



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 292 023 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/71
C 12 N 15/21

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 338 000 2	(22)	21. 02. 90	(44)	18. 07. 91
(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Schroeckh, Volker, Dipl.-Biol.; Hartmann, Manfred, Dr. rer. nat.; Birch-Hirschfeld, Eckard; Riesenberg, Dieter, Dr. sc. nat., DE				
(73)	Akademie der Wissenschaften, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Beutenbergstraße 11, O - 6900 Jena, DE				
(74)	siehe (73)				
(54)	Verfahren zur Erhöhung der Expression rekombinanter Gene in Escherichia coli				

(55) Herstellung von rekombinanten DNS-Produkten in E. coli; Expression rekombinanter Gene; E. coli-Wirts-Vektor-Systeme; cap-Sequenz; cap-modifizierter Tryptophan-Promotor; Expressionseinheit; Fermentation unter Glucose-Mangelbedingungen; kontinuierliche Fermentation; fed batch-Fermentation

(57) Die Erfindung betrifft ein verbessertes gentechnisch-mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von rekombinanten DNS-Produkten in E. coli-Zellen – und zwar ein Verfahren jenes Grundtyps, in dem die Gene für die gewählten Proteine mit Hilfe von Plasmidvektoren in die Produzentenstämme eingeschleust werden. Sie verfolgt das Ziel, in ausgewählten E. coli-Wirts-Vektor-Systemen die Leistung bei der Expression vorwiegend heterologer rekombinanter Gene wesentlich zu steigern. Die dieser Zielstellung zugeordnete technische Aufgabe wird gelöst, indem Zellen eines herangezogenen E. coli-Stammes zunächst jeweils mit einem neuen Expressionsplasmid transformiert werden, in welchem das gewählte Strukturgen (beispielsweise ein Interferon-Gen) der Kontrolle einer aus dem E. coli-Tryptophan-Promotor sowie einer vorgeschalteten sog. E. coli-cap-Sequenz aufgebauten Expressionseinheit unterworfen ist, und für die so transformierten E. coli-Zellen anschließend eine Fermentation unter Glucose-Mangelbedingungen erfolgt. Die Effizienz der vorgeschlagenen Methode wird an mehreren Beispielen demonstriert, die sich unter anderem auch hinsichtlich der Fermentationsart unterscheiden (kontinuierliche Fermentation; fed batch-Fermentation), in welchem die oben charakterisierten Mangelbedingungen realisiert werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Erhöhung der Expression rekombinanter Gene in *Escherichia coli* auf gentechnisch-mikrobiologischem Wege unter Rückgriff auf rekombinante Plasmide als Expressionsvektoren, **gekennzeichnet dadurch**, daß man
 - Zellen eines *E. coli*-Stammes jeweils mit einem Expressionsplasmid transformiert, in welchem das gewählte Strukturgen der Kontrolle einer aus dem *E. coli*-Tryptophan-Promotor sowie einer vorgeschalteten sog. *E. coli*-cap-Sequenz aufgebauten Expressionseinheit (Kurzwort: cap-trpPO-EE) unterworfen ist, (Schritt 1) und
 - die erhaltenen transformierten *E. coli*-Zellen unter Glucosemangelbedingungen fermentiert (Schritt 2).
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man in Schritt 1 jeweils ein *E. coli*-Expressionsplasmid verwendet, welches in seiner cap-trpPO-EE die cap-Sequenz des *E. coli*-Lactosepromotors (Kurzwort: cap[lacPO])

5'-TAATGTAGTTAGCTCACTCA-3'

enthält.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß man in Schritt 1 jeweils ein Expressionsplasmid verwendet, in welchem die cap(lacPO)-Sequenz in einem Abstand von 18 Nucleotiden stromauf der -35-Region des trpPO angeordnet ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß man Zellen des Stammes *E. coli* TG 1 mit dem Expressionsplasmid pDR720cap, in dem das *E. coli*-Galactokinase-Gen (Kurzwort: galK-Gen) der Kontrolle der cap-trpPO-EE obiger Kennzeichnung unterworfen ist, transformiert.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß man in Schritt 1 Zellen des Stammes *E. coli* TG 1 mit dem Expressionsplasmid PHRW500cap, in dem das humane Interferonalpha 1-Gen (Kurzwort: hIFN 1-Gen) der Kontrolle der cap-trpPO-EE obiger Kennzeichnung unterworfen ist, transformiert.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß man das jeweils erhaltene *E. coli*-Wirts-Vektor-System in einem Glucose-Mineral-salz-Medium unter Glucosemangelbedingungen fermentiert.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß man das jeweils erhaltene *E. coli*-Wirts-Vektor-System in Schritt 2 in einem Glucose-Mineral-salz-Medium unter Mangelbedingungen obiger Kennzeichnung in kontinuierlicher Kultur mit einer Verdünnungsrate D (in h^{-1}) im Bereich $0 < D < D_c$ fermentiert (D_c — kritische Verdünnungsrate).
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß man das jeweils erhaltene *E. coli*-Wirts-Vektor-System in einem Glucose-Mineral-salz-Medium unter Mangelbedingungen obiger Kennzeichnung mit einer Verdünnungsrate im Bereich $0,08 D_c < D < 0,5 D_c$ fermentiert.
9. Verfahren gemäß 4, 6 und 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß man das Wirts-Vektor-System *E. coli* TG 1 (pDR720cap) in einem Glucose-Mineral-salz-Medium unter Mangelbedingungen obiger Kennzeichnung mit einer Verdünnungsrate im Bereich $0,03 h^{-1} < D < 0,16 h^{-1}$ fermentiert.
10. Verfahren gemäß Anspruch 5, 6 und 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß man das Wirts-Vektor-System *E. coli* TG 1 (pHRW500cap) in einem Glucose-Mineral-salz-Medium unter Mangelbedingungen obiger Kennzeichnung mit einer Verdünnungsrate im Bereich $0,03 h^{-1} < D < 0,16 h^{-1}$ fermentiert.
11. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß man das jeweils erhaltene *E. coli*-Wirts-Vektor-System in Schritt 2 in einem Glucose-Mineral-salz-Medium in fed batch-Kultur nach anfänglich unlimitiertem Wachstum mit der spezifischen Wachstumsrate $\mu = \mu_{max}$ sodann unter Mangelbedingungen obiger Kennzeichnung mit einer spezifischen Wachstumsrate (in h^{-1}) im Bereich $0 < \mu < \mu_{max}$ fermentiert.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß man das jeweils erhaltene *E. coli*-Wirts-Vektor-System in einem Glucose-Mineral-salz-Medium nach anfänglich unlimitiertem Wachstum unter Mangelbedingungen obiger Kennzeichnung mit einer spezifischen Wachstumsrate im Bereich $0,08 \mu_{max} < \mu < 0,5 \mu_{max}$ fermentiert.

13. Verfahren gemäß Anspruch 4, 6 und 12, **gekennzeichnet dadurch**, daß man das Wirts-Vektor-System *E. coli* TG 1 (pDR720cap) in einem Glucose-Mineralsalz-Medium nach anfänglich unlimitiertem Wachstum mit $\mu_{\max} = 0,41 \text{ h}^{-1}$ unter Zudosierung von Glucose mit einer spezifischen Wachstumsrate im Bereich $0,03 \text{ h}^{-1} < \mu < 0,21 \text{ h}^{-1}$ fermentiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 5, 6 und 12, **gekennzeichnet dadurch**, daß man das Wirts-Vektor-System *E. coli* TG 1 (pHRW500cap) in einem Glucose-Mineralsalz-Medium nach anfänglich unlimitiertem Wachstum mit $\mu_{\max} = 0,41 \text{ h}^{-1}$ unter Zudosierung von Glucose mit einer spezifischen Wachstumsrate im Bereich $0,03 \text{ h}^{-1} < \mu < 0,21 \text{ h}^{-1}$ fermentiert.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein gentechnisch-mikrobiologisches Verfahren zu effektiveren Herstellung homologer und/oder heterologer DNS-Produkte (Proteine) in *Escherichia coli*, wobei die Gene für die zu exprimierenden Proteine jeweils mittels Plasmidvektoren in die einbezogenen Produzentenstämme eingebracht werden.

Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt somit in jenen Industriezweigen einer Volkswirtschaft, welche einen Biotechnologie-Sektore aufweisen, in dem auch gentechnisch modifizierte *E. coli*-Produzentenstämme genutzt werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

In *E. coli*-Wirts-Vektor-Systemen zur Expression sowohl von homologen als auch von heterologen Genen finden zahlreiche *E. coli*-Promotoren Verwendung, zu denen unter anderem gehören

- der Tryptophanpromotor (trpPO),
- der Tryptophanpromotor mit Leader-Region (trpPOL),
- der Lactosepromotor UV5 (lacUV5),
- der Rekombinationspromotor recA,
- der Tetracyclinpromotor (tet),
- der Arabinosepromotor für die Gene B, A und D (araBAD),
- ein Promotor für rRNS-Synthese (rrnAP₂) sowie
- der β -Lactamasepromotor (bla)

(s. a. M. HIRANO, K. SHIGESADA u. M. IMAI [1987], *Gene*, 57, 89-99).

In diesen Konstruktionen erwies sich der Promotor trpPO als derjenige mit der höchsten Promotorstärke; in dieser Hinsicht übertraf trpPO sogar die aus dem *E. coli*-Lambda-Phagen genom isolierten Promotoren Lambda-P_L und Lambda-P_R.

Mit dem Ziel, in *E. coli*-Systemen noch weiter erhöhte Expressionsleistungen zu erreichen, wurden inzwischen durch Austausch der -35-Region und der -10-Region von natürlichen *E. coli*-Promotoren weiterhin zahlreiche Hybridvektoren hergestellt (s. a. RUSSELL, D. R. und BENNETT, G. N. [1982], *Gene*, 20, 231-243). Aus dem systematischen Vergleich der Promotorstärken solcher Hybridkonstrukte mit denen ausgewählter natürlicher Promotoren ergab sich folgende Relation:

trp::lac > trpPO > trp::tet > lacUV5 > tet::lac
> tet > lac::tet(up) > tet::trp > lac::trp = lac::tet,

wobei zwischen den Promotoren trp::lac und trpPO auch nur ein unwesentlicher Niveauunterschied hinsichtlich der Promotorstärke vorhanden ist.

Mit anderen Worten: Nach wie vor erweist sich in *E. coli* der Promotor trpPO als solcher mit starker Expressionsleistung. Somit verwundert es nicht, daß im vergangenen Jahrzehnt

- dieser Promotor in sehr vielen Fällen mit homologen bzw. heterologen Genen zur Kombination trpPO-rDNS gekoppelt,
- diese Kombination trpPO-rDNS in Plasmidvektoren eingebaut und
- nach deren Transformation in *Escherichia coli* die Expression zur Herstellung der rekombinanten DNS-Produkte vorgenommen

worden ist (siehe hierzu u. a. DD-WP 250335; WINNACKER, E. L. [1985]: *Gene und Klone*, VCH Weinheim; BUELL, G. & PANAYOTATOS, N. [1986], in: *Maximizing Gene Expression* [Eds: REZNIKOFF, W. & GOLD, L.], Butterworth; OLD, R. W. & PRIMROSE, S. B. [1986], in: *Principles of Gene Manipulation*, Blackwell Sci. Publ.; GASSEN, H. G. et al [1988]: *Gentechnik*, Fischer-Stuttgart). Hierbei erfolgte die Fermentation der transformierten *E. coli*-Zellen üblicherweise in diskontinuierlicher Kultur (batch-Verfahren; s. a. Patentschriften DD 159435, DD 2203J5, DD 240392, DE 3445517 und EP 170204).

Weiterhin ist aus der *E. coli*-Physiologie bekannt (PASTAN, I. & ADHYA, S. [1976], *Bacteriol. Rev.*, 40, 527-551; ULLMANN, A. & DANCHIN, A. [1983], *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, 15, 1-53), daß unter Bedingungen von Glucosemangel cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) gebildet wird, welches mit dem Katabolit-Aktivator-Protein (CAP) in Wechselwirkung tritt. Der hierbei entstehende cAMP-CAP-Komplex bindet an die in der *E. coli*-DNS in der Umgebung von Promotoren z. B. des Kohlehydrat- oder Zucker-Stoffwechsels vorhandene(n) sog. cap-Region(en) und stimuliert jeweils die Transkription (vgl. NEIDHARDT, F. C., Editor in Chief, [1987]: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Amer. Soc. for Microbiology, Washington D. C.). Allerdings stellt sich diese Stimulationswirkung nur bei schwachen Promotoren der *E. coli*-DNS wie u. a. bei araBAD und lacPO, ein. Starke *E. coli*-Promotoren, z. B. ribosomale Promotoren oder der Promotor trpPO, weisen keine cap-Sequenzen auf.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, in ausgewählten *Escherichia coli*-Wirts-Vektor-Systemen bei der Expression von vorwiegend heterologen rekombinanten Genen wesentliche Leistungssteigerungen zu erreichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein gentechnisch-mikrobielles Verfahren zu beschreiben, mit dem in ausgewählten *E. coli*-Wirts-Vektor-Systemen eine wesentliche Erhöhung der Expression von vorwiegend rekombinanten Genen erzielt werden kann.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe in ihrem Grundzug wie folgt gelöst:

Eingebettet in ein gentechnisch-mikrobiologisches Verfahren mit seinen an sich bekannten Teilschritten wie

- Konstruktion von rekombinanten Stammmaterial (einschließlich Konservierung),
- Kultivierung solchen Stammaterials (biologische Prozeßstufe),
- Produktaufarbeitung (hier aus der Biomasse) einschließlich eventueller Reindarstellung)

werden Zellen des jeweils herangezogenen *E. coli*-Stammes mit einem solchen neuen rekombinanten Expressionsplasmid transformiert, in welchem das Strukturgen des zu synthetisierenden Proteins der Kontrolle einer aus dem *E. coli*-Tryptophan-Promotor sowie einer vorgeschalteten sogenannten *E. coli*-cap-Sequenz aufgebauten Expressionseinheit (Kurzwort: cap-trpPO-EE) unterworfen ist (Schritt 1). Die auf diese Weise erhaltenen transformierten *E. coli*-Zellen werden anschließend unter Glucosemangelbedingungen fermentiert (Schritt 2).

In seiner weiteren Ausgestaltung ist das vorliegende Verfahren nun zusätzlich dadurch gekennzeichnet, daß in seinem Schritt 1 jeweils ein rekombinantes *E. coli*-Expressionsplasmid des oben skizzierten Grundaufbaus verwendet wird, welches in seiner captrpPO-EE stromauf vom Tryptophan-Promotor (Kurzwort: trpPO) die cap-Sequenz des *E. coli*-Lactosepromotors (Kurzwort: cap(lacPO), d.h. die DNS-Teilsequenz

5'-TAATGTGAGTTAGCTCACTCA-3',

enthält. Vorzugsweise wird in diesem Teilschritt ein solches rekombinantes *E. coli*-Expressionsplasmid vom voranstehend skizzierten Grundaufbau verwendet, in welchem die obige cap(lacPO)-Sequenz ausschließlich in einem Abstand von 15 Nucleotiden stromauf der -35-Region des trpPO angeordnet ist (Kurzwort für diese spezifische Anordnung: cap(lacPO)-trpPO-EE). Nach der Maßgabe dieser Vorschrift sind unter anderem mit einem gentechnologischen Handling, welches jeweils an sich bekannte Operationen wie Isolierung sowie Reinigung von DNS-Fragmenten, Ligation von DNS-Fragmenten, Plasmid-Isolierung usw. bis hin zur Sequenzierung der jeweils veränderten Vektor-Region umfaßt, die neuen Expressionsplasmide pDR720cap, welches das *E. coli*-Galaktokinase-Gen (Kurzwort: galk-Gen) unter der Kontrolle der voranstehend als Vorzugsvariante gekennzeichneten cap(lacPO)-trpPO-EE enthält,

und

pHRW500cap, welches die Sequenz für natives humanes Interferon alpha 1 unter der Kontrolle der cap(lacPO)-trpPO-EE enthält, konstruiert worden (s. a. Abb. 1).

Mit diesen neuen Expressionsplasmiden wird dann in an sich bekannter Weise jeweils eine Population des Wirtsstammes *E. coli* TG 1 transformiert. Auf diese Weise wurden die neuen Wirts-Vektor-Systeme

E. coli TG 1 (pDR720cap) und
E. coli TG 1 (pHRW500cap)

erhalten; diese sind im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung in der Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen der DDR, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW, Beutenbergstraße 11, Jena, 6900 unter den Registrierzeichen

IMET 11421 für *E. coli* (pDR720cap) und
IMET 11419 für *E. coli* (pHRW500cap)

deponiert worden. (Bei gleicher Gelegenheit sind der genannten Stelle auch biologisch reine Proben von *E. coli* TG 1-Populationen, die mit den Ausgangsplasmiden pDR720 bzw. pHRW500 transformiert worden waren, hinterlegt worden; diese Stämme, die im vorliegenden Verfahren zu Vergleichszwecken benötigt werden, erhielten die Registrierzeichen

IMET 11420 für *E. coli* TG 1 (pDR720) und
IMET 11418 für *E. coli* TG 1 (pHRW500).

In der weiteren Verfahrensausgestaltung werden die beiden genannten *E. coli*-Wirts-Vektor-Systeme in einem Glucose-Mineral Salz-Medium unter Glucose-Mangelbedingungen fermentiert. Besonders vorteilhaft wird in diesem Schritt jenes Glucose-Mineral Salz-Medium mit den Komponenten

Kaliumdihydrogenphosphat,	Diammoniumhydrogenphosphat,
Zitronensäure,	Antaphron NM 40,
Magnesiumsulfat,	
Thiamin,	Ampicillin,
Glucose sowie	Spurenelementelösung,

eingesetzt, welches in Verbindung mit der Patentanmeldung zu einer früheren erfinderischen Lösung aus dem Zentralinstitut offenbart worden ist. (Die Spurenelementlösung enthält Kobalddichlorid, Manganchlorid, Kupferchlorid, Borsäure, Natriummolybdat, Eisenziträt und Zinkacetat).

Ein anderes Glucose-Mineralsalz-Medium bestand aus den Komponenten:

Kaliumhydrogenphosphat,	Dinatriumhydrogenphosphat,
Natriumchlorid,	Ammoniumchlorid,
Natriumsulfat,	Magnesiumchlorid,
Eisenchlorid,	Manganchlorid,
Thiamin,	Ampicillin,
Glucose.	

Die Fermentation jedes der o. g. E. coli-Wirts-Vektor-Systeme wird unter Glucose-Mangelbedingungen in einem Medium dieser Kennzeichnung hierbei sowohl in kontinuierlicher Kultur als auch in der fed-batch-Kultur durchgeführt. Erstere wird vorteilhaft in einer Chemostaten-Anordnung realisiert, in der die Verdünnungsrate D (in h^{-1}) als primärer Kontrollparameter der Relation $0 < D < D_c$, vorzugsweise der Relation $0,08 D_c < D < 0,5 D_c$, folgt (D_c – sog. kritische Verdünnungsrate einer Chemostaten-Kultur, definiert gemäß W. CRUEGER, W. & CRUEGER, A., Biotechnologie – Lehrbuch d. angew. Mikrobiologie, München – Wien, 1989). Für die verfahrensgemäß bereitgestellten Wirts-Vektor-Systeme E. coli TG 1 (pDR720cap) und E. coli TG 1 (pHRW500cap) ergibt sich eine solche Relation von Rate D zu Rate D_c , daß sich der voranstehend offenbarte Bereich zu

$$0,03 h^{-1} < D < 0,16 h^{-1}$$

konkretisiert ($D_c = 0,32 h^{-1}$). Unter Einhaltung dieser Vorschrift wird somit in einem Medium obiger Kennzeichnung mit Glucose als limitierender Kohlenstoffquelle die Chemostaten-Kultivierung durchgeführt.

Eine fed-batch-Kultivierung der genannten E. coli-Wirts-Vektor-Systeme wird in einem Nährmedium obiger Kennzeichnung nach anfänglich unlimitiertem Wachstum (d. h. bei einem Wachstum mit der spezifischen Wachstumsrate $\mu = \mu_{max}$) unter Glucose-Mangelbedingungen in solchen Regimes weitergeführt, in denen die spezifische Wachstumsrate μ (in h^{-1}) als primärer Kontrollparameter der Relation $0 < \mu < \mu_{max}$, vorzugsweise der Relation

$$0,08 \mu_{max} < \mu < 0,5 \mu_{max}$$

folgt (μ_{max} – sog. maximale spezifische Wachstumsrate einer fed-batch-Kultur, definiert gemäß STANBURY, P. F. & WHITAKER, A. (1984), Pergamon Press). Hierbei wird jeweils mit der anfänglich in das Nährmedium eingebrachten Glucose-Menge determiniert, wie lange der durch unlimitiertes Wachstum charakterisierte Startabschnitt in den einzelnen Fermentationsläufen beibehalten wird.

Für die vorliegenden Wirts-Vektor-Systeme TG 1 (pDR720cap) und TG 1 (pHRW500cap) nimmt die maximale spezifische Wachstumsrate im o. g. Glucose-Mineralsalz-Medium den Wert $\mu_{max} = 0,41 h^{-1}$ an. Damit konkretisiert sich die Vorschrift für die Auswahl der spezifischen Wachstumsrate zu

$$0,03 h^{-1} < \mu < 0,21 h^{-1},$$

und der in den einzelnen konkreten Varianten dieser Verfahrensmodifikation jeweils einzustellende μ -Wert aus dieser Relation wird hierbei stets mit Hilfe des bei der Glucose-Zudosierung gewählte Regime realisiert.

Die vorgeschlagene Verfahrenserfindung wurde am Beispiel der in der weiteren Ausgestaltung dieser technischen Lösung verfügbar gewordenen neuen E. coli-Stämme TG 1 (pDR720cap) und TG 1 (pHRW500cap) umfassend erprobt, wobei beide Grundmodifikationen der biologischen Prozeßstufe – hier Glucose-limitierte Chemostaten-Kultivierung, dort fed-batch-Kultivierung mit Glucose-Dosierung – eingezogen worden sind.

Anhand der spezifischen Galaktokinase-Aktivität des cap-modifizierten Stammes E. coli TG 1 (pDR720cap) wird in Abb. 2 hierbei die Steigerung in der Expressionsleistung in Relation zum Vergleichsstamm. E. coli TG 1 (pDR720) für den Fall einer Glucose-limitierten Chemostaten-Kultur ausgewiesen.

Ein entsprechender Beleg für die gesteigerte Human-Interferonalpha 1-Bildung von Stamm E. coli TG 1 (pHRW500cap) im Vergleich zu Stamm E. coli TG 1 (pHRW500) wurde in Abb. 3 (für den Fall der Glucose-limitierten Chemostaten-Kultur) sowie in Abb. 4 (für den Fall einer fed-batch-Kultivierung mit Glucose-Dosierung) geführt. Wie diesen Abbildungen zu entnehmen ist, kann mit dem beschriebenen Verfahren eine Erhöhung in der Expression um mehr als 100% erreicht werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Vergleichende Kultivierung des Ausgangsstammes E. coli TG 1 (pDR720) und des cap-modifizierten Stammes E. coli TG 1 (pDR720cap) im Glucose-limitierten Chemostaten

Abschwemmungen von Schrägagarkulturen von Stamm TG 1 (pDR720cap) und Stamm TG 1 (pDR720) dienten zur Beimpfung von 100 ml Glucose-Mineralsalz-Medium mit Zusatz von Thiamin ($1 \mu g \cdot ml^{-1}$) und Ampicillin ($100 \mu g \cdot ml^{-1}$) in 500 ml-Rundkolben, die bei 28°C auf einem Schütteltisch geschüttelt werden. Derartige Vorkulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase zur Hauptkultivierung in den Chemostaten übertragen. Nach Abfüllen mit gleicher Nährlösung auf das Arbeitsvolumen V (ml) der Chemostaten von 180 ml und Erreichen einer Extinktion der wachsenden Kulturlösungen von $E^{1cm}_{470nm} = 1,9 - 2,1$ Skt begann die Zudosierung von gleicher Nährlösung. Diese Glucose-limitierte Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

KH_2PO_4 :	2,72 g · l ⁻¹
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$:	3,55 g · l ⁻¹
NaCl :	4,67 g · l ⁻¹
NH_4Cl :	0,535 g · l ⁻¹
Na_2SO_4 :	1,065 g · l ⁻¹
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$:	40,6 mg · l ⁻¹
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$:	5,4 mg · l ⁻¹
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$:	3,96 mg · l ⁻¹
Thiamin:	1,0 mg · l ⁻¹
Ampicillin:	0,1 g · l ⁻¹
Glucose:	0,8 g · l ⁻¹

Durch Einstellung der Zuflußrate F (ml · h⁻¹) konnte die Verdünnungsrate $D = F \cdot V^{-1}$ (h⁻¹) determiniert werden (BERGTER, F., 1972). Wachstum von Mikroorganismen. Experimente und Modelle, VEB Gustav Fischer Verlag Jena). Nach 6 bis 10 Volumenwechsel der Kulturlösung wurden die Kulturen zur Bestimmung der Aktivität der Galaktokinase und zur Messung der Extinktion gewonnen. Zur Ermittlung der Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Galaktokinase von der Verdünnungsrate D wurde für jedes „D“ ein neuer Zyklus (Schrägagarkultur, Vorkultur im Rundkolben, Hauptkultur im Chemostaten für 8 bis 10 Volumenwechsel) durchlaufen.

Der Bestimmung der spezifischen Aktivität der Galaktokinase lag die von McKENNEY und Mitarbeiter beschriebene Methode zugrunde (McKENNEY, K., SHIMATAKEW, H., COURT, D., SCHMEISSNER, U., BRADY, C. und ROSENBERGER, M., 1981), In: Gene Amplification and analysis. Vol. 2. (Editors J. G. Chirikjian and T. S. Papas), Elsevier/North Holland).

Aus Abb. 2 ist deutlich ersichtlich, daß im Bereich $0,03\text{h}^{-1} < D < 0,32\text{h}^{-1}$ die spezifische Galaktokinaseaktivität des cap-modifizierten Wirts-Vektor-Systems TG 1 (pDR720cap) größer ist als die des nicht-modifizierten Ausgangssystems TG 1 (pDR720). Besonders ausgeprägt ist die höhere spezifische Galaktokinase-Aktivität von TG 1 (pDR720cap) gegenüber TG 1 (pDR720) bei kleinen Verdünnungsraten $D < 0,15\text{h}^{-1}$.

Beispiel 2

Kultivierung des Ausgangsstammes *E. coli* TG 1 (pHRW500) und des cap-modifizierten Stammes *E. coli* TG 1 (pHRW500cap) im Glucose-limitierten Chemostaten

Die Anzucht und Kultivierung der Stämme wurde vorgenommen wie in Beispiel 1. Die Bestimmung von Interferon erfolgte nach einem Ultraschallaufschluß der Zellen entsprechend einem üblichen ELISA-Test.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt. Im gesamten Bereich der untersuchten Verdünnungsraten $0 < D < 0,32\text{h}^{-1}$ ist die spezifische Interferonkonzentration in *E. coli* TG 1 (pHRW500cap) größer als die in *E. coli* TG 1 (pHRW500), wobei wie in Beispiel 1 mit abnehmender Verdünnungsrate die spezifische IFN-Konzentration ansteigt. Der Anstieg ist besonders drastisch im Bereich kleiner Verdünnungsraten für $D < 0,12\text{h}^{-1}$.

Beispiel 3

Fed-batch-Kultivierung des Ausgangsstammes *E. coli* TG 1 (pHRW500) und des cap-modifizierten Stammes *E. coli* TG 1 (pHRW500cap)

Die Fermentation erfolgte in einem Rührkesselfermentor mit Belüftung unter Verwendung von 15l eines definierten Mediums mit Glucose als Kohlenstoffquelle zu Kultivierungsbeginn. Das zu beimpfende Medium hatte folgende Zusammensetzung: KH_2PO_4 (7,61 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (2,33 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,2 g/l), Zitronensäure (1,61 g/l), Eisenziträt (36,5 mg/l), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,67 mg/l), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (16 mg/l), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,51 mg/l), H_3BO_3 (3,33 mg/l), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,67 mg/l), $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8,4 mg/l), Thiamin (2,67 mg/l), EDTA (4,96 mg/l), Antaphron NM 40 (0,33 ml/l), Ampicillin (100 mg/l) und Glucose (25 g/l).

Nach Beimpfung wurden die Zellen bei 28°C, einem pH-Wert von 6,9, einer Belüftungsrate von 1 vvm und einem Druck von 70 kPa kultiviert. Zur Konstanthaltung des pH diente die automatisch kontrollierte Dosierung von 25% v/v – NH_3 . Der pO_2 -Wert wurde nach dem Absinken von 100% des Sättigungswertes auf den Regelwert von 20% konstant gehalten. Die Kulturen wuchsen nach einer sehr kurzen lag-Phase exponentiell mit in dem vorgelegten Medium maximal möglicher spezifischer Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,415\text{h}^{-1}$ im Falle von TG 1 (pHRW500) und $0,411\text{h}^{-1}$ im Falle von TG 1 (pHRW500cap) (s. Abb. 4) bis zum Verbrauch der zu Anfang eingebrachten Glucose. Nach vollständigem Glucoseverbrauch wurde die Zufütterung von Glucose in der Weise vorgenommen, daß die Kulturen nur noch mit verringerter spezifischer Wachstumsrate wachsen konnten. Die durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten in der Glucose-Feedingphase betrugen für TG 1 (pHRW500) $0,114\text{h}^{-1}$ und für TG 1 (pHRW500cap) $0,119\text{h}^{-1}$. Beide Kulturen waren somit aufgrund des nicht signifikant verschiedenen μ vergleichbar.

Aus Abb. 4 ist trotz Schwankungen der Meßdaten deutlich ersichtlich, daß die spezifischen Interferonmengen von beiden Stämmen bei Wachstum mit $\mu_{\max}$ einander entsprechen. Dagegen konnte bei Glucose-limitiertem Wachstum in der Dosierungsphase eine wesentlich höhere spezifische Interferonmenge in dem cap-modifizierten Stamm TG 1 (pHRW500cap) als in dem Ausgangsstamm TG 1 (pHRW500) festgestellt werden.

Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1: Darstellung der Plasmidpaare pDR720 und pDR720cap bzw. pHRW500 und pHRW500cap.

Abb. 2: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Galaktokinase von der Verdünnungsrate D bei *E. coli* TG 1 (pDR720) und *E. coli* TG 1 (pDR720cap) in Glucose-limitierten Chemostaten-Kulturen.

Abb. 3: Abhängigkeit der spezifischen Humaninterferon-alpha 1-Aktivität von der Verdünnungsrate D bei *E. coli* TG 1 (pHRW500) und *E. coli* TG 1 (pHRW500cap) in Glucose-limitierten Chemostaten-Kulturen.

Abb.4: Kinetiken von Wachstum und Interferonbildung von E. coli TG 1 (pHRW500) (4A) und von E. coli TG 1 (pHRW400cap) (4B) bei fed-batch-Kultivierung mit Glucose-Dosierung.

Es bedeuten: X = Biotrockenmassekonzentration in $g \cdot l^{-1}$
 IFN = spezifische Konzentration von Human-
Interferon-alpha 1 in $IE \cdot g^{-1}$
 μ = spezifische Wachstumsrate in h^{-1}

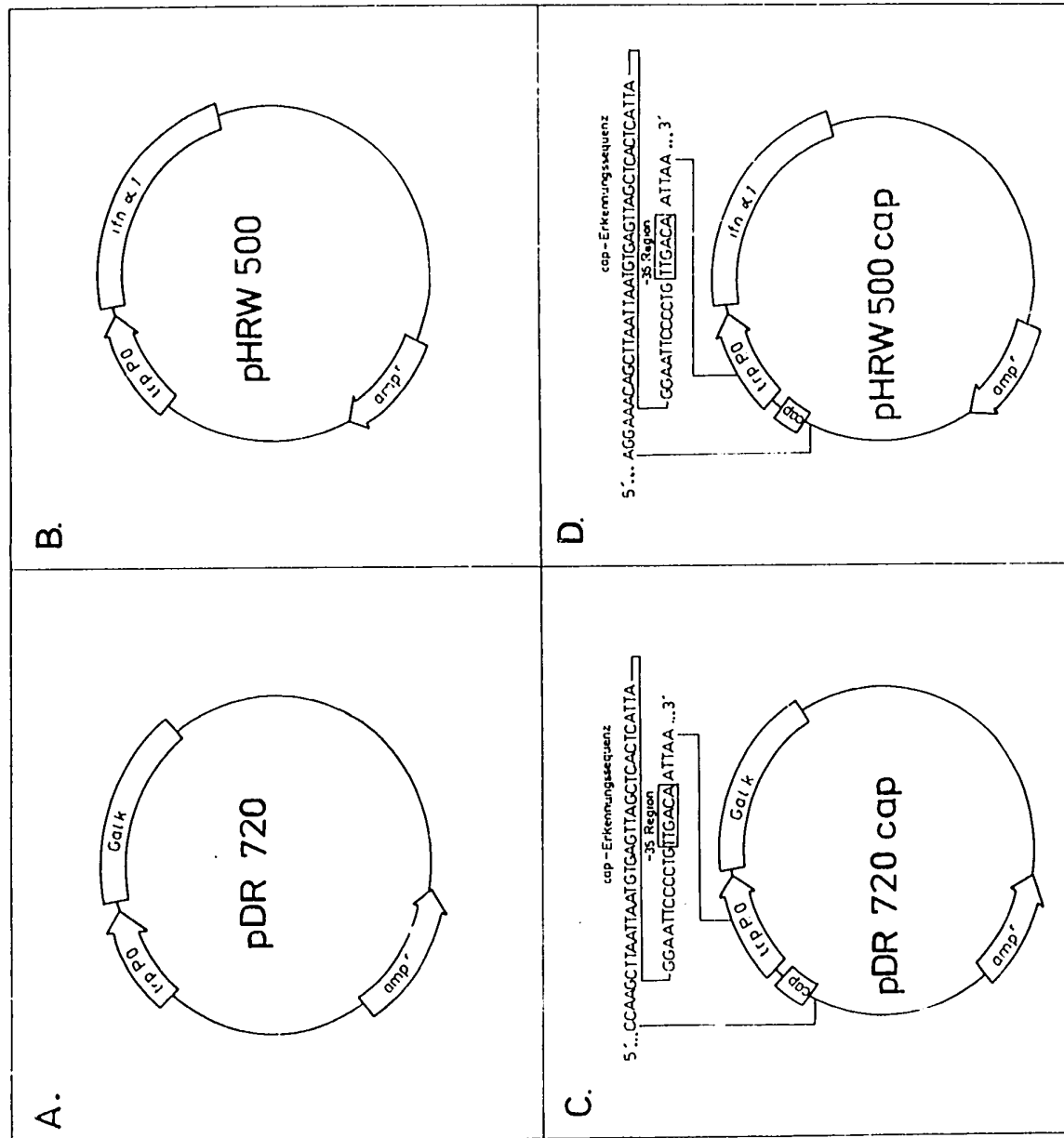


Abb. 2

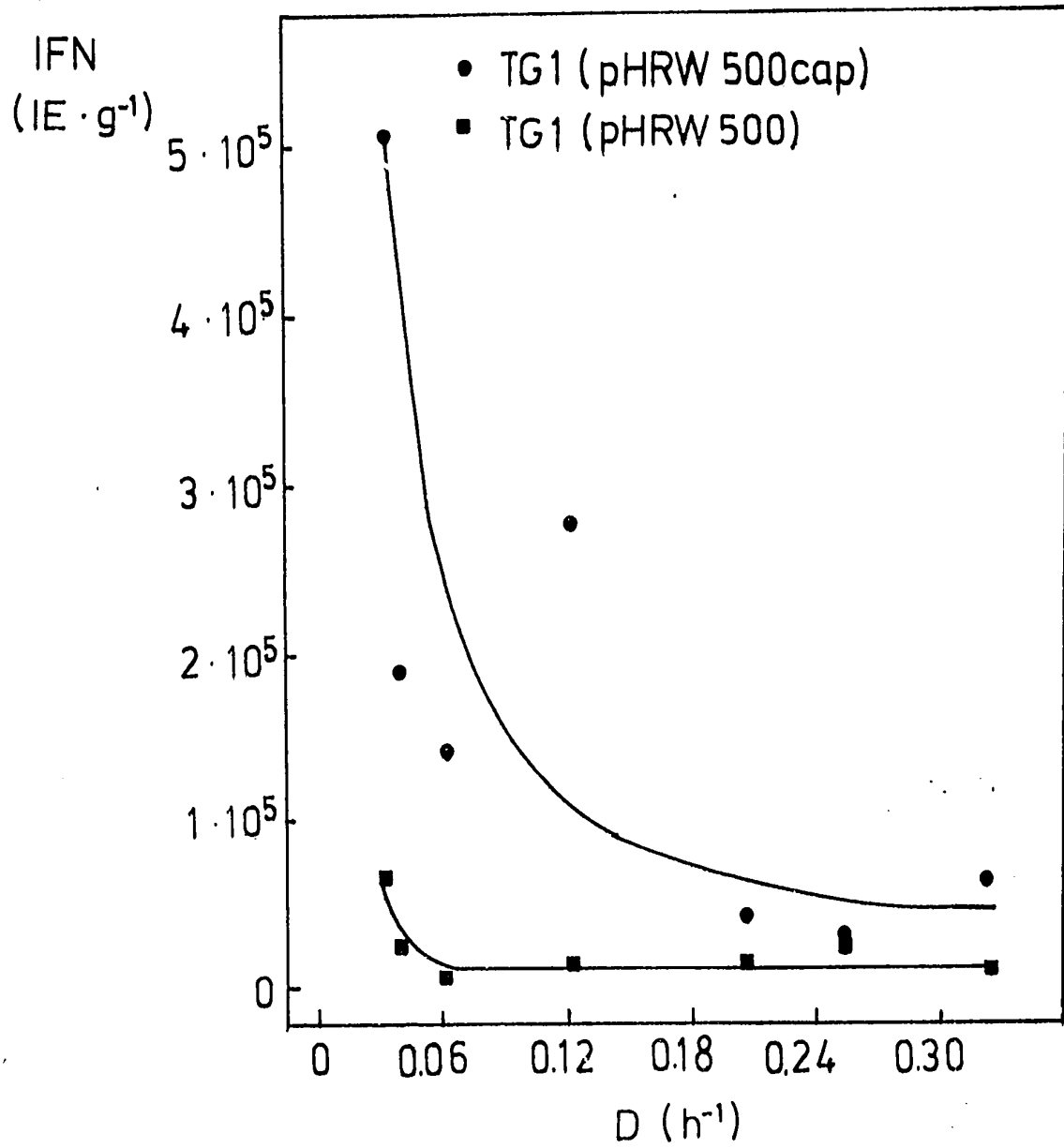


Abb. 5

