

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

# PATENTCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 290 215 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983

5(51) C 12 P 21/02

in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21) DD C 12 P / 318 370 5 (22) 28.07.88 (44) 23.05.91

---

- (71) Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE  
(72) Riesenberg, Dieter, Dr. sc. nat.; Menzel, Klaus-Dieter; Schulz, Volkmar, Dr. rer. nat.; Günther, Jutta; Gira, Georg, Dr.-Ing.; Knorre, Wolfgang A., Doz. Prof. Dr. sc., DE  
(73) Akademie der Wissenschaften, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie; Beutenbergstraße 11, O - 6900 Jena, DE  
(74) siehe (73)
- 

(54) Verfahren zur Herstellung von Interferonen in *Escherichia coli*

---

(55) Fermentationsverfahren; Interferone; *Escherichia coli*; rekombinante *Escherichia coli*-Stämme; Raum-Zeit-Ausbeute; spezielles Glukose-Minimalmedium; Konversionsgrad; Impfmateriale-Konserven; spezifische Wachstumsrate; Profil der spezifischen Wachstumsrate; Vektorstabilität

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Interferonen in rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen. Ziel der Erfindung ist es, Interferone mit erhöhter Effektivität in *Escherichia coli* herzustellen. Zur Lösung der dieser Zielstellung zugeordneten Aufgabe wird ein Fermentationsverfahren beschrieben, das unter Einsatz eines speziellen Glukose-Minimalmediums folgende Verfahrensschritte beinhaltet:

- Verwendung von Impfmateriale-Konserven mit hohem Lebendtitel sowie hoher Vektorstabilität und
- gezielte Fermentation mit charakteristischem Profil der spezifischen Wachstumsrate.

ISSN 0433-6461

10 Seiten

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Herstellung von Interferonen in *Escherichia coli* durch submerse aerobe Fermentation in flüssigen Nährmedien, die eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Mineralsalze enthalten, **gekennzeichnet dadurch**, daß Impfmateriale-Konserven mit hohem Lebendtitel und hoher Vektorstabilität zur direkten Beimpfung eines Glukose-Minimalmediums im Produktionsfermentor verwendet werden und die Kultivierung nach folgendem Fermentationsregime erfolgt:
 

**Phase I:**  
Kurze Adaptation der *E. coli*-Zellen aus den aufgetauten Impfmateriale-Konserven an die vortemperierte Fermentationslösung mit Zunahme der spezifischen Wachstumsrate (Kurzzeichen  $\mu$ ) bis zum Erreichen von  $\mu_{\max}$ ,

**Phase II:**  
Wachstum mit  $\mu_{\max}$  bei Abnahme des  $pO_2$ -Wertes bis zum Erreichen eines Vorzugswertes,

**Phase III:**  
Fortsetzung des Wachstums mit  $\mu = \mu_{\max}$  bis zum Verbrauch der zu Fermentationsbeginn vorgelegten Glukosemenge, bei Aufrechterhaltung des  $pO_2$ -Wertes,

**Phase IV:**  
Beginn der im weiteren Fermentationsverlauf aufrechtzuerhaltenden Glukosedosierung bei permanenter Glukoselimitation in der Fermentationslösung mit schneller Absenkung der spezifischen Wachstumsrate von  $\mu_{\max}$  auf eine für die erhöhte Interferonbildung spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\text{prod}}$ ,

**Phase V:**  
Aufrechterhaltung des Wachstums bei der spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\text{prod}}$  durch Fortführung der geregelten Glukosездosierung und

**Phase VI:**  
Abbruch der Fermentation bei Abnahme der spezifischen Wachstumsrate auf Werte kleiner  $\mu_{\text{prod}}$ .
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß Glukose zu Fermentationsbeginn mit einer Konzentration im Bereich zwischen  $5\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $60\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , vorzugsweise  $25\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , vorgelegt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Glukose-Minimalmedium qualitativ aus folgenden Komponenten besteht: Glukose, Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Diammoniumhydrogenphosphat ( $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ ), Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), Zitronensäure, Eisenzitrat, Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), Natriummolybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Zinkacetat [ $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ], Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Antischaummittel, vorzugsweise Antaphron NM40, Markersubstanzen in Abhängigkeit von den Auxotropien der Wirtszellen sowie Selektionsdruckmarker in Abhängigkeit vom eingesetzten Vektor.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß für Kultivierungen bis zu hohen Biotrockenmassekonzentrationen von  $70\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  das Glukose-Minimalmedium sich quantitativ folgendermaßen zusammensetzt:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $7,8\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ( $2,3\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $2,2\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Zitronensäure ( $> 1,0\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Eisenzitrat ( $36\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $2,7\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $16\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $1,5\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $3,3\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $2,7\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $8,4\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), EDTA ( $5\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) und Antaphron NM40 ( $0,33\text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ).
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß für Kultivierungen bis zu Biotrockenmassekonzentrationen von weniger als  $70\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  die einzelnen Komponenten des Glukose-Minimalmediums in entsprechend prozentual geringeren Konzentrationen bereitzustellen sind.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Impfmateriale-Konserven ein rHu-IFN-exprimierender Stamm der Spezies *E. coli* verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Impfmateriale-Konserven das Wirts-Vektor-System *E. coli* SK 1590/kHRW 400 verwendet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Wirts-Vektor-System *E. coli* TG 1/pBB210 verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Wirts-Vektor-System *E. coli* TG 1/pBB225 verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine Impfmateriale-Konserve, die durch einen hohen Lebendtitel, eine hohe Vektorstabilität und einen fixierten Zustand „exponentielles Wachstum“ charakterisiert ist, verwendet wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Beimpfung des Glukose-Minimalmediums mit einer speziellen Impfmateriale-Konserve direkt erfolgt und der Impffaktor im Bereich von 0,0005 bis 0,1, vorzugsweise bei 0,05, liegt.
12. Verfahren nach Anspruch 1 bis 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß der pH-Wert im Bereich von pH6,5 bis pH7,5, vorzugsweise pH6,9, durch Zudosierung der Stickstoffquelle in Form von konzentrierter Ammoniumhydroxidlösung aufrechterhalten wird.
13. Verfahren nach Anspruch 1 bis 12, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Phase I einer Dauer von 1 Stunde bis 4 Stunden aufweist.
14. Verfahren nach Anspruch 1 bis 12, **gekennzeichnet dadurch**, daß in den Phasen II bis VI die Kultivierung bei einem  $pO_2$ -Wert = 10% bis 40%, vorzugsweise 20%, durchgeführt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 1 bis 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Dauer der Phase II 0,5 Stunden bis 12 Stunden, vorzugsweise 8 Stunden, beträgt.
16. Verfahren nach Anspruch 1 bis 15, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Dauer der Phase III 0,5 Stunden bis 4 Stunden, vorzugsweise 2,5 Stunden, beträgt.
17. Verfahren nach Anspruch 1 bis 16, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Dauer der Phase IV 0,2 Stunden bis 5 Stunden, vorzugsweise 2 Stunden, beträgt.
18. Verfahren nach Anspruch 1 bis 17, **gekennzeichnet dadurch**, daß in der Phase V die Kultivierung bei einer spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{prod}$  im Bereich von  $0,05 h^{-1} < \mu_{prod} < 0,25 h^{-1}$ , vorzugsweise bei  $0,15 h^{-1}$ , durchgeführt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 1 bis 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kultivierung in der Phase VI abgebrochen wird, sobald  $\mu_{prod}$  eine kritische spezifische Wachstumsrate  $\mu_{krit}$  unterschreitet, wobei diese aus dem Bereich  $0,01 h^{-1} < \mu_{krit} < 0,01 h^{-1}$  ausgewählt wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kultivierung in der Phase VI abgebrochen wird, sobald  $\mu_{prod}$  die kritische Wachstumsrate  $\mu_{krit} = 0,05 h^{-1}$  unterschreitet.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

#### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Interferonen in rekombinanten Escherichia coli-Stämmen; sie ist anwendbar in der mikrobiologischen und pharmazeutischen Industrie.

#### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technik ist es bekanntermaßen gelungen, Gene, die für Interferone codieren, in Vektoren einzubauen und nach deren Übertragung in Escherichia coli zur Expression zu bringen (Pestka et. al, 1985, In: Mediators in Cell Growth and Differentiation, Herausgeber: R. J. Ford und A. L. Maizel, S. 261-281, Raven Press, New York). In den meisten Fällen werden dereprimierbare bzw. induktive Expressionssysteme zur Interferonbildung verwendet. Dies bedeutet, daß dem Interferongen eine Expressionskontrolleinheit vorgelagert ist, die während des normalen Bakterienwachstums zunächst keine Interferonbildung zuläßt. Erst nachdem die Bakterien eine gewünschte Zelldichte erreicht haben, wird durch eine exogene Manipulation die Interferonbildung initiiert. Wenn es sich um eine Expressionskontrolleinheit aus der Gruppe des Tryptophan-Promotor-Operator-Systems (trp P,O-System) handelt, kann die Initiierung durch Zusatz von  $\beta$ -Indolylacrylsäure (IAA) zum Kulturmedium oder durch Erzeugung einer Tryptophanlimitation realisiert werden (Goeddel et. al., Nature 287, 411; D. I. Johnson und R. L. Somerville, 1985, In: Developments in Industrial Microbiology, vol. 26, S. 87-94; Patentschriften DD 159782; DD 209477; DE 3247922 A 1; DD 159435; DD 202307; DE 3 125706 A 1; DE 3 103714 A 1; DE 3 144469 A 1; DE 3 138096; DE 3308030 A 1; DE 3238554 A 1; DE 3505060 A 1; SU 1 144376 A; SU 1 092176 A). Ist eine Expressionskontrolleinheit aus der Gruppe des Lactose-Promotor-Operator-Systems (lac P,O-System) dem Interferongen vorgelagert, so ist die Induktion der Interferonbildung durch Zusatz von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) möglich (Patentschriften DD 159782; DD 209477; DE 3 138096; DE 3240960 A 1; DE 3238554 A 1; DE 3414831 A 1; DE 3409966 A 1; DE 3428370 A 1; DE 3505060 A 1; DE 3603958 A 1). Auch bei Tandem-Expressionskontrolleinheiten, wie z. B. 5'-lac P,O-trp P,O-3', die z. B. in dem Plasmid pHRW400 vorliegt und dem für Human-Interferon-alpha 1 codierenden Gen vorgelagert ist, konnte nach Zusatz von IAA zum Kulturmedium Interferonaktivität in den E. coli-Zellen des Stammes SK 1590 (pHRW400) nachgewiesen werden.

In einigen Fällen wurde die Interferonbildung initiiert durch eine Temperaturerhöhung, nämlich bei Verwendung von Expressionskontrolleinheiten aus der Gruppe Hauptoperator- und Promotorregion des E. coli-Phagen lambda (Patentschriften DD 159782; DE 3428370 A 1; DE 3505060 A 1; DD 160280; EP 0099084 A 2; Fieschko und Ritch, 1986, Chem. Eng. Commun., vol. 45, S. 229-240). Während des Wachstums der E. coli-Zellen erfolgt keine Interferonbildung, da ein Repressor-Protein, ein

Repressor-Protein, ein Produkt des mutierten Phagen-Gens  $Cl_{857}$ , keine Transkription vom Promotor des Phagen lambda ermöglicht. Erst durch Temperaturerhöhung wird das temperatursensitive Repressor-Protein inaktiviert, so daß die Ablesung des Interferongens freigegeben wird. Diese Temperaturerhöhung wird üblicherweise dann vorgenommen, wenn die Bakterien sich am Ende der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Als eine weitere dereprimierbare Expressionskontrolleinheit zur kontrollierten Interferonbildung wurde der *recA*-Promotor für *E. coli* verwendet (Patentschrift DE 3226319 A 1). Der starke *recA*-*E. coli*-Promotor ist normalerweise vollständig reprimiert durch das Produkt des *lexA*-Gens. In Gegenwart geschädigter DNA wird dieses System dazu induziert, seinen eigenen Repressor zu spalten, und der Promotor wird aktiviert. Standardinduktoren für *recA* sind Nalidixinsäure oder Mitomycin (vgl. Patentschrift DE 3226319 A 1).

Allen o. g. initiierten Expressionssystemen zur Interferonbildung in *E. coli* ist gemeinsam, daß die Produktbildungsphase der eigentlichen Wachstumsphase nachgeschaltet ist. Diese Verfahren sind deshalb häufig mit dem Nachteil behaftet, daß die Dauer für die mögliche Interferonbildung nur kurz ist. Außerdem sind die Manipulationen zur Initiierung der Produktbildung aufwendig. Die Verwendung von Induktionssubstanzen wie IAA, IPTG, Nalidixonsäure ist, insbesondere unter large-scale-Bedingungen, ökonomisch uneffektiv.

Neben den oben genannten dereprimierbaren bzw. induzierbaren Expressionssystemen wurde auch ein konstitutives Expressionssystem zur konstitutiven Interferonbildung in *E. coli* vorgeschlagen. Als konstitutives Expressionssystem dient die Expressionseinheit des Staphylokinase-Gens des *Staphylococcus aureus*-Phagen 42D (Kurzbezeichnung: SAK-EE). Diese wurde z. B. mit dem Human-Interferon-alpha1-Gen gekoppelt und befindet sich u. a. in den Vektoren pBB 202 und pBB 210. In vielen *E. coli*-Stämmen, so auch *E. coli* TG 1, die mit diesen Vektoren transformiert wurden, konnte konstitutive Interferon-Expression nachgewiesen werden. Somit liegt bei Verwendung der SAK-EE eine wachstumsgekoppelte Interferonbildung vor. Obwohl Interferon über den gesamten Fermentationszeitraum gebildet werden kann, sind die Verfahren mit der pSAK-EE zur Interferongewinnung mit dem Nachteil behaftet, daß auf Grund der verwendeten Laborschüttelgefäße nur Kulturen mit geringen Zelldichten erhalten werden können. Dieser Nachteil trifft mit Ausnahme des Verfahrens von Fieschko und Ritch (s. a. die nachfolgende Darlegung) auch auf alle o. g. Verfahren mit initiierten Expressionskontrolleinheiten zu.

Der Nachteil aller Verfahren, mit denen nur geringe Biotrockenmassekonzentrationen  $X$  erreicht werden, wird offenkundig, wenn man die allgemeine Erkenntnis zugrunde legt, daß die Produktbildung (in unserem Fall die Interferonbildung) üblicherweise direkt proportional der Biotrockenmassekonzentration  $X$  und der spezifischen Produktbildungsrate ist (F. Bergter, 1972, Wachstum von Mikroorganismen – Experimente und Modelle, VEB Gustav Fischer Verlag Jena). Die spezifische Produktbildungsrate hängt ganz wesentlich von den o. g. Expressionskontrolleinheiten, die den Interferongen vorgelagert sind, bzw. von der Struktur der Promotorregion bei konstitutiven Expressionssystemen ab.

Fieschko und Ritch haben ein Verfahren zur Herstellung von Interferon in *E. coli* beschrieben, bei dem sowohl eine hohe Biotrockenmassekonzentration  $X$  (von bis zu 70 g Trockenmasse pro 1 Liter Kulturlösung als auch eine hohe spezifische Interferonbildungsrate mit einem durch Temperaturerhöhung initiierten Expressionskontrollsystem erhalten wurde. Es handelt sich um ein fed-batch-Verfahren, das im folgenden näher beschrieben wird:

Die dreitägige Gesamtfermentation besteht aus einer Vorkulturstufe (Übernachtkultur, d. h. ca. 12 Stunden Kultivierungsdauer) und der Hauptkulturstufe in einem regelungstechnisch hochinstrumentierten Fermentor (16L New Brunswick Scientific Microgen-Fermentor) mit einer Dauer von ca. 60 Stunden. Zur Vorkultivierung wird ein Komplexmedium in einem Schüttelkolben mit rekombinanten *E. coli*-Zellen beimpft und dann bei 30°C bebrütet. Die gesamte Vorkultur von 0,5 l wird zur Beimpfung von 8 l Nährlösung im Fermentor verwendet. Die benötigte Dauer für die Vorkultivierung zur Erzielung einer angemessenen Impfmenge für die Hauptkultivierung im Fermentor ist eine Ursache für die geringe Raum-Zeit-Ausbeute des Wachstums in diesem Verfahren.

In dem Verfahren nach Fieschko und Ritch wird als Nährlösung ein Glukosemineralsalzmedium, dem zusätzlich Hefeextrakt, Spurenelemente, Vitamine und Ampicillin als Selektionsdruckmarker beigegeben sind, eingesetzt. Dieses Nährmedium hat im einzelnen folgende Zusammensetzung: Glukose ( $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Hefeextrakt ( $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Spurenelementelösung ( $2 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Vitaminlösung ( $2 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Ampicillin ( $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ); wobei die Spurenelementelösung aus  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $27 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $1,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), konzentrierter HCl ( $100 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ) und die Vitaminlösung aus Riboflavin ( $0,42 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Pantothensäure ( $5,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Niacin ( $6,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Pyridoxin ( $1,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Biotin ( $0,06 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) und Folsäure ( $0,04 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) besteht. Ein Einsatz dieses Nährmediums ist mit dem Nachteil behaftet, daß in der Zufütterungsphase der Hauptkultur mehrere Nährsubstrate ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Spurenelemente und Vitamine) neben Glukose zudosiert werden müssen, um Biotrockenmassekonzentrationen  $X$  von bis zu  $70 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  erreichen zu können. Hierzu sind aufwendige Vorbereitungsarbeiten und technisch komplizierte Dosierungssysteme erforderlich. (Mit diesem Nachteil sind auch alle anderen in der Literatur beschriebenen fed-batch-Verfahren behaftet, bei denen allerdings keine rekombinanten Stämme verwendet werden.) Das o. g. Nährmedium zur Interferonherstellung ist weiterhin mit dem Nachteil behaftet, daß einige Nährsubstrate, insbesondere einige Spurenelemente, in sehr hohen Konzentrationen vorliegen, wie eine Abschätzung mit den aus der Literatur bekannten Ertragskoeffizienten (S. J. Pirt, 1975. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne) ergibt. Der erhöhte Einsatz mehrerer Nährsubstrate führt zu vermehrten Einsatzkosten, insbesondere durch die Verwendung der angegebenen Vitamine.

Das mit einigen Nährsubstraten überdimensionierte Nährmedium hat außerdem den zusätzlichen Nachteil, daß Präzipitationen auftreten, die Stufenlimitationen von Nährsubstraten zur Folge haben können. Eine exakte quantitative kinetische Bilanzierung durch Abnahmekinetiken der einzelnen Nährsubstrate zur Minimierung der teilweise im großen Überschuß vorhandenen Nährsubstrate ist auf Grund der starken Präzipitationen nicht möglich, so daß eine gezielte Nährmedium-Verbesserung sehr erschwert ist.

Nachteilig ist auch, daß nach der Beimpfung des Nährmediums mit der im Komplexmedium gewachsenen Vorkultur eine längere lag-Phase auftritt, die sich auf die Raum-Zeit-Ausbeute des Gesamtverfahrens negativ auswirkt. Während der Hauptfermentation wird der pH-Wert durch Zudosierung von NaOH automatisch auf den Wert pH 7,0 eingestellt. Dadurch kommt es im Verlaufe der Fermentation zur Anhäufung großer Mengen an Natriumionen, die für eine ausgewogene Ionenrelation in der Kulturlösung nachteilig ist.

Der  $pO_2$ -Wert wird während der gesamten Fermentation auf den Wert 50% der Sättigungskonzentration gehalten. Zur Realisierung dessen muß erstens mit Hilfe eines Regelsystems bei steigendem Sauerstoffbedarf der Kultur die Drehzahl des Rührers erhöht sowie zweitens von Hand der Fermentordruck erhöht bzw. drittens die Belüftungsrate gesteigert werden. Verfahren und Vorrichtungen zur Regelung des  $pO_2$ -Wertes sowohl bei der Verwendung von rekombinanten als auch bei nicht-rekombinanten Mikroorganismen zur Herstellung mikrobieller Produkte sind mehrfach beschrieben worden (Patentschrift DD 294452; Einsele et. al., 1985. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deerfield Beach). Bei dem von Fieschko und Ritch beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Interferon ist in diesem Zusammenhang nachteilig, daß die Fermentation bei dem verwendeten  $pO_2$ -Wert zur Erreichung der angestrebten Biotrockenmassekonzentration  $X$  von etwa  $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  bis  $70 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  lange Fermentationszeiten erfordert und hohe Betriebskosten auf Grund geringer Energieeffektivität impliziert. Nach Verbrauch der zu Fermentationsbeginn vorgelegten Glukose von  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  wird Glukose zudosiert und somit weiteres Wachstum ermöglicht. Gleichzeitig werden auch andere Nährsubstratkomponenten zudosiert. Das Zufütterungsmedium hat folgende Zusammensetzung: Glukose ( $433 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $107 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ( $8,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Spurenelementelösung ( $56 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ) und Vitaminlösung ( $56 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Die Zufütterungsraten werden nach einem empirischen Stufenprofil erhöht, so daß stets Glukose limitiert und die Zellen mit einer mittleren spezifischen Wachstumsrate wachsen können. Die Realisierung eines mikrobiellen Wachstums mit konstanter spezifischer Wachstumsrate oder mit variierbarer spezifischer Wachstumsrate kann auch auf andere Weise erreicht werden (Patentschrift DD 200431; T. Yamane, S. Shimizu, 1984. Bioprocess Parameter Control. S. 147-194, Akademie-Verlag Berlin; Cooney et. al., 1977. Biotechn. Bioeng., vol. 19, 55-67; S. J. Pirt, 1975, a. a. O.). Nach dem Verfahren von Fieschko und Ritch erfolgt nach Erreichen einer Biotrockenmassekonzentration  $X$  von etwa  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  zum Zeitpunkt  $t = 40$  Stunden die Initiierung der Interferonbildung durch Temperaturerhöhung auf  $42^\circ\text{C}$ . Eine Temperaturerhöhung von  $30^\circ\text{C}$  auf  $42^\circ\text{C}$  bedeutet einen zusätzlichen Verfahrensschritt. Nach der Temperaturerhöhung wird für weitere 20 Stunden fermentiert. Das Maximum der Interferonkonzentration wird zum Zeitpunkt  $t = 50$  Stunden bis 52 Stunden erhalten, anschließend sinkt der Interferontiter wieder ab. Der Erntezeitpunkt ist deshalb genau zu beachten. Das gebildete Interferon liegt in Form von Einschlusskörperchen („inclusion bodies“) im Zytoplasma vor, die während der nachfolgenden Aufarbeitung und Reinigung schwer renaturierbar sind. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die wesentlichen Nachteile des bekannten Verfahrens insbesondere in der geringen Raum-Zeit-Ausbeute des *E. coli*-Wachstums (3 Tage Gesamtfermentation: 0,5 Tage Vorkultur und 2,5 Tage Hauptkultur), in der Verwendung eines kostenintensiven Nährmediums, in der Notwendigkeit der Zufütterung von Salzen und Vitaminen zur Kulturlösung und in der energetisch aufwendigen Induktion der Interferonbildung bestehen.

#### Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, Interferone mit höherer Effektivität in *Escherichia coli* herzustellen.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, unter Vermeidung der Nachteile der bisher bekannten technischen Lösungen ein Fermentationsverfahren zur Herstellung von Interferonen in *Escherichia coli* mit hoher Raum-Zeit-Ausbeute und hohem Konversionsgrad der Substrate zu beschreiben.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe wie folgt gelöst:

Rekombinante, zur Interferonherstellung befähigte *Escherichia coli*-Zellen, werden in einem speziellen Glukose-Minimalmedium, das mindestens eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Mineralsalze enthält, nach einem spezifischen sechs-phasigen fed-batch-Verfahren in einem Produktionsfermentor unter Rückgriff auf Impfmaterialekonserven mit hohem Lebendtitel sowie hoher Vektorstabilität (und fixiert in einem exponentiellen Wachstumszustand) fermentiert. Als Impfmateriale-Konserven wird somit ein rhu-IFN-exprimierender Stamm der Spezies *E. coli* verwendet. Insbesondere werden in den bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung die rekombinanten Wirts-Vektor-Systeme

*E. coli* SK 1590/pHRW400,  
*E. coli* TG 1/pBB210 bzw.  
*E. coli* TG 1/pBB225.

eingesetzt. Durch die Verwendung dieser Impfmateriale-Konserven entfällt die Notwendigkeit von Vorkulturen (s. Abb. 1). Die sechs Fermentationsphasen sind folgendermaßen charakterisiert:

#### Phase I:

Kurze Adaptation der rekombinanten *E. coli*-Zellen aus den aufgetauten Impfmateriale-Konserven mit hohem Lebendtitel und hoher Vektorstabilität an die vortemperierte Fermentationslösung und Zunahme der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  bis zur maximalen spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\text{max}}$ . Unter  $\mu_{\text{max}}$  wird die unter den gegebenen Fermentationsbedingungen maximal erreichbare spezifische Wachstumsrate  $\mu$  verstanden (s. a. Abb. 1 und Abb. 2). Auf Grund des in den Impfmateriale-Konserven fixierten Zustandes „exponentielles Wachstum“ ist die Phase I sehr kurz (1 Stunde bis 4 Stunden).

#### Phase II:

Wachstum mit  $\mu = \mu_{\text{max}}$  bei schneller Abnahme des  $pO_2$ -Wertes bis zum Erreichen des Vorzugswertes für eine effiziente weitere Fermentation.

**Phase III:**

Fortsetzung des Wachstums mit  $\mu = \mu_{\max}$  bis zu einer angemessen hohen Biotrockenmassekonzentration  $X$  bei ständiger Abnahme der vorgelegten Glukose bis zu deren vollständigen Verbrauch bei ständiger Aufrechterhaltung des Vorzugswertes des  $pO_2$ -Wertes.

**Phase IV:**

Beginn der Zudosierungsphase von Glukose in der Weise, daß im weiteren Verlauf der Fermentation stets Glukose als limitierendes Substrat in der Nährlösung enthalten ist mit schneller Absenkung der spezifischen Wachstumsrate von  $\mu_{\max}$  auf eine für die erhöhte Interferonbildung vorteilhafte spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\text{prod}}$ .

**Phase V:**

Aufrechterhaltung des Wachstums bei  $\mu_{\text{prod}}$ .

**Phase VI:**

Fermentortechnisch bedingte Abnahme der spezifischen Wachstumsrate und Abbruch der Fermentation bei Absinken der Interferonkonzentration nach Abnahme der spezifischen Wachstumsrate auf Werte kleiner  $\mu_{\text{prod}}$ . Das verfahrensgemäße Glukose-Minimalmedium ist so beschaffen, daß Biotrockenmassekonzentrationen  $X$  von *Escherichia coli* von ca.  $70 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  erreicht werden können, ohne daß Substratkomponenten zudosiert werden müssen (mit Ausnahme von Glukose, durch deren Zudosierung das Wachstum gesteuert wird (s. u.) und von Stickstoff in Form von Ammoniak oder einer wäßrigen ammoniakalischen Lösung, durch dessen Zudosierung der pH-Wert der Kulturlösung konstant gehalten und die Kultur gleichzeitig mit einer Stickstoffquelle für das Wachstum versorgt wird). Alle eingesetzten Substratkomponenten werden im Verlaufe der Fermentation nahezu vollständig verbraucht.

Das Glukose-Minimalmedium, das zu Fermentationsbeginn vorliegt, hat folgende qualitative Zusammensetzung: Glukose, Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Diammoniumhydrogenphosphat ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), Zitronensäure, Eisenzitat, Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), Natriummolybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Zinkacetat ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Antischaummittel, vorzugsweise Antaphron NM40, Markersubstanzen in Abhängigkeit von den Auxotrophien der Wirtszellen sowie Selektionsdruckmarker in Abhängigkeit vom im Wirts-Vektor-System jeweils eingesetzten Vektor. Im Falle einer thimutation der Wirtszellen (wie z. B. in *E. coli* SK 1590 oder in *E. coli* TG 1) muß das Nährmedium Thiamin enthalten. Ein Zusatz von Ampicillin im Nährmedium ist für Wirts-Vektor-Systeme mit Ampicillinresistenzgenen der Vektoren wie z. B. bei SK 1590/pHRW400, TG 1/pBB210 und TG 1/pBB225 vorzusehen.

Für Fermentationen bis zu einer Biotrockenmassekonzentration  $X$  von  $70 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  wird folgende quantitative Zusammensetzung des Minimalmediums zu Fermentationsbeginn realisiert:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $7,8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ( $2,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $2,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Zitronensäure ( $> 1,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Eisenzitat ( $36 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $2,7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $16 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{PO}_3$  ( $3,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $2,7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $8,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), EDTA ( $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), Antaphron NM40 ( $0,33 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Für Fermentationen bis zu Biotrockenmassekonzentrationen von kleiner als  $70 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  sind entsprechend prozentual geringere Konzentrationen der Nährlösungskomponenten erforderlich.

Die Glukosekonzentration zu Fermentationsbeginn ist im Bereich von  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  bis  $60 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , in Abhängigkeit von der jeweils vorgesehenen Dauer der Phasen I, II und III einzustellen. Die Konzentrationen für die Markersubstanzen und Selektionsdruckmarker sind für das jeweils eingesetzte Wirts-Vektor-System in Vorversuchen zu ermitteln.

Es wurde eine derartige qualitative und quantitative Kombination der Glukose-Minimalmediumskomponenten gefunden, die bei einem Minimaleinsatz der einzelnen Nährsubstrate hohe Biotrockenmassekonzentrationen ermöglicht und sich durch einen hohen Konversionsgrad der eingesetzten Substrate auszeichnet.

Zur Aufrechterhaltung eines pH-Wertes von pH 6,5 bis pH 7,5, vorzugsweise pH 6,9, wird konzentrierte Ammoniumhydroxidlösung dosiert, denn es wurde überraschenderweise gefunden, daß die dosierte  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Menge als Stickstoffquelle für das Wachstum so verbraucht wird, daß sich im Medium eine für die Physiologie des Wachstums günstige Stickstoffkonzentration einstellt, wobei der Stickstoff weder inhibierend noch limitierend auf das Wachstum wirkt. Auf diese Weise wird eine nahezu vollständige Konversion der eingesetzten Stickstoffquelle erzielt.

Eine wichtige Grundlage für eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute des gesamten erfindungsgemäßen Fermentationsverfahrens zur Herstellung von Interferonen in *Escherichia coli* besteht in der Verwendung von Impfmateriale-Konserven, die sich durch einen hohen Lebendtitel und eine hohe Stabilität der die Interferongene tragenden Vektoren auszeichnen und somit die direkte Beimpfung des Nährmediums im Produktionsfermentor ermöglichen. Es sind somit keine Vorkulturen zur Erzielung einer angemessenen Impfmenge notwendig. Außerdem werden mögliche Verluste von Vektoren aus den Wirtszellen, die bei langen Vorkultivierungen oft auftreten, vermieden. Zur Beimpfung wird aus den bei tiefen Temperaturen gelagerten und anschließend aufgetauten Impfmateriale-Konserven so viel Impfmenge entnommen, daß die Biotrockenmassekonzentration  $X$  zu Fermentationsende ( $X_{\max}$ ) ein Vielfaches der Biotrockenmassekonzentration  $X$  zu Fermentationsbeginn ( $X_0$ ) ist, wobei der Impffaktor ( $X_0/X_{\max}$ ) im Bereich von 0,0005 bis 0,1, vorzugsweise bei 0,05, liegt.

Es ist wesentliches Merkmal, daß Impfmateriale-Konserven verwendet werden, in denen der Zustand „exponentielles Wachstum“ fixiert ist und zu deren Herstellung ein Nährmedium verwendet wurde, dessen Zusammensetzung der des zu beimpfenden Nährmediums im Produktionsfermentor entspricht. Auf diese Weise wird nach einer nur kurzen Verzögerungsphase von 1 Stunde bis 4 Stunden (Phase I in Abb. 1) exponentielles Wachstum mit konstanter spezifischer Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  (Phase II in Abb. 1) erreicht.

Mit zunehmender Biotrockenmassekonzentration  $X$  sinkt der  $pO_2$ -Wert auf Grund konstant gehaltener Belüftungsparameter in der Phase II ständig ab und erreicht am Ende dieser Phase einen Wert von  $pO_2 \geq 10\%$ . Im weiteren Verlauf der Fermentation (Phasen III bis Phase VI) wird der  $pO_2$ -Wert durch verfahrenstechnische Maßnahmen, wie Erhöhung der Rührerdrehzahl, im Bereich 10% bis 40%, vorzugsweise bei 20%, konstant gehalten. Bei dieser Verfahrensweise treten keine signifikanten, das Wachstum behindernden Gärungsprodukte auf. Die Fermentation bei den genannten niedrigen  $pO_2$ -Werten ermöglicht ein

schnelles Wachstum und somit eine zeiteffektive Fermentation. Der Vorzugsbereich des  $pO_2$ -Wertes von 10% bis 40% wird durch niedrige Belüftungsparameter in den Phasen I und II schnell erreicht; die Betriebskosten für das Belüftungssystem und der Energieaufwand sind niedriger als bei Fermentationen mit höheren  $pO_2$ -Werten. Die Dauer der Phase II beträgt 0,5 Stunden bis 12 Stunden, vorzugsweise 8 Stunden.

Die Dauer der Phase III, in der ebenso wie in der Phase II exponentielles Wachstum mit maximaler spezifischer Wachstumsrate  $\mu_{max}$  erfolgt, beträgt 0,5 Stunden bis 4 Stunden, vorzugsweise 2,5 Stunden. Diese Dauer ist abhängig von der Anfangskonzentration der Glukose, und zwar erfolgt die Bilanzierung der Glukosekonzentration zu Fermentationsbeginn so, daß am Ende der Phase III die vorgelegte Glukose verbraucht ist und 10% bis 35% der Endbiomasse ( $X_{max}$ ) gebildet worden sind. Im weiteren Verlauf der Fermentation wird die Dosierung von Glukose als schnell und effektiv verstoffwechselbare Kohlenstoffquelle so vorgenommen, daß die Kultivierung im weiteren, d.h. in den Phasen IV bis VI, unter permanenter Kohlenstoff-Limitation erfolgt.

Durch die Realisierung der Phasen I, II und III werden sehr schnell hohe Biotrockenmassekonzentrationen  $X$  erreicht. Bei Verwendung des Wirts-Vektor-Systems *E. coli* SK 1590/pHRW 400, das durch ein dereprimierbares Expressionssystem für Human-Interferon alpha 1 charakterisiert ist (s. Charakteristik des bekannten Standes der Technik), wurde überraschenderweise eine kontinuierliche Bildung von Interferon in den Phasen II und III bei maximaler spezifischer Wachstumsrate  $\mu_{max}$  gefunden (für das Wirts-Vektor-System *E. coli* TG 1/pBB210, das durch ein konstitutives Expressionssystem für Human-Interferon alpha 1 gekennzeichnet ist, war die Interferonsynthese in den Phasen II und III erwartungsgemäß). Besonders überraschend war aber, daß bei beiden Wirts-Vektor-Systemen durch eine Weiterführung der Fermentation bei geringeren spezifischen Wachstumsraten die Interferonbildung drastisch gesteigert werden konnte. Solche niedrigeren spezifischen Wachstumsraten, die mit einer gesteigerten Produktbildung einhergehen, werden im folgenden als  $\mu_{prod}$  bezeichnet ( $\mu_{prod} < \mu_{max}$ ).

Die Vorteile von Verfahren zur Herstellung von Interferonen mit einer Absenkung der spezifischen Wachstumsrate nach Erreichen einer angemessenen Biotrockenmassekonzentration  $X$  auf  $\mu = \mu_{prod}$  zur Steigerung der Interferonsynthese gegenüber Verfahren, bei denen die Interferonbildung durch Temperaturerhöhung oder durch Zusatz kostenintensiver Induktorsubstanzen initiiert werden muß, bestehen insbesondere in einer einfach steuerbaren, lang ausdehnbaren Interferonbildungsphase durch Regulierung der Glukosedosierung ohne zusätzliche Veränderung von Prozeßgrößen. Es gehört folglich zum Wesen der vorliegenden Erfindung, daß nach Ermittlung von  $\mu_{prod}$  für jedes zu fermentierende Wirts-Vektor-System zur Realisierung einer erhöhten Produktbildung die Fermentation nach Abschluß der Phase III weitergeführt wird.

Durch Einsetzen der Glukosedosierung, geregelt über den  $pO_2$ -Wert (Feeding-Regime), wird in der Phase IV mit einer Dauer von 0,2 Stunden bis 5 Stunden, vorzugsweise 2 Stunden, die spezifische Wachstumsrate von  $\mu_{max}$  auf  $\mu_{prod}$  verringert.  $\mu_{prod}$  wird dann in der Phase V im für eine erhöhte Interferonbildung erforderlichen Bereich gehalten. Für die Wirts-Vektor-Systeme *E. coli* SK 1590/pHRW 400 und *E. coli* TG 1/pBB210 liegt  $\mu_{prod}$  im Bereich von

$$0,05 h^{-1} < \mu_{prod} < 0,25 h^{-1},$$

vorzugsweise bei  $\mu_{prod} = 0,15 h^{-1}$ . Die Phase V wird so lange aufrechterhalten, wie dies aus fermentortechnischen Gründen, insbesondere infolge der Begrenzung der Sauerstoffeintragsleistung, möglich ist.

Die Phase VI ist schließlich gekennzeichnet durch eine schnelle Abnahme der spezifischen Wachstumsrate. In ihr wird die Fermentation abgebrochen, wenn die Interferonkonzentration nicht mehr zunimmt bzw. wenn die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  einen kritischen Wert von

$$0,01 h^{-1} < \mu_{krit} < 0,1 h^{-1},$$

vorzugsweise den Wert  $\mu_{krit} = 0,05 h^{-1}$ , unterschreitet.

Die Vorteile der vorliegenden Erfindung gegenüber den bisher bekannten technischen Lösungen bestehen insbesondere darin, daß

- durch Kultivierung von rekombinanten, interferonbildenden *Escherichia coli*-Zellen nach einem speziellen fed-batch-Verfahren hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden,
- die Notwendigkeit der Bereitung von Vorkulturen vollständig entfällt auf Grund der Verwendung von Impfmateriale-Konserven mit hohem Lebendtitel und hoher Vektorstabilität zur direkten Beimpfung der Nährlösung im Produktionsfermentor,
- in einem speziellen Glukose-Minimalmedium ein hoher Konversionsgrad der eingesetzten Substrate erzielt wird, und die Kultur bis zu Biotrockenmassekonzentrationen  $X$  von  $70 g \cdot l^{-1}$  fermentiert werden kann, ohne daß außer dem Feeding-Substrat Glukose und dem pH-stabilisierenden Ammoniumhydroxid andere Nährsubstrate zudosiert werden müssen,
- durch die Verwendung von Ammoniumhydroxid zur Einstellung des verfahrensgemäß angepaßten pH-Wertes gleichzeitig der Kultur die Stickstoffquelle für das Wachstum zugeführt wird (bei vollständiger Konversion dieser N-Quelle) und
- nach schnellem Erreichen einer angemessenen Biotrockenmassekonzentration  $X$  über das gewählte Feeding-Regime eine Absenkung der spezifischen Wachstumsrate auf eine Rate  $\mu_{prod}$  mit erhöhter Interferon-Syntheseleistung vorgenommen und die Phase einer erhöhten Interferonbildung mit diesem Regime über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden kann.

#### Ausführungsbeispiel

15l Glukose-Minimalmedium, die sich in einem Rührkesselfermentor des Typs Chemap 30 befinden, werden mit 50ml einer Glycerolkonserve des Stammes *Escherichia coli* TG 1/pBB210 beimpft. Das Glukose-Minimalmedium hat folgende Zusammensetzung:  $KH_2PO_4$  ( $7,8 g \cdot l^{-1}$ ), Zitronensäure ( $1,47 g \cdot l^{-1}$ ),  $MgSO_4 \cdot H_2O$  ( $2,2 g \cdot l^{-1}$ ), Eisenzitrat ( $36 mg \cdot l^{-1}$ ),  $(NH_4)_2HPO_4$  ( $2,3 g \cdot l^{-1}$ ),  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  ( $2,7 mg \cdot l^{-1}$ ),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  ( $16 mg \cdot l^{-1}$ ),  $CuCl_2 \cdot H_2O$  ( $1,5 mg \cdot l^{-1}$ ),  $H_3BO_3$  ( $3,3 mg \cdot l^{-1}$ ),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  ( $2,7 mg \cdot l^{-1}$ ),  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  ( $8,4 mg \cdot l^{-1}$ ), EDTA ( $5 mg \cdot l^{-1}$ ), Glukose ( $25 g \cdot l^{-1}$ ), Thiamin ( $2,67 mg \cdot l^{-1}$ ), Ampicillin ( $0,1 g \cdot l^{-1}$ ), Antaphron NM40 ( $0,44 ml \cdot l^{-1}$ ). Der Lebendtitel in der Glycerolkonserve ist sehr hoch; sie enthält etwa  $1,3 g$  *E. coli*-Biotrockenmasse.

Nach der Beimpfung erfolgt die Fermentation bei 70 kPa Fermentorinnendruck, einer Temperatur von 29°C, einer Belüftung mit einem Belüftungsverhältnis 1,0 VVM und einem pH-Wert von pH 6,9, der mit Hilfe einer pH-Regelung durch Zudosierung von 25%igem NH<sub>3</sub> konstant gehalten wird. Die Fermentation wird über sechs charakteristische Phasen (I bis VI) geführt; die Kinetiken von Wachstum, Substratverbrauch und Interferonbildung sind in Abb. 2 dargestellt.

**Phase I:**

Nach der Beimpfung zum Zeitpunkt t = 0 mit der Glycerolkonzerve adaptieren sich die E. coli-Zellen, beginnen zu wachsen und erreichen bei t = 3 Stunden (Übergang von Phase I zu Phase II) die in den vorgegebenen Kulturbedingungen maximal mögliche spezifische Wachstumsrate  $\mu_{max}$ .

**Phase II:**

Die E. coli-Kultur wächst exponentiell mit  $\mu_{max} = 0,45 h^{-1}$ . Das Substrat Glukose wird zum Wachstum verbraucht. Der pO<sub>2</sub>-Wert sinkt auf Grund des zunehmenden Sauerstoffbedarfs der wachsenden Kultur ab. Die Phase II ist nach Erreichen des pO<sub>2</sub>-Wertes von 20% der Sättigungskonzentration zu Fermentationsbeginn zum Zeitpunkt t = 10 Stunden beendet.

**Phase III:**

In dieser Fermentationsphase wird regeltechnisch durch Erhöhung der Rührerdrehzahl dafür gesorgt, daß der pO<sub>2</sub>-Wert konstant auf 20% bleibt. Die zu Fermentationsbeginn im Kulturmedium vorhandene Glukosekonzentration wird mit 25 g · l<sup>-1</sup> so bemessen, daß zum Zeitpunkt t = 12,5 Stunden die vorgelegte Glukose vollständig verbraucht ist. Dieser Zeitpunkt markiert auch das Ende der Phase III, in der das Wachstum ebenso wie in der Phase II mit  $\mu_{max}$  erfolgt. Die Interferonkonzentration (IFN alpha 1) nimmt ebenso wie die Biotrockenmasse (X) exponentiell zu, d. h. die spezifische Interferonkonzentration (IFN alpha 1/X) ist annähernd konstant.

**Phase IV:**

Mit Beginn der Phase IV erfolgt der Start der Glukosedosierung, geregelt über den pO<sub>2</sub>-Wert von 20%, wobei die Rührerdrehzahl auf dem Ausgangs der Phase III erreichten Wert belassen wird. Nach einer Dauer von 32 Stunden ist die gewünschte Absenkung der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  auf  $\mu_{prod} = 0,15 h^{-1}$  erreicht.

**Phase V und Phase VI:**

Im folgenden Verlauf wird die für die Interferonbildung günstige spezifische Wachstumsrate  $\mu_{prod} = 0,15 h^{-1}$  für den Zeitraum von 7 Stunden aufrechterhalten. Die spezifische Interferonkonzentration (IFN alpha 1/X) steigt nun ständig an. Das exponentielle Wachstum mit  $\mu_{prod}$  kann für diese Zeitdauer realisiert werden, da es fermentortechnisch möglich ist, für diesen Zeitraum den Sauerstoffeintrag in die Kulturlösung ständig zu erhöhen. Am Ende der 22,5stündigen Fermentation werden in der Kulturlösung eine Biotrockenmassekonzentration X von E. coli TG 1/pBB 210 von 55,3 g · l<sup>-1</sup> und eine IFN-Konzentration von IFN alpha 1 von 2 · 10<sup>10</sup> IE · l<sup>-1</sup> erzielt.

**Legenden zu den Abbildungen**

**Abb. 1**

Schema des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von Interferonen in Escherichia coli

————— pO<sub>2</sub>  
 - - - - - Glukose  
 .....  $\mu$  spezifische Wachstumsrate

**Abb. 2**

Kinetik von Wachstum, Substratverbrauch und Interferonbildung während der Fermentation von Escherichia coli TG 1/pBB 210  
 Es bedeuten:

rHu-IFN alpha-1: rekombinantes Humaninterferon alpha 1  
 X: Biotrockenmasse  
 Glc: Glukose  
 $\mu$ : spezifische Wachstumsrate

Zum Zeitpunkt t = 12,5h beginnt die Glukosedosierung.

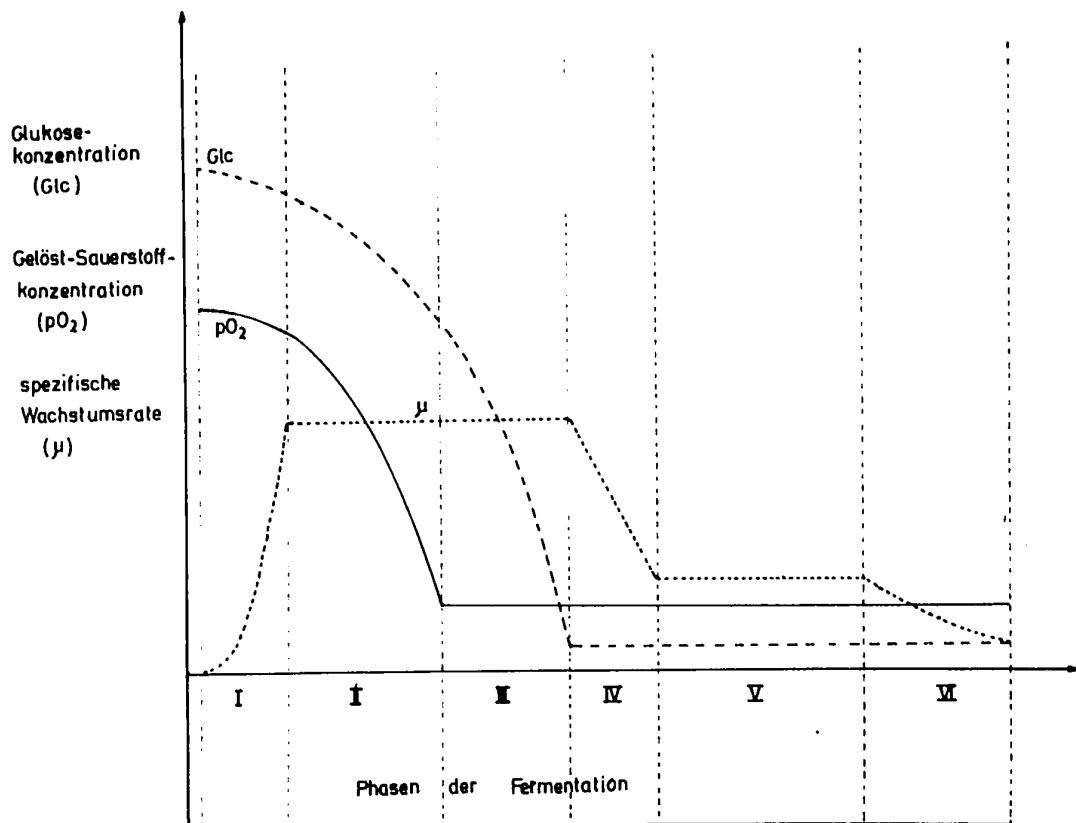


Abb. 1

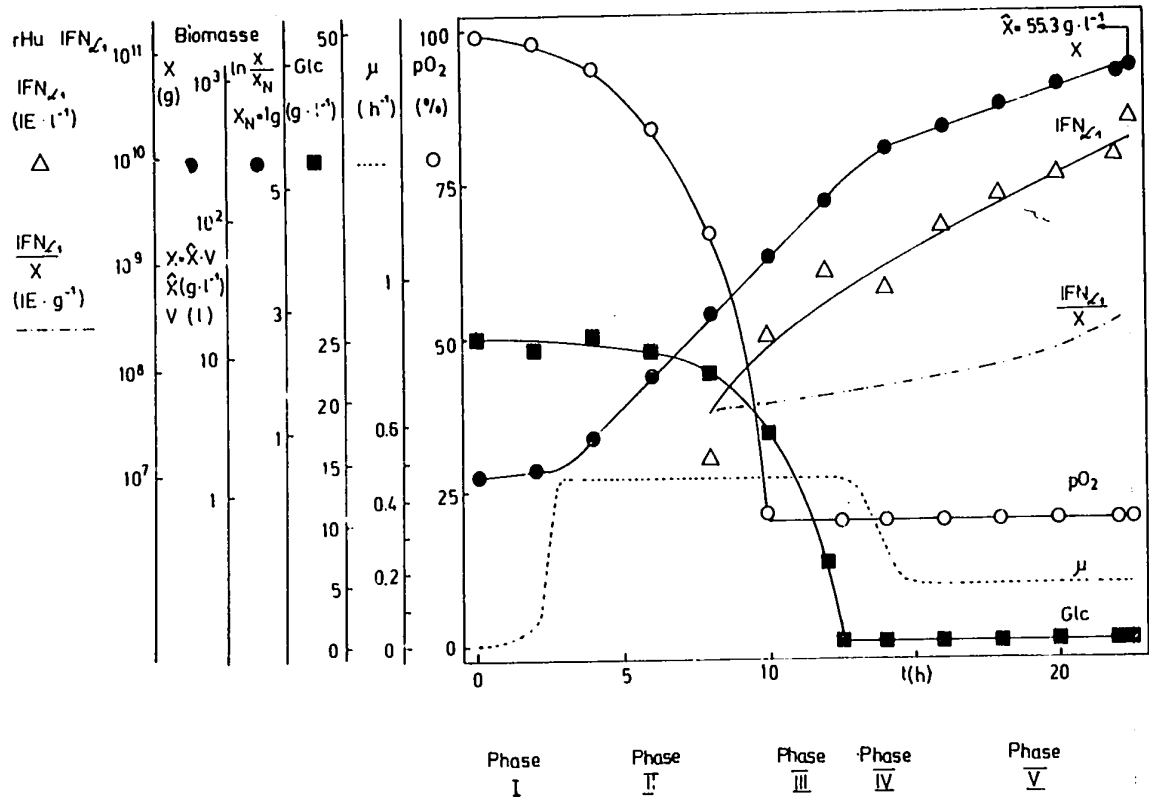


Abb. 2