zur Verdauung von Zell-DNA während des Hormongewinnungsverfahrens verwendet wurde. Es hat sich gezeigt, daß Desoxyribonukleasepräparate mit Proteasen, die das gewünschte Produkt während der Gewinnung abbauen, verunreinigt sind. Die Verwendung von Desoxyribonuklease, wie bei dem geschilderten Verfahren, kann folglich zu einer Verminderung der Ausbeute an dem gewonnenen Hormon führen, sofern nicht zusätzliche Vorkehrungen zur Inhibierung etwa vorhandener Protease getroffen werden. Selbst dann ist eine vollständige Proteaseinhibierung nicht möglich. Über die Ausbeuteverminderung hinaus führt die Verwendung von Desoxyribonuklease zusätzlich noch zu einem Produkt geringerer als der gewünschten Stabilität, was ebenfalls auf die Proteaseverunreinigung zurückzuführen ist.

Ziel der Erfindung

Es wurde nun ein Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten eukaryotischen Wachstumshormons oder Analogen desselben entwickelt, das einfacher durchzuführen, besser zu steuern und weniger kostspielig ist als vorherige Verfahren. Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu einer Gewinnung des gewünschten Produkts in höherer Ausbeute und in stabilerer Form als dies bisher erreichbar war. Das Verfahren erfordert lediglich 2,5–5% der bei dem vorherigen Verfahren verwendeten Lysozymmenge, was die Reinigung vereinfacht und die Gesteungskosten senkt. Darüber hinaus benötigt man bei Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens keine Desoxyribonuklease. Neben der weiteren Kostensenkung kann man durch Weglassen der Desoxyribonuklease die Produktausbeute mehr als verdoppeln und ein Produkt deutlich höherer Stabilität herstellen. Durch Vermindern der Anzahl der erforderlichen Waschvorgänge stellt das erfindungsgemäße Verfahren ein bequemerer und weniger zeitaufwendiges Verfahren zur Gewinnung und Reindarstellung von Wachstumshormonen oder deren Analogen dar, wobei lediglich 10–20% der Zeit des vorherigen Verfahrens aufgewendet werden müssen. Durch Anwendung der Ultrafiltration ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren sowohl eine beträchtliche Kosteneinsparung als auch die Gewinnung eines deutlich reineren Produkts.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist nun ein Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten eukaryotischen Wachstumshormons oder Analogen desselben aus einer Bakterienzelle, in der das eukaryotische Wachstumshormon oder Analoge desselben durch Expression einer DNA-Sequenz mit Kodierung für das betreffende Hormon oder Analoge desselben erzeugt wurde, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) die Zellwand der Bakterienzelle oder von Fragmenten derselben zur Gewinnung eines Lysats aufbricht;
- b) aus dem Lysat ein teilchenförmiges und unlösliches Material enthaltenden Niederschlag abtrennt;
- c) eine Suspension des abgetrennten Niederschlags in einer geeigneten Pufferlösung zubereitet;
- d) die Suspension zur Herbeiführung eines Kontakts zwischen Flüssigkeit und Feststoffen behandelt;
- e) von der Suspension, in der ein Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakt stattgefunden hat, ausgefallenes Material teilweise oder vollständig abtrennt;
- f) den abgetrennten Niederschlag zur Bildung einer Lösung in ausreichender Menge in einer wäßrigen Lösung in Lösung bringt und den pH-Wert auf einen geeigneten alkalischen Wert einstellt;
- g) das löslich gemachte Hormon oder Analoge desselben von sonstigen Zellkomponenten durch Ultrafiltration unter geeigneten Bedingungen abtrennt, um ein Ultrafiltrat mit dem Hormon oder Analogen desselben und einen Rückstand zu erhalten, und
- h) das löslich gemachte Hormon oder Analoge desselben zu seiner weiteren Reinigung und Konzentration einer Behandlung unterwirft, um dabei gereinigtes Hormon oder gereinigtes Analoge desselben reindarzustellen.

In Stufe (d) kann man zum Behandeln der Suspension des von dem Lysat abgetrennten Niederschlags vor der Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung und anschließenden Abtrennung des Niederschlags Lysozym verwenden. Letztere beiden Stufen sowie die Ultrafiltration können wiederholt werden. Zur weiteren Reinigung und Konzentrierung des Hormons oder seines Analogen kann man sich in Stufe (h) der Ionenaustauschchromatographie bedienen. Die meisten Verfahrensschritte können kontinuierlich und automatisch durchgeführt werden.

Geeignete hormonproduzierende Bakterienzellen, die im Rahmen des Verfahrens gemäß der Erfindung eingesetzt werden können, sind die *Escherichia coli* Stämme ATCC Nr. 39806, 39785, 39386, 39384, 39804 und 39792. Erfindungsgemäß können Rinder-, Schweine- und Hühnerwachstumshormone sowie menschliche Wachstumshormone und deren jeweilige Analoge gewonnen und reindargestellt werden.

Wie bereits erwähnt, wurde erfindungsgemäß ein neues Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten eukaryotisch, beispielsweise tierischen oder menschlichen Wachstumshormons oder Analogen desselben, aus einer Bakterienzelle, in der das Wachstumshormon oder Analoge desselben durch Expression einer DNA-Sequenz mit Kodierung für das betreffende Hormon oder dessen Analoge produziert wurde, entwickelt.

Zur Verwendung bei diesem Verfahren geeignete, genetisch modifizierte Bakterienzellen sind bekannt. Ein beispielsweise zur Produktion eines Analogen von Rinderwachstumshormon (bGH) genetisch modifizierter *Escherichia coli*-Stamm wurde beispielsweise bei der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) unter der Hinterlegungsnummer ATCC Nr. 39806 hinterlegt. Das bGH-Analogue besitzt an das N-Ende der Phenylalaninform von natürlichem bGH die Aminosäuresequenz Met-Asp-Gln addiert. Eine andere genetisch modifizierte *E. coli*-Zelllinie, die bei ATCC unter der Hinterlegungsnummer ATCC Nr. 39785 hinterlegt ist, produziert ein bGH-Analogue mit einem an das N-Ende der Phenylalaninform von natürlichem bGH addierten Methioninrest. Ein bei ATCC unter der Hinterlegungsnummer ATCC Nr. 39386 hinterlegter weiterer *E. coli*-Stamm produziert ein Analogue von menschlichem Wachstumshormon (hGH) mit der Aminosäuresequenz von natürlichem hGH, beginnend mit Met¹⁴ und ohne die Aminosäuren 1–13. Die *E. coli*-Zelllinie mit der ATCC-Nr. 39384 produziert ein hGH-Analogue mit der Sequenz von natürlichem hGH bei vorgeschaltetem Methionin am N-Ende. In ähnlicher Weise produzieren die *E. coli*-Zelllinien mit den ATCC-Nr. 39804 und 39792 ein Analogue von Schweinewachstumshormon (pGH) bzw. ein Analogue von Hühnerwachstumshormon (cGH), die jeweils einen an das N-Ende der Phenylalaninform des jeweiligen natürlichen Hormons addierten Methioninrest aufweisen. Sämtliche der genannten Hormonanalogen können durch Wachsenlassen und Induktion geeigneter Zellen unter geeigneten Bedingungen produziert und dann nach dem Verfahren gemäß der Erfindung gewonnen und reindargestellt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist einfacher durchzuführen, besser zu steuern und weniger kostspielig als vorherige Verfahren und führt zur Gewinnung des gewünschten Produkts in höherer Ausbeute und stabilerer Form. Die gewünschten Produkte können im Rahmen des Verfahrens gemäß der Erfindung in Ausbeuten von über 25 oder sogar über 30 Gew.-%, bezogen auf das Gewicht des Hormons oder dessen Analogen, in den Bakterien am Ende der Fermentierung gewonnen werden. Das Lysozym wird in geringeren Mengen benötigt als bei den vorherigen Verfahren. Ferner erfordert das erfindungsgemäße Verfahren nicht den Einsatz irgendeiner Desoxyribonuklease und kann kontinuierlich und unter Ausnutzung bequemer automatischer Maßnahmen durchgeführt werden.

Erfindungsgemäß werden nach dem Wachstum, der Induktion und der Ernte geeigneter Bakterienzellen die dekantierten Bakterienzellen, Bruchstücke derselben oder der Zellkuchen in einer geeigneten gepufferten Lösung bei neutralem pH-Wert, d. h. bei einem pH-Wert von etwa 7,4, suspendiert. Ein zu diesem Zweck geeignetes Suspendiermedium besteht aus einer wässrigen Lösung von 50 mM Tris (pH-Wert: 7,4) : 50 mM NaCl, 50 mM Tris (pH-Wert: 7,4) : 50 mM EDTA, 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert: 7,4) : 50 mM NaCl oder 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert: 7,4) : 50 mM EDTA. Andererseits kann auch die Zellsuspension der Gärmaische nach Einstellen auf einen neutralen pH-Wert direkt weiterverarbeitet werden. Danach wird die Zellwand der suspendierten Bakterienzelle oder von Bruchstücken derselben zur Bildung eines Lysats aufgebrochen. Vorzugsweise erfolgt das Aufbrechen der Zellen auf mechanischem Wege bei Temperaturen unter etwa 35°C, d. h. bei Temperaturen zwischen etwa -10°C und etwa +8°C. Eine zu diesem Zweck geeignete handelsübliche Aufbruchvorrichtung besteht in einer Kugelmühle oder in einem Homogenisator, beispielsweise in der Vorrichtung Dymomill KD-5 der Firma Willy A. Bachofen, Basel. Das Aufbrechen erfolgt vorzugsweise durch kontinuierliches Hindurchleiten der Suspension durch die Aufbruchvorrichtung mit einer geeigneten Strömungsgeschwindigkeit, beispielsweise einer Geschwindigkeit von etwa 80 l/h.

Danach wird von dem Lysat, das auch wasserlösliche Proteine, DNA und RNA oder Fragmente derselben enthält, ein Niederschlag mit teilchenförmigem und unlöslichem Material einschließlich des Hormons oder eines Analogen desselben und sonstiger wasserunlöslicher Proteine sowie Zellmembranen und Zellwandbruchstücken und -aggregaten abgetrennt. Zu dieser Abtrennung wird das Lysat vorzugsweise mit einer geeigneten Menge, beispielsweise etwa dem gleichen Volumen entionisierten Wassers verdünnt und anschließend in einer Festkorbzentrifuge mit kontinuierlichem Durchlauf (z. B. Cepa 101) bei Durchflußgeschwindigkeiten, die zur Herbeiführung der gewünschten Trennung ausreichen, beispielsweise etwa 60–80 l/h, zentrifugiert. Hierauf wird von dem abgetrennten Niederschlag in einer geeigneten Menge einer geeigneten Pufferlösung eines neutralen pH-Werts, z. B. eines pH-Werts von etwa 7,4, eine Suspension zubereitet. Vorzugsweise enthält die Lösung 50 mM Tris oder Natriumphosphat (pH-Wert: 7,4) : 50 mM EDTA. Eine geeignete Menge Pufferlösung zur Zubereitung der Suspension beträgt etwa 0,5–2,5 l, vorzugsweise etwa 1,2 l, pro kg anfänglicher Bakterienzellen.

Unerwünschtes Zellmaterial, z. B. Zellwandbruchstücke, können durch Inkubieren der Suspension mit einem zum Verdauen von in der Suspension enthaltenen Polysacchariden geeigneten Enzym, z. B. Lysozym (Sigma L-6876, St. Louis, MO), unter geeigneten Bedingungen und für eine geeignete Zeit lang verdaut werden. Die im Rahmen des Verfahrens gemäß der Erfindung bevorzugte Lysozymkonzentration beträgt etwa 50–100 µg/ml Lösung. Diese Menge bedeutet eine signifikante Verminderung gegenüber den bei den vorherigen Verfahren verwendeten 2 mg/ml. Die Lysozyminkubation dauert zweckmäßigerweise etwa 1–20 h. Vorzugsweise beträgt die Temperatur während dieser Inkubationsperiode etwa 37°C. Danach kann der Suspension eine geeignete Menge eines geeigneten Netzmittels, z. B. Triton X-100 (Rohm & Haas Co., Philadelphia, PA), in einer Endkonzentration von etwa 1 % (V/V) einverleibt werden, um Substanzen, wie Zellipide, in Lösung zu bringen. Schließlich wird die Suspension eine geeignete Zeit lang, beispielsweise etwa 30 min lang, weiter inkubiert.

Die in der Suspension enthaltenen Flüssigkeits- und Feststoffanteile werden nun einer Behandlung unterworfen, um einen engen Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakt herbeizuführen. Dies geschieht beispielsweise durch Beschallung unter geeigneten Bedingungen, z. B. mit einer 370-W-Dauerstrombeschallungsvorrichtung (Heat Systems Ultrasonics, Plainview, NY), die auf 65 % der Maximalleistung eingestellt ist und mit einer Strömungsgeschwindigkeit von etwa 18–25 l/h arbeitet. Danach wird von der der Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung unterworfenen Suspension ausgefallenes Material abgetrennt. Dies geschieht vorzugsweise durch Zentrifugieren der einer Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung unterworfenen Suspension in einer Korbdauerstromzentrifuge (z. B. Cepa 101) bei einer geeigneten Strömungsgeschwindigkeit, beispielsweise etwa 30 l/h. Gemäß

geeigneten Membran, beispielsweise einer Millipore Durapore 0,45 Mikron Membran anstelle des Zentrifugierens erfolgen. Nach der Abtrennung wird das von der einer Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung unterworfenen, beispielsweise beschallten Suspension abgetrennte ausgefallene Material gewaschen, zweckmäßigerweise mit 50 mM Tris oder Phosphat (pH-Wert: 7,4): 100 mM NaCl, und in einer geeigneten Menge eines geeigneten Mediums, z. B. einer gepufferten oder ungepufferten wäßrigen Lösung, resuspendiert. Die erhaltene Suspension wird danach unter geeigneten Bedingungen, z. B. durch Beschallung, in Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakt gebracht, worauf der gebildete Niederschlag teilweise oder vollständig von der einer Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung unterworfenen, beispielsweise beschallten Suspension, beispielsweise durch Zentrifugieren oder Ultrafiltration, abgetrennt wird. Das Resuspendieren, der Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakt, beispielsweise die Beschallung, und das Abtrennen werden vorzugsweise mindestens ein weiteres Mal wiederholt. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung werden diese Schritte viermal wie folgt durchgeführt: Der gebildete Niederschlag wird das erste Mal in 20 mM Tris (pH-Wert: 7,4) oder 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert: 7,4) resuspendiert, worauf die Suspension, wie geschildert, einem Flüssigkeits-/Feststoff-Kontakt unterworfen, z. B. beschallt, wird. Danach wird die Suspension, wie beschrieben, zentrifugiert. Der gebildete Niederschlag wird in 50 mM Tris (pH-Wert: 7,4): 100 mM NaCl oder 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert: 7,4): 10 mM EDTA: 100 mM NaCl resuspendiert. Die erhaltene Suspension wird, wie geschildert, einer Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung, z. B. Beschallung, unterworfen und dann zentrifugiert, worauf der abgetrennte Niederschlag in entionisiertem Wasser resuspendiert wird. Die wäßrige Suspension wird erneut, wie geschildert, einer Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung, z. B. Beschallung, unterworfen und dann zentrifugiert. Der wiederum abgetrennte Niederschlag wird nochmal in entionisiertem Wasser suspendiert. Diese zweite wäßrige Suspension wird nach der Flüssigkeits-/Feststoff-Kontaktierung, beispielsweise Beschallung, zentrifugiert, wobei ein Niederschlag anfällt, in dem das gewünschte Hormon oder Analoge desselben angereichert ist.

Nun wird der abgetrennte Niederschlag beispielsweise durch Resuspendieren bei geeigneter Temperatur, beispielsweise 4–40°C, in einer ausreichenden Menge Wasser, vorzugsweise in etwa 25 Volumina Wasser, und Einstellen des pH-Werts auf einen geeigneten alkalischen Wert, beispielsweise etwa 9,0–12,0, in Lösung gebracht, wobei eine Lösung mit dem Hormon oder dessen Analogem erhalten wird. Zur besseren Auflösung kann man das Lösungsmedium mit hoher Scherkraft (z. B. mittels eines Polytronmischers der Firma Kinematica) bewegen. Der pH-Wert der zunächst angefallenen Suspension kann durch Zusatz von NaOH, beispielsweise 1–10 N NaOH, in geeigneter Weise auf einen Wert von etwa 9,0–12,0, vorzugsweise von etwa 11,8–12,0, eingestellt werden. Vorzugsweise wird die NaOH unter kräftigem Rühren auf einmal in die Lösung eingetragen. Danach wird die Lösung etwa 1 h lang inkubiert und gerührt, worauf der pH-Wert auf etwa 10,5 erniedrigt werden kann.

Hierauf wird die Lösung mit einer geeigneten Menge einer geeignet konzentrierten wäßrigen Natriumboratlösung, beispielsweise einer etwa 1 M Natriumboratlösung eines pH-Werts von beispielsweise 11,5–12,0, versetzt, um eine Endboratkonzentration von vorzugsweise etwa 10 mM zu erreichen. Hierauf wird die Proteinlösung entweder durch Verdünnen mit 2–10 Volumina 10 mM Natriumboratpuffer (pH-Wert: 10,2) oder mit konzentrierter HCl oder 1 N HCl auf einen pH-Wert von 10,5 gebracht. Nach weiterem 1- bis 12stündigem Inkubieren unter Rühren kann die erhaltene Lösung gegebenenfalls durch Beschallung unter geeigneten Bedingungen, z. B. mittels eines handelsüblichen beheizten Dauerbeschallungsgeräts, bei einer Strömungsgeschwindigkeit von etwa 10 l/h, Zentrifugieren der beschallten Lösung unter geeigneten Bedingungen, beispielsweise mittels einer Korbdauerstromzentrifuge (beispielsweise Ceca 101) einer Strömungsgeschwindigkeit von etwa 30 l/h, Abtrennen der überstehenden Flüssigkeit und Vakuumfiltrieren der Flüssigkeit, beispielsweise durch ein Whatman Nr. 2-Papier auf einem Buchner-Vakuumfilter, geklärt werden, wobei man eine klare Lösung mit dem in Lösung gebrachten Hormon oder Analogen desselben erhält. Andererseits kann auch ausschließlich zentrifugiert werden.

Das in Lösung gebrachte Hormon oder Analoge desselben wird dann von den sonstigen Zellkomponenten, wie Proteinen, Lipiden und sonstigen Teilchen, abgetrennt. Aggregate werden durch Ultrafiltration unter geeigneten Bedingungen aufgeschlossen. Vorzugsweise wird der angefallene Rückstand erneut mindestens einmal einer Ultrafiltration unterworfen. Während dieser Maßnahme sollte das Rückstandsvolumen um etwa 95%, beispielsweise von etwa 10 l auf etwa 0,5 l, reduziert werden. Das Filtrat wird aufgefangen. Zum Ultrafiltrieren eignet sich eine Pellicon-Kassette oder PUF-100-Spirale der Firma Millipore Corp., Bedford, MA, mit einem 100 K Molekulargewicht-Schnitt. Vorzugsweise wird der Rückstand mit einem geeigneten Puffer bei einem geeigneten alkalischen pH-Wert, beispielsweise einem pH-Wert von etwa 9–12, weiterverdünnt und dann einer erneuten Ultrafiltration unterworfen. Vorzugsweise wird ein 10 mM Boratpuffer (pH-Wert: 10,5–12,0) verwendet. Die neuerliche Verdünnung und die weitere Konzentration durch Ultrafiltration werden vorzugsweise mindestens einmal wiederholt. Andererseits kann man bei praktisch konstantem Rückstandsvolumen ein- oder mehrmals ultrafiltrieren. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung wird die Ultrafiltration so lange wiederholt, bis die Absorption des Rückstands bei 280 nm weniger als etwa 0,1 optische Dichteeinheit beträgt. Aus dem Ultrafiltrat erhält man üblicherweise das Hormon in einer Reinheit und mit einer biologischen Aktivität, die den bei Durchführung einer bisher üblichen Gelchromatographie gewonnenen entsprechenden Werten überlegen sind.

Das in dem Ultrafiltrat enthaltene gereinigte Hormon oder Analoge desselben wird dann zu seiner Reindarstellung einer Ionenaustauschchromatographie, beispielsweise mit einem aminhaltigen Ionenaustauscherharz, z. B. Diethylaminoethyl, unterworfen. Vor der Ionenaustauschchromatographie kann gegebenenfalls eine Konzentration mittels Ultrafiltration unter Verwendung einer 10 K Molekulargewicht-Membran zur Entfernung von Wasser vorgeschaltet werden. Während der Ionenaustauschchromatographie werden restliche DNA, gegebenenfalls noch vorhandenes Lysozym und Multimere von dem Hormon oder Analogen desselben abgetrennt. In dieser Stufe wird zunächst der pH-Wert des Ultrafiltrats durch Versetzen mit Salzsäure auf einen geeigneten Wert, beispielsweise 9,0, eingestellt, worauf das Ganze auf eine geeignete Ionenaustauschersäule, beispielsweise eine DEAE-Sephacel CL-6B (Schnellaufsäule) KS-370-Abschnittsäule (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) aufgegeben wird. Danach wird das System mit einem geeigneten Puffer, z. B. 10 mM Boratpuffer, gewaschen und die Probe mit geeigneter Geschwindigkeit mittels eines geeigneten Eluiermittels, beispielsweise eines 10 mM Boratpuffers (pH-Wert: 9,0) mit 100 mM NaCl eluiert. Die das Hormon oder Analoge desselben enthaltenden Fraktionen können durch Ultrafiltration mittels einer Pellicon-Kassette oder PUF-100-Spirale mit einem 10 K Molekulargewicht-Schnitt konzentriert und dann gegen eine Lösung einer geeigneten Konzentration an einem geeigneten Salz, beispielsweise 3 mM Ammoniumhydroxid oder Ammoniumbicarbonat, erneut unter Verwendung einer Pellicon-Kassette mit einem 10 K Molekulargewicht-Schnitt dialysiert werden. Das dialysierte Material kann dann durch Lyophilisieren oder durch Sprühtrocknen unter geeigneten Bedingungen getrocknet werden. Das Sprühtrocknen stellt die wirtschaftlichere Maßnahme dar und kann in üblicher bekannter Weise mittels einer kleineren Sprühtrocknungseinheit (Niro Atomizer) bei einer Einlaßtemperatur von etwa

200°C und einer Auslaßtemperatur von etwa 50°C sowie einer Strömungsgeschwindigkeit von etwa 2,5l/h bewerkstelligt werden. Durch die geschilderten Behandlungsmaßnahmen erhaltene tierische Wachstumshormone oder deren Analoge fallen in Form feiner weißer Pulver Gereinigte tierische Wachstumshormone oder deren Analoge können nach dem Verfahren gemäß der Erfindung in einer Ausbeute von größer als oder gleich etwa 30 %, bezogen auf das Gewicht des in den Bakterien am Ende der Fermentierung enthaltenen Hormons oder Analogen desselben, gewonnen werden. Das hierbei erhaltene Hormon oder Analoge desselben erscheint als ein Fleck beim Entwickeln auf einem 15% Polyacrylamid-SDS-Gel gegen niedrigmolekulare Marker (Pharmacia) als Referenz.

Die nach der erfindungsgemäßen Ultrafiltration und Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Peptide sind reiner und stabiler als im Falle, daß anstelle der Ultrafiltration eine Gelchromatographie oder daß die Konzentration der Peptide durch Ultrafiltration mit einer 10K Molekulargewichtsschnitt-Membran anstelle der Ionenaustauschchromatographie durchgeführt wird.

Bezüglich der biologischen Aktivität der gewonnenen Hormone und Analogen derselben zeigen die Ergebnisse von Radioimmunttests, daß Antikörper zu dem natürlichen Hormon in etwa die gleiche Affinität zu dem durch einen geeigneten Mikroorganismus produzierten und erfindungsgemäß aufgearbeiteten Hormon oder Analogen desselben besitzen. In ähnlicher Weise belegen Radiorezeptorbindungstests, daß die Bindungsaktivität geeigneter Membrane für erfindungsgemäß gewonnene und gereinigte Hormone oder Analoge derselben der Bindungsaktivität für authentische Proben der natürlichen Hormone entsprechen. Schließlich lassen sich keine Antikörper gegen die Hormone oder Analoge derselben nach entweder Primärinjektionen oder Zusatzinjektionen der Peptide in geeignete Tiere nachweisen. Schließlich hat es sich auch noch gezeigt, daß das Rinderwachstumshormonanaloge bei Verabreichung an laktierende Kühe die Laktation steigert. Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher veranschaulichen.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Wachstum von E. coli und Produktion eines bGH-Analogen

1. Vorratskulturen

Vorratskulturen des E. coli Stammes ATCC Nr. 39806, der beim Wachsen und bei der Induktion das bGH-Analoge Met-Asp-Gln-bGH produziert, werden auf einem Caseinmedium (vgl. 2. Impfgut) wachsen gelassen, dann zweifach mit Gefriermedium verdünnt und bei –80°C gelagert. Das Gefriermedium enthält pro 500 ml:

K ₂ HPO ₄	6,3 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g
Na-Citrat	0,45 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,09 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,9 g
Glycerin	44,0 g.

2. Impfgut

Das Impfgut wird in 20g/l Caseinhydrolysat, 10g/l Hefeextrakt und 2g/l NaCl fortgepflanzt. Zu diesem Zweck wird ein steriles Medium in einem Schüttelkolben mit Vorratskultur beimpft und dann 15 h lang auf einem Rüttler bei 30°C und einer Rüttelbewegung von etwa 200 Umdrehungen/min inkubiert. Eventuell weitere Folgeschritte bei der Impfgutfortpflanzung werden in gerührten und belüfteten Gärbottichen durchgeführt. Das sterile Medium wird mit 2–10% Impfgutkultur beimpft und 15 h bei 30°C und einem pH-Wert von 7 ± 0,5 inkubiert. Während der Inkubation wird gerührt und belüftet, um einen Gehalt an gelöstem Sauerstoff bei etwa 20% Luftsättigung zu gewährleisten.

3. Produktion

Das Produktionsmedium enthält:

Caseinhydrolysat	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
K ₂ HPO ₄	2,5 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1 g/l
NaCl	5 g/l
Biotin	0,1 mg/l
Thiamin	1 mg/l
Spurenelementlösung	3 ml/l.

Das Medium enthält ferner 100 mg/l Ampicillin. Der Ampicillinzusatz stellt für die Produktion lediglich eine Gegebenenfallsmaßnahme dar. Er wurde jedoch immer in dem zum Wachsenlassen des Impfguts verwendeten Medium gefunden.

Konzentrierte Lösungen von Biotin, Thiamin und Ampicillin werden getrennt filtrationssterilisiert und dem sterilen Produktionsmedium vor der Beimpfung zugesetzt. Zunächst wird auch eine sterile Glucoselösung zugegeben, um 10 g/l Glucose zu liefern. In der Induktionsstufe werden weitere 10 g/l Glucose zugeführt.
Die Spurenelementlösung enthält:

FeCl ₃	16 g/l
ZnCl ₂ · 4 H ₂ O	2 g/l
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	2 g/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2 g/l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1 g/l
CuCl ₂	1 g/l
H ₃ BO ₃	0,5 g/l
konz. HCl	100 ml/l.

Das Medium wird mit 0,5–10% Impfstoffkultur beimpft und bei 30°C inkubiert. Hierbei wird so stark bewegt und belüftet, daß ein Gehalt an gelöstem Sauerstoff oberhalb 20% Luftsättigung erhalten bleibt. Der pH-Wert wird mit Hilfe von NH₃ auf 7,0 bis 7,5 ± 0,2 gehalten. Wenn die Zellkonzentration etwa 3,5 g/l erreicht (OD₆₆₀ = 10), wird mit der Induktion begonnen, indem die Temperatur auf 42°C erhöht wird. Nun wird die Temperatur 1–5 h lang auf 42°C gehalten, worauf die Zellen aus der Zellsuspension geerntet werden können.

Beispiel 2

Ernten der Zellen

500 l gemäß Beispiel 1 erhaltener Zellsuspension mit 6,15 DCW/l und 490 mg bGH/l werden auf Raumtemperatur gekühlt und in einen Lagertank überführt. Danach wird die Zellsuspension auf einer röhrenförmigen Korbzentrifuge (CEPA 101) mit 14000 Umdrehungen/min (16000 × g) bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 250 l/h zentrifugiert. Die CEPA 101-Zentrifuge besitzt eine Rohrlänge von 73,7 cm, einen Radius des Auslaßwehres von 3,25 cm und einen Radius der Korbwand von 7,35 cm. Sie ist mit Beschleunigungsflossen ausgestattet und besitzt eine Kühlung am Außenmantel. Die klare überstehende Flüssigkeit besitzt eine Dichte von 1,0 g/ml und enthält bGH nicht in nachweisbarer Menge. Sie wird verworfen. Der 11,4 kg (75%ige Feuchtigkeit) wiegende Kuchen enthält das gesammelte bGH und wird weiterverarbeitet. Der Kuchen ist typischerweise etwa 2 cm dick und besitzt eine Dichte von 1,1 g/ml. Eine Alternativmaßnahme besteht darin, die Zellen sich über Nacht absetzen zu lassen und die klare überstehende Flüssigkeit abzusaugen.

Testverfahren:

Quantitative Gelabtestung auf der Zellsuspension, der überstehenden Flüssigkeit und dem Kuchen.

Stufenausbeute*: 100%

Gesamtausbeute: 100%

Entnahmevolumen: 2,3% ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 21,5 g bGH/kg Kuchen

Anreicherungsfaktor: 44 (bGH-Konzentration in der Entnahmemenge/bGH Konzentration in der zugeführten Menge).

* Die Ausbeuten werden durch Bestimmung der OD-Einheiten ermittelt. Letztere Einheiten sind definiert als Absorption der Lösung bei 280 nm (1 cm Küvette) mal das Volumen der Lösung in ml. Wenn beispielsweise der OD-Wert 9,1 beträgt und die Lösung ein Volumen von 32600 ml aufweist, ist der Wert der OD-Einheiten 297 000 OD. Wenn die Absorptionsablesung bei einem pH-Wert von 9 erfolgt, kann der OD-Wert durch Multiplizieren mit dem Umrechnungsfaktor 0,00157 in Gramm bGH, also 14,3 g bGH/l, umgerechnet werden.

Beispiel 3

Aufbrechen der Zellen

11,4 kg der feuchten Zellen aus der Zellenernte (Beispiel 2) werden in insgesamt 45,6 l 50 mM Tris:50 mM NaCl-Puffer (pH-Wert: 7,4) suspendiert. Als Hilfsmittel zum Dispergieren des Kuchens bedient man sich eines handelsüblichen Mischers hoher Scherkraft. Die suspendierten Zellen werden einer handelsüblichen Kugelmühlenaufbrechvorrichtung (Dynamill KD-5 Firma Willy A. Bachofen, Basel) mit einer Geschwindigkeit von 80 l/h zugeführt. Die Kugelmühle wird durch Kühlen bei einer Temperatur von –10°C bis +8°C betrieben. Danach werden die aufgebrochenen Zellen mit einem gleichen Volumen entionisierten Wassers verdünnt, worauf mit Hilfe der röhrenförmigen Korbzentrifuge CEPA 101 zentrifugiert wird. Bei Zufuhrgeschwindigkeit zur Zentrifuge beträgt 30–60 l/h. Sämtliche Zentrifugierbedingungen mit Ausnahme der Zugabegeschwindigkeit entsprechen den Zentrifugierbedingungen bei der Ernte der Zellen. Die etwa 10% des in der zugeführten Suspension enthaltenen bGH enthaltende überstehende Flüssigkeit wird verworfen. Der 5,28 kg wiegende Kuchen (75% feuchte) enthält das angesammelte bGH und wird weiterverarbeitet.

Puffer beim Aufbrechen (50 mM Tris:50 mM NaCl; pH-Wert: 7,4):

6,06 g Tris und 2,97 g NaCl in 750 ml entionisierten Wassers werden mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, dann mit 1 l entionisierte Wassers verdünnt und erforderlichenfalls erneut auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Testverfahren:

Quantitative Gelabtestung auf der Zellsuspension, der überstehenden Flüssigkeit und dem Kuchen.

Stufenausbeute: 90 %
 Gesamtausbeute: 90 %
 Entnahmevolumen: 1,05 % des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens
 Errechneter Gehalt: 37,1 g bGH/kg Kuchen
 Anreicherungsfaktor: 1,7.

Beispiel 4 Lysozymbehandlung

Die aus der Stufe des Aufbrechens der Zellen (Beispiel 3) stammenden 5,28 kg feuchter Kuchen werden in insgesamt 13,7 l 50 mM Tris:50 mM EDTA-Puffer (pH-Wert: 7,4) suspendiert. Als Hilfsmittel beim Dispergieren des Kuchens bedient man sich eines handelsüblichen Mischers hoher Scherkraft. Nun wird Lysozym (Sigma Grade II) zugegeben (0,05 g/l Aufschlämmung; die Aufschlämmung wird 1 h lang bei 37 °C durchgemischt). Ferner wird Triton X-100 (der Firma Rohm & Haas Co., Philadelphia, PA) zugesetzt (100 ml einer 10%igen [v/v] Pufferlösung eines pH-Werts von 7,4/l, wobei eine Endkonzentration von 1% Triton X-100 erreicht wird), worauf das Gemisch weitere 30 min lang inkubiert wird. Nun wird die Aufschlämmung mit Hilfe eines handelsüblichen beheizten 370-Watt-Beschallungsgeräts, das auf 65%ige Leistung eingestellt und mit einer Strömungszelle ausgestattet ist, beschallt. Die Strömungsgeschwindigkeit durch das Beschallungsgerät beträgt 18 l/h. Schließlich wird die beschallte Aufschlämmung auf der Zentrifuge CEPA 101 mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 30 l/h zentrifugiert. Sämtliche Zentrifugierbedingungen mit Ausnahme der Zufuhrgeschwindigkeit entsprechen den Zentrifugierbedingungen bei der Ernte der Zellen. Die etwa 3% des in der zugeführten Menge enthaltenen bGH enthaltende überstehende Flüssigkeit wird verworfen. Der 3,07 kg (75%ige Feuchte) wiegende Kuchen enthält die angesammelte bGH und wird weiterverarbeitet.

Lysozympuffer (50 mM Tris:50 mM EDTA; pH-Wert: 7,4):

6,06 g Tris und 14,6 g EDTA in 750 ml entionisierten Wassers werden mit konzentrierter HCl oder 50%iger NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, auf 1 l mit entionisiertem Wasser verdünnt und erforderlichenfalls erneut auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Testverfahren:

Quantitative Gelabtastung auf der Zellsuspension, der überstehenden Flüssigkeit und dem Kuchen.

Stufenausbeute: 97 %

Gesamtausbeute: 87,3 %

Entnahmevolumen: 0,61 % des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 61,9 g bGH/kg Kuchen

Anreicherungsfaktor: 1,7.

Beispiel 5 Erste Wäsche

3,07 kg feuchter Kuchen aus der Lysozymstufe (Beispiel 4) werden in insgesamt 6,8 l 20 mM Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 suspendiert. Als Dispergierhilfe bedient man sich eines handelsüblichen Mischers hoher Scherkraft. Die Aufschlämmung wird bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 18 l/h mit Hilfe eines handelsüblichen, auf 65 % Leistung eingestellten, beheizten 370-Watt-Beschallungsgeräts beschallt. Nach der Beschallung wird die Aufschlämmung auf der Zentrifuge CEPA 101 bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 30 l/h zentrifugiert. Sämtliche Zentrifugierbedingungen mit Ausnahme der Zufuhrgeschwindigkeit entsprechen den Zentrifugierbedingungen bei der Ernte der Zellen. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen. Die erhaltenen 2,46 kg (75 % Feuchte) Kuchen enthalten das angesammelte bGH und werden weiterverarbeitet.

Bei der ersten Wäsche verwendeter Puffer (20 mM Tris, pH-Wert: 7,4):

2,42 g Tris in 750 ml entionisierten Wassers werden mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, mit entionisiertem Wasser auf 1 l verdünnt und erforderlichenfalls erneut auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Testverfahren:

Quantitative Gelabtastung auf der Zellsuspension, der überstehenden Flüssigkeit und dem Kuchen.

Stufenausbeute: 100 %

Gesamtausbeute: 87,3 %

Entnahmevolumen: 0,49 % des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 77,3 g bGH/kg feuchtem Kuchen

Anreicherungsfaktor: 1,2.

Beispiel 6 Salzwäsche

Die 2,46 kg feuchter Kuchen aus der ersten Waschstufe (Beispiel 5) werden in insgesamt 6,8 l 50 mM Tris:100 mM NaCl-Puffer eines pH-Werts von 7,4 suspendiert. Als Dispergierhilfe für den Kuchen bedient man sich eines handelsüblichen Mischers hoher Scherkraft. Die Aufschlämmung wird danach bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 18 l/h mit Hilfe eines auf 65 % Leistungsvermögen eingestellten, beheizten 370-Watt-Beschallungsgeräts beschallt. Nach der Beschallung wird die

Aufschlammung auf der Zentrifuge CEPA 101 bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 30l/h zentrifugiert. Sämtliche Zentrifugierbedingungen mit Ausnahme der Zufuhrgeschwindigkeit entsprechen den Zentrifugierbedingungen bei der Ernte der Zellen. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen. Letztlich werden 2,15 kg (75% Feuchte) Kuchen mit dem angesammelten bGH erhalten. Dieser Kuchen wird weiterverarbeitet.

Puffer bei der Salzwäsche (50 mM Tris; 100 mM NaCl; pH-Wert: 7,4):

6,06 g Tris und 5,85 g Natriumchlorid in 750 ml entionisierten Wassers werden mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, mit entionisiertem Wasser auf 1 l verdünnt und erforderlichenfalls erneut auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Testverfahren:

Quantitative Gelabtastung auf der Zellsuspension, der überstehenden Flüssigkeit und dem Kuchen.

Stufenausbeute: 100%

Gesamtausbeute: 87,3%

Entnahmevolumen: 0,43% des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 88,4 g bGH/kg Kuchen

Anreicherungsfaktor: 1,14.

Beispiel 7

Erste Wäsche mit Wasser

Die in der Salzwäschstufe (Beispiel 6) erhaltenen 2,15 kg feuchter Kuchen werden in insgesamt 13,7 l entionisierten, keimfreien Wassers suspendiert. Als Dispergierhilfe für den Kuchen bedient man sich eines handelsüblichen Mischers hoher Scherkraft. Danach wird die Aufschlammung bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 18 l/h durch das auf 65% Leistung eingestellte, beheizte 370-Watt-Beschallungsgerät beschallt. Der pH-Wert der Aufschlammung sollte vom Ausgangs-pH-Wert des Wassers von etwa 6,2 auf etwa 7,8–8,0 ansteigen. Nach der Beschallung wird die Aufschlammung auf der Zentrifuge CEPA 101 bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 30 l/h zentrifugiert. Sämtliche Zentrifugierbedingungen, mit Ausnahme der Zugabemenge, entsprechen den Zentrifugierbedingungen bei der Ernte der Zellen. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen. Die erhaltenen 1,90 kg (75% Feuchte) Kuchen enthalten das angesammelte bGH und werden weiterverarbeitet.

Testverfahren:

Quantitative Gelabtastung auf der Zellsuspension, der überstehenden Flüssigkeit und dem Kuchen.

Stufenausbeute: 99%

Gesamtausbeute: 86,4%

Entnahmevolumen: 0,38% des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 99,0 g bGH/kg Kuchen

Anreicherungsfaktor: 1,12.

Beispiel 8

Zweite Wäsche mit Wasser

Die 1,90 kg feuchter Kuchen aus der ersten, unter Verwendung von Wasser durchgeführten Waschstufe (Beispiel 7) werden in insgesamt 13,7 kg entionisierten, keimfreien Wassers suspendiert. Als Dispergierhilfe für den Kuchen bedient man sich eines handelsüblichen Mischers hoher Scherkraft. Der pH-Wert der Aufschlammung sollte etwa 8,4 betragen. Die Aufschlammung wird nun bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 18 l/h durch das auf 65% Leistung eingestellte, beheizte 370-Watt-Beschallungsgerät beschallt. Nach der Beschallung wird die Aufschlammung auf der Zentrifuge CEPA 101 bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 30 l/h zentrifugiert. Sämtliche Zentrifugierbedingungen mit Ausnahme der Zugabemenge entsprechen den Zentrifugierbedingungen bei der Ernte der Zellen. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen. Die 1,31 kg (75% Feuchte) Kuchen enthalten das angesammelte bGH und werden weiterverarbeitet.

Testverfahren:

Quantitative Gelabtastung auf der Zellsuspension, der überstehenden Flüssigkeit und dem Kuchen.

Stufenausbeute: 99%

Gesamtausbeute: 85,6%

Entnahmevolumen: 0,26% des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 160 g bGH/g Kuchen

Anreicherungsfaktor: 1,62.

Beispiel 9

Auflösungsstufe

Die 1,31 kg feuchter Kuchen aus der zweiten, unter Verwendung von Wasser durchgeführten Waschstufe (Beispiel 8) werden in insgesamt 32,6 l entionisierten, keimfreien Wassers suspendiert. Als Dispergierhilfe für den Kuchen bedient man sich eines handelsüblichen Mischers hoher Scherkraft. Durch Zugabe von 10 N NaOH wird der pH-Wert langsam auf 11,8 eingestellt. Die in der Suspension angesammelte bGH geht langsam innerhalb von 1 h in Lösung. Nach 1-stündiger Inkubationszeit wird bei einem pH-Wert von 11,8 langsam so viel 1 M Natriumkarborat zur der Lösung zugegeben, daß die Endkonzentration der Lösung an Natriumborat 10 mM beträgt. Vor der Beschallung durch das auf 65% Leistung eingestellte, beheizte 370-Watt-Beschallungsgerät wird die Lösung 30 min lang stehengelassen. Die Zugabemenge zu dem Beschallungsgerät beträgt 18 l/h. Wenn die Lösung sehr trüb ist, wird sie bei 30 l/h mittels der Zentrifuge CEPA 101 zentrifugiert, ansonsten wird die Lösung in 5 Liter-Anteilen in einem einzigen Buchner-Filter durch drei, einen Durchmesser von 24 cm aufweisende Whatman Nr. 2-Filterpapiere filtriert. Um ein Schäumen während des Filtrierens zu verhindern, erfolgt die Filtration unter einem geeigneten Vakuum. Es sind nur Spuren an unlöslichem Material festzustellen. Die 32,6 l Filtrat enthalten das bGH in Lösung.

Die Absorption der geklärten Lösung beträgt 9,10 O.D. bei 280 nm (1 cm Küvette). Würde die gesamte Absorption von bGH herrühren, was allerdings nicht der Fall ist, entspräche dies 14,3 g bGH/l. Der wahre bGH-Gehalt beträgt jedoch weniger als die Hälfte dieses Werts. UV-Licht absorbierende Verunreinigungen sind für diesen Unterschied verantwortlich. Eine Adsorption von 1,0 bei 280 nm (1 cm Küvette) liefert eine Lösung von 1,57 g/l reines bGH bei einem pH-Wert von 9 (die Absorption von bGH ändert sich mit dem pH-Wert).

Puffer zum Auflösen (1 M Natriumborat bei einem pH-Wert von 11,8):

Nach dem Auflösen von 61,8 g Borsäure in 750 ml entionisiertem Wassers wird der pH-Wert der Lösung mit 50%iger NaOH auf 11,8 eingestellt. Danach wird mit entionisiertem Wasser auf einem Endvolumen von 1 l eingestellt.

Testverfahren:

Quantitative Gelabtestung auf der Zellsuspension, der überstehenden Flüssigkeit und dem Kuchen.

Stufenausbeute: 100%

Gesamtausbeute: 85,6%

Entnahmevolumen: 6,8% des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 6,2 g bGH/l

Anreicherungsfaktor: 0,039.

Beispiel 10

100-K-Ultrafiltration

Die 32,6 l der in Beispiel 9 erhaltenen geklärten Proteinlösung (297 000 OD) werden in getrennte Anteile ($6 \times 5,4$ l) mit jeweils einer Absorption von 50 000–60 000 OD geteilt. Jeder Anteil wird getrennt durch ein handelsübliches Ultrafilterkassettensystem (Pellicon der Firma Millipore, Bedford, MA) mit drei 100 000 Molekulargewicht-Schnittkassetten (Type PTHK) von jeweils 4645 cm² Fläche filtriert. Der erste Anteil wird auf 1 l Rückstandvolumen konzentriert. Das Ultrafiltrat wird gesammelt, mittels UV-Licht getestet und weiterverarbeitet. Der Rückstand wird mit frischem 10 mM Natriumboratspuffer bei einem pH-Wert von 11,8 auf sein ursprüngliches Volumen verdünnt und gründlich durchgemischt. Danach wird die Charge erneut auf 1 l Rückstandvolumen konzentriert. Das Ultrafiltrat wird gesammelt und mit dem ersten Ultrafiltrat vereinigt. Wenn der Gesamtbetrag der OD-Absorption in den Ultrafiltraten laufend 20% der OD-Absorption der Anfangscharge auf das Ultrafilter entspricht, wird ein Rückstand-Volumen bei der nächsten Konzentration von 0,5 l anstelle von 1 l gewählt. Der Zyklus von Konzentration und Verdünnung mit 10 mM Natriumboratspuffer wird so lange fortgesetzt, bis das Ultrafiltrat aus einem Rückstandvolumen von 0,5 l eine Absorption von 280 nm (1 cm Küvette) von unter 0,1 aufweist. Dies erfordert normalerweise zwischen 9 und 12 Zyklen aus Ultrafiltration und Verdünnung. Der Endrückstand wird verworfen. Die Strömungsgeschwindigkeiten bei der Ultrafiltration ergeben sich aus der folgenden Tabelle I.

Sämtliche Ultrafiltrate werden danach miteinander vereinigt und mit 6 N HCl auf einen pH-Wert von 9,0 eingestellt. Die anderen 5,4-l-Anteile werden in ähnlicher Weise mit Hilfe des Pellicon-Systems behandelt. Sämtliche bezüglich ihres pH-Werts eingestellten Ultrafiltrate werden dann miteinander vereinigt. Ein typischer Versuch liefert insgesamt 380 l Ultrafiltrat mit einer Absorption von 0,26 OD/ml entsprechend einem Gesamt-OD-Wert von 100 000 (bei einem pH-Wert von 12) und dauert 24–40 h bis zur Vervollständigung.

Tabelle I

Strömungsgeschwindigkeiten bei der 100 K Molekulargewicht-Ultrafiltration*
Bedingungen

	Zufuhr-geschwindigkeit pro Einheit Membranfläche	Strömungs- geschwindig- keit bei 3 Kassetten (1,39 m ²)
Ultrafiltrationsgeschwindigkeit bei am stärksten konzentriertem Rückstand	1,72 ml/h cm ²	24 l/h
Ultrafiltrationsgeschwindigkeit bei am stärksten verdünnten Rückstand	2,58 ml/h cm ²	36 l/h
Rezirkulationsgeschwindigkeit bei am stärksten konzentrierten Rückstand	77,5 ml/h cm ²	18 l/min
Rezirkulationsgeschwindigkeit bei am stärksten verdünnten Rückstand	38,75 ml/h cm ²	9 l/min

* Bei einem Einlaßdruck von 343 kPa (Manometerdruck) und einem Rückdruck von 34,3 kPa (Manometerdruck).

Testverfahren:

Quantitative Gelabtestung auf Eingabe und Absorption bei 280 nm (1 cm Küvette) auf Entnahme; qualitative Gelchromatographie

Stufenausbeute: 75,5%

Gesamtausbeute: 64,6%

Entnahmevolumen: 76% des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 0,4 g bGH/l

Anreicherungsfaktor: 0,065.

Zur Bestimmung des Ausmaßes und der Qualität der Trennung werden die zugegebene Charge, der Rückstand und das Ultrafiltrat mit Hilfe von Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)-Gelchromatographie überwacht.

Die Bedingungen für die Gelsäule sind:

Durchmesser: 2,6 cm;

Länge: 100 cm

Gesamtvolumen: 500 ml

Porenvolumen: 150 ml

Strömungsgeschwindigkeit: 40–60 ml/h

Beladung: 50 OD in 5 ml

Eluiermittel: 10 mM Natriumborat bei einem pH-Wert von 12

normale Laufzeit: 5 h

Nachweis: 280 nm UV.

Puffer für die Gelchromatographie (10 mM Natriumborat bei einem pH-Wert von 12):

Vgl. hierzu Beispiel 9.

Beispiel 11

Ionenaustauschchromatographie

Die vereinigten Ultrafiltrate (380 l mit einer Absorption von 100 000 OD) aus der 100 K Ultrafiltration des Beispiels 10 werden mit einer linearen Strömungsgeschwindigkeit von 93 cm/h (100 l/h) auf eine Sepharose CL-6B DEAE-Ionenaustauschsäule (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) aufgegeben. Die Säule hat einen Durchmesser von 37 cm und eine Höhe von 15 cm. Die aufweisende Säule wird mit zwei Bettvolumina (32 l) 10 mM Natriumboratpuffer bei einem pH-Wert von 9,0 gewaschen. Das Eluat aus den Aufgabe- und Waschstufen wird verworfen. Eine Stufenänderung im Eluiermittel auf 10 mM Natriumborat: 100 mM Natriumchlorid bei einem pH-Wert von 9 verdrängt das bGH aus der Säule. Die Eluierströmungsgeschwindigkeit beträgt 93 cm/h. Das Fortschreiten der Eluierung wird durch Verfolgen der Absorption des Eluats bei 280 nm überwacht. Der bGH-Peak wird in 4–5 Bettvolumina (84 l mit einer Gesamtabsorption von 43 000 OD) gesammelt und weiterverarbeitet. Die durchschnittliche Konzentration der bGH-Fraktion beträgt 0,8 g bGH/l.

Die Säule wird durch Waschen des Betts mit einer Geschwindigkeit von 93 cm/h entsprechend der folgenden Anweisung regeneriert: Ein Bettvolumen 1 M Natriumacetat, das mit HCl auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt ist, wird auf die Säule appliziert, danach folgend 1,5 Bettvolumina 0,5 N NaOH. Nach der Behandlung mit der NaOH wird die Säule 2 h lang stehengelassen und dann mit 1,5 Bettvolumina 1 M Natriumacetat, das mit HCl auf 3,0 eingestellt ist, gewaschen. Schließlich wird das Bett mit 10 mM Natriumborat (pH-Wert: 9) ins Gleichgewicht gesetzt, indem mindestens drei Bettvolumina Puffer durch das Ionenaustauschbett hindurchlaufen gelassen werden. Die Leitfähigkeit und der pH-Wert des Eluats sollten gegen die eintretende Lösung geprüft werden.

Testverfahren:

Absorption bei 280 nm (1 cm Küvette).

Stufenausbeute: 43%

Gesamtausbeute: 27,7%

Entnahmekonzentration: 16,8% des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 0,8 g bGH/l

Anreicherungsfaktor: 2.

Puffer zum Waschen der Säule (10 mM Natriumborat eines pH-Werts von 9):

0,62 g Borsäure in 750 ml entionisierten Wassers werden mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 10 eingestellt, mit entionisiertem Wasser auf 1 l verdünnt und erforderlichenfalls erneut auf einen pH-Wert von 9,0 eingestellt.

Eluierpuffer (10 mM Natriumborat, 100 mM Natriumchlorid, pH-Wert: 9):

3,81 g Natriumboratdecahydrat und 5,85 g Natriumchlorid in 750 ml entionisierten Wassers werden mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 9,0 eingestellt, mit entionisiertem Wasser auf 1 l verdünnt und erforderlichenfalls erneut auf einen pH-Wert von 9,0 eingestellt.

Regenerationspuffer (1 M Natriumacetat, pH-Wert: 3,0):

136,09 g Natriumacetat · 3 H₂O in 750 ml entionisierten Wassers werden mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt, mit entionisiertem Wasser auf 1 l verdünnt und erforderlichenfalls erneut auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt.

Beispiel 12

Konzentration und Dialyse

Die bGH-Fraktion aus der Ionenaustauschstufe (84 l, 43 000 OD) des Beispiels 11 wird mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt. Die eingestellte Lösung wird durch Ultrafiltration durch ein Millipore Pellicon-Ultrafilter, das mit drei 10 000 Molekulargewicht-Schnittkassetten (Type PTGC) einer Fläche von jeweils 4645 cm² ausgestattet war, konzentriert, bis die errechnete Absorption bei 280 nm (1 cm Küvette) des Rückstands 10 beträgt. Das Ultrafiltrat sollte kein bGH enthalten und wird verworfen. Der Rückstand ist üblicherweise um einen Faktor von grob 20 (4,2 l Rückstand) konzentriert. Die Strömungsgeschwindigkeiten sind in der folgenden Tabelle II angegeben.

Nach der Konzentration des bGH wird die Lösung durch Dialyse gegen NH₄OH unter Verwendung des Pellicon-Systems mit der 10 K Molekulargewicht-Schnittkassette (Diafiltration) entsalzt. Der Rückstand wird kontinuierlich mit 3 mM NH₄OH-Lösung (25 Volumina/Volumen Rückstand oder in diesem Falle 103 l 3 mM NH₄OH) versetzt, wobei die Zugabemenge gerade ausreicht, um den Volumenverlust durch Diafiltration auszugleichen. Das Diafiltrat wird verworfen. Es enthält Salze und 10% des eingeführten bGH, wie eine Absorptionsmessung zeigt. Der das entsalzte bGH enthaltende Rückstand wird aus dem Pellicon-System abgezogen. Das Ultrafilter wird nun mit einer geringen Menge 3 mM NH₄OH gewaschen, worauf die Waschflüssigkeit mit dem Rückstand vereinigt wird. Das Rückstandsvolumen vor Zugabe der Waschflüssigkeit beträgt 4,2 l (39 000 OD) bei einer Konzentration von 14,6 g bGH/l. Die Strömungsgeschwindigkeiten ergeben sich aus Tabelle III.

Tabelle II

Strömungsgeschwindigkeiten bei der 10K Molekulargewicht-Ultrafiltration*
Bedingungen

	Zufuhrgeschwindigkeit pro Einheit Membranfläche	Strömungs- geschwindig- keit bei 3 Kassetten (1,39 m ²)
Ultrafiltrationsgeschwindigkeit bei am stärksten konzentrierten Rückstand	1,94 ml/h cm ²	27 l/h
Ultrafiltrationsgeschwindigkeit bei am stärksten verdünnten Rückstand	2,58 ml/h cm ²	36 l/h
Rezirkulationsgeschwindigkeit bei am stärksten konzentrierten Rückstand	9,69 ml/h cm ²	2,25 l/min
Rezirkulationsgeschwindigkeit bei am stärksten verdünnten Rückstand	6,46 ml/h cm ²	1,5 l/min

* Bei einem Einlaßdruck von 137 kPa (Manometerdruck) und einem Rückdruck von 68,7 kPa (Manometerdruck).

Tabelle III

Strömungsgeschwindigkeiten für die Diafiltration* gegen 3 mM NH₄OH
Bedingungen

	Zufuhrgeschwindigkeit pro Einheit Membranfläche	Strömungs- geschwindig- keit bei 3 Kassetten (1,39 m ²)
Ultrafiltrationsgeschwindigkeit	2,58 ml/h cm ²	36 l/h
Rezirkulationsgeschwindigkeit	9,69 ml/h	2,25 l/min

hl.25

* Bei einem Einlaßdruck von 103 kPa (Manometerdruck) und einem Rückdruck von 34,3 kPa (Manometerdruck)

Testverfahren:

Absorption bei 280 nm (1 cm Küvette).

Stufenausbeute: 90%

Gesamtausbeute: 25%

Entnahmevolumen: 0,84% des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 14,6 bGH/l

Anreicherungsfaktor: 18,3.

Beispiel 13

Gefriertrocknung

Der Rückstand und die Waschflüssigkeit aus der Dialysestufe (4,2l, 39000 OD bei einer Konzentration von 14,6 g bGH/l) werden in einem großen Glasgefäß „schalegefroren“. Nun wird das Glasgefäß 24–48 h lang an einen Laboratoriumsgefriertrockner angeschlossen, bis der Gefäßinhalt zur Trockene lyophilisiert ist. Die Außenfläche des Glasgefäßes ist während des gesamten Trocknungszyklus der Außentemperatur ausgesetzt. Es findet kein nachweisbarer bGH-Verlust statt. Das bGH (61,3 g) fällt als flaumiges, weißes Pulver an.

Testverfahren:

Absorption des eingegebenen Materials und Freigabetests am trockenen bGH.

Stufenausbeute: 100%

Gesamtausbeute: 25%

Entnahmevolumen: 0,012% des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens

Errechneter Gehalt: 100% Maischevolumen

Anreicherungsfaktor: 68.