(11) Número de Publicação: **PT 1524316 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/01 (2007.10) ***C12N 9/02*** (2007.10)
C12Q 1/02 (2007.10) ***C12M 1/06*** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1993.11.19**

(30) Prioridade(s): **1992.11.23 US 989844**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.04.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.05.27**
156/2009

(73) Titular(es):
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990 **US**

(72) Inventor(es):
JAMES R. SWARTZ **US**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA PROPENSÃO DE BACTÉRIAS PARA INSTABILIDADE DO OXIGÉNIO DISSOLVIDO**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Método para a determinação da propensão de bactérias para instabilidade do oxigénio dissolvido"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um método melhorado para a produção de polipéptidos por fermentação bacteriana. Mais especificamente, a presente invenção aborda o recentemente encontrado problema da instabilidade do oxigénio dissolvido que se manifesta particularmente em fermentações bacterianas em larga escala.

Descrição da Arte Relacionada

A produção de grandes quantidades de polipéptidos e proteínas biologicamente activos, relativamente puros, é importante economicamente para o fabrico de formulações farmacêuticas para seres humanos e animais, enzimas, e outras especialidades químicas. Para a produção de muitas proteínas, as técnicas de ADN recombinante tornaram-se o método de eleição porque podem ser expressas grandes quantidades de proteínas exógenas em bactérias e outras células hospedeiras, isentas de outras proteínas contaminantes. A expressão de proteínas por técnicas de ADN recombinante para a produção de células ou partes de células que funcionam como biocatalisadores constitui também uma importante aplicação.

A produção de proteína recombinante envolve a transfecção de células hospedeiras com ADN que codifica a proteína e o crescimento das células sob condições que favorecem a expressão da proteína recombinante. O procariota *E. coli* é favorecido como hospedeiro pois pode-se fazer com que produza proteínas recombinantes com elevados rendimentos. Existem numerosas patentes norte-americanas sobre a expressão bacteriana em geral de ADN que codifica proteínas, incluindo a Pat. U.S. 4 565 785 sobre uma molécula de ADN recombinante compreendendo um gene bacteriano para uma proteína transportadora extracelular ou periplasmática e um gene não

bacteriano; a Pat. U.S. 4 673 641 sobre a co-produção de um polipéptido estranho com um polipéptido formador de agregados; a Pat. U.S. 4 738 921 sobre um vector de expressão com um promotor/operador *trp* e fusão LE *trp* com um polipéptido tal como IGF-I; a Pat. U.S. 4 795 706 sobre a expressão de sequências de controlo para incluir com uma proteína estranha; e a Pat. U.S. 4 710 473 sobre plasmídeos de ADN circular específicos tais como os que codificam IGF-I.

A cadeia de transferência de electrões de organismos bacterianos é capaz de transferir electrões de substratos para oxigénio molecular. Os citocromos são um grupo de proteínas de transferência de electrões contendo ferro na cadeia de transferência de electrões que actuam sequencialmente para transferir electrões de flavoproteínas para oxigénio molecular. O citocromo terminal da cadeia de transferência de electrões é denominado citocromo-oxidase.

Quando uma porção de um fermentador bacteriano sofre uma baixa concentração de oxigénio dissolvido (DO_2), o organismo bacteriano é induzido para a produção do complexo de citocromo-d-oxidase. Fu *et al.*, *Mol. Gen. Genetics*, 226: 209-213 (1991). Este complexo tem uma maior afinidade para o oxigénio do que o complexo de citocromo-o-oxidase normalmente utilizado. Anraku e Gennis, *TIBS*, 12: 262-266 (1987). Assim, quando está presente, o complexo de citocromo d permite ao organismo continuar com respiração aeróbica sob condições de baixa concentração de oxigénio.

A ubiquinona é o mediador do transporte de electrões da cadeia de transporte de electrões que é normalmente utilizada pelas bactérias durante crescimento aeróbico vigoroso. Contudo, sob condições vagamente definidas como a aproximação à fase estacionária [Poole e Ingledew, "Pathways of Electrons to Oxygen," em Neidhardt FC *et al.* (eds.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Vol. 1 (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987) p.180], é induzida a produção de um mediador do transporte de electrões alternativo, a menaquinona. Na maioria das fermentações de elevada densidade celular, uma grande porção do procedimento é conduzida com as células numa condição aproximadamente em fase estacionária ou na sua aproximação.

Isto pode ser causado por limitação da fonte de carbono/energia para evitar o esgotamento do oxigénio, através de medidas utilizadas para induzir a formação de produto, ou pela presença do produto.

O complexo de citocromo-d-oxidase possui maior afinidade para a menaquinona do que para a ubiquinona (Anraku e Gennis, *supra*), e presumivelmente utiliza a menaquinona como seu principal mediador do transporte de electrões quando está presente a menaquinona. Infelizmente, os organismos que utilizam a menaquinona como seu mediador do transporte de electrões crescem com uma eficiência muito reduzida. O rendimento do crescimento aeróbico de organismos a que falta ubiquinona é de cerca de 30% do do organismo do tipo selvagem. Wallace e Young, *Biochim. Biophys. Acta*, 461: 84-100 (1977). Exemplos de organismos microbianos com mediadores do transporte de electrões mutados tais como citocromo-d-oxidase ou citocromo-o-oxidase são reportados por Oden *et al.*, *Gene*, 96: 29-36 (1990); Oden e Gennis, *J. Bacteriol.*, 173: 6174-6183 (1991); Kelly *et al.*, *J. Bacteriol.*, 172: 6010-6019 (1990); Iuchi *et al.*, *J. Bacteriol.*, 172: 6020-6025 (1990); Soberon *et al.*, *J. Bacteriol.*, 172: 1676-1680 (1990); Poole *et al.*, *J. Gen. Microbiol.*, 135: 1865-1874 (1989); Fang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264: 8026-8032 (1989); James *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 58: 277-281 (1989); Green *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263: 13138-13143 (1988); Soberon *et al.*, *J. Bacteriol.*, 171: 465-472 (1989); Sharma *et al.*, Indian *J. Microbiol.*, 27: 26-31 (1987); Yang, *Arch. Microbiol.*, 144: 228-232 (1986); Matsushita e Kaback, *Biochemistry*, 25: 2321-2327 (1986); Tamura-Lis e Webster, *Arch. Biochem. Biophys.*, 244: 285-291 (1986); Au *et al.*, *J. Bacteriol.*, 161: 123-127 (1985); McInerney *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 141: 447-452 (1984); Lorence *et al.*, *J. Bacteriol.*, 157: 115-121 (1984); Kranz *et al.*, *J. Bacteriol.*, 156: 115-121 (1983); Green e Gennis, *J. Bacteriol.*, 154: 1269-1275 (1983); Bryan e Kwan, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 19: 958-964 (1981); Willison *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 10: 249-255 (1981); Willison e Haddock, *FEMS Microbiol. Lett.*, 10: 53-57 (1981); Hoffman *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 105: 177-185 (1980); Hoffman *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 100: 19-27 (1979); Haddock e Schairer, *Eur. J. Biochem.*, 35: 34-45 (1973); Haltia *et al.*, *EMBO J.*, 8: 3571-3579 (1989); Dikshit *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 293:

241-245 (1992); Lemieux *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 2105-2113 (1992); Minagawa *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 2096-2104 (1992); Dassa *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 229: 341-352 (1991); Williams *et al.*, *Biochem. J.*, 276: 555-557 (1991); Puustinen *et al.*, *Biochemistry*, 30: 3936-3942 (1991); Denis *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265: 18095-18097 (1990); Chepuri *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1018: 124-127 (1990); Andersson e Roth, *J. Bacteriol.*, 171: 6734-6739 (1989); Puustinen *et al.*, *FEBS Lett.*, 249: 163-167 (1989); Daldal, *J. Bacteriol.*, 170: 2388-2391 (1988); Poole e Williams, *FEBS Lett.*, 231: 243-246 (1988); Georgiou *et al.*, *J. Bacteriol.*, 169: 2107-2112 (1987); O'Brian e Maier, *J Bacteriol*, 161: 507-514 (1985); Green *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 259: 7994-7997 (1984); Au *et al.*, *J. Bacteriol.*, 157: 122-125 (1984); Matsushita *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4889-4993 (1983); Sasarman, *Rev. Can. Biol.*, 31: 317-319 (1972); Van der Oost *et al.*, *EMBO J.*, 11: 3209-3217 (1992); Deutch, 92nd General Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, LA, May 26-30, 1992, *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 92: 272 (1992); Mogi *et al.*, *Biophys. J.*, 61: A284 (1992); Tron e Lemesle-Meunier, *Curr. Genet.*, 18: 413-420 (1990); Shioi *et al.*, *J. Bacteriol.*, 170: 5507-5511 (1988); Oden e Gennis, *J. Cell. Biol.*, 107: 624A (1988); Webster e Georgiou, *Fed. Proc.*, 44: abstract 678 (1985); Terriere *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111: 830-839 (1983); Green e Gennis, *Fed. Proc.*, 41: abstract 3652 (1982); Tamura-Lis e Webster, *Fed. Proc.*, 41: abstract 2799 (1982); Green *et al.*, *Fed. Proc.*, 40: 1669 (1981); Willison e John, *J. Gen. Microbiol.*, 115: 443-450 (1979); e Hashimoto e Hino, *J. Sci. Hiroshima Univ.* Ser. B Div. 2 (Bot), 15:103-114 (1975).

Os fermentadores para cultura de bactérias são normalmente agitados para transferir o oxigénio da fase gasosa para a fase líquida (*i.e.*, o meio), e, secundariamente, para manter concentrações uniformes dos componentes do meio, incluindo DO_2, em todo o tanque fermentador. A presente invenção baseia-se na verificação inesperada de que enquanto durante a cultura em pequena escala para conseguir a expressão de ADN em bactérias o meio de fermentação tem uma concentração relativamente estável de DO_2, durante fermentações bacterianas em larga escala podem acontecer alterações súbitas e drásticas, essencialmente incontroláveis na concentração de

DO_2 do meio. Estes eventos evitam a progressão bem sucedida e reprodutível de fermentações em larga escala, tornando-as inadequadas para a produção de proteína de alta qualidade ou outros produtos. Quando se crescem culturas sob limitação de glucose ou de outra fonte de carbono/energia, o controlo da alimentação da fonte de carbono/energia pode ser programado para proporcionar uma adequada concentração de DO_2 sob a maioria das circunstâncias; contudo, em grandes reactores, verifica-se na presente invenção que esta acção de controlo não é suficiente para contrariar eventos biológicos que se precipitam.

Deste modo, é um objecto da presente invenção proporcionar um método eficaz e fiável para evitar o problema das instabilidades de DO_2 recentemente observadas nas fermentações bacterianas.

É um objecto particular para atingir uma progressão bem sucedida e reprodutível das fermentações bacterianas, especialmente fermentações bacterianas em larga escala, produzir polipéptidos de alta qualidade através de um processo melhorado de boa prática de fabrico (GMP) para que tenha aprovação pela FDA, e/ou para produzir os polipéptidos com alto rendimento.

É outro objecto proporcionar um método para a determinação da propensão de uma cultura para instabilidade de DO_2 durante o decorrer de uma fermentação bacteriana.

Este e outros objectos serão evidentes para as pessoas competentes na matéria.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção baseia-se na verificação inesperada de que as alterações súbitas no teor de DO_2 são de origem biológica e estão relacionadas com a troca pelo organismo entre diferentes vias de respiração. Um exaustivo entendimento destes eventos sugere que podem ser evitados pelos cuidadosos desenho e operação do vaso de fermentação e/ou do processo de fermentação.

Uma solução é assegurar que a região de fornecimento máximo de oxigénio à fase líquida, *i.e.*, o fundo do vaso, é também a região de entrada máxima de glucose. Assim, o fermentador é desenhado de modo a ter a entrada de glucose no seu fundo.

Numa configuração alternativa do fermentador, os pontos e taxas de entrada de glucose podem ser distribuídos por todo o vaso para ir ao encontro de aproximadamente a taxa de disponibilidade de oxigénio nas várias regiões do vaso.

Para fermentações em modo descontínuo com alimentação em que o crescente volume de caldo altera com frequência significativamente a relação geométrica entre os impulsores do agitador e o volume de líquido, e em fermentadores maiores, *i.e.*, aqueles que têm pelo menos aproximadamente 1000 litros de capacidade, preferivelmente cerca de 1000 a 100 000 litros de capacidade, a solução preferida para o problema abordado pela presente invenção para permitir a utilização mais eficiente do vaso de fermentação consiste em mutar o organismo hospedeiro de modo a inactivar um elemento chave de uma das vias de respiração (*e.g.*, complexo de citocromo-d-oxidase, complexo de citocromo-o-oxidase, menaquinona, ou uma das NADH-desidrogenases) de modo a que o organismo deixe de poder trocar entre as duas vias de transporte de electrões.

Especificamente, a presente invenção proporciona um método para determinação da propensão de uma cultura de células bacterianas para instabilidade de DO_2 num fermentador de larga escala compreendendo (a) realizar a cultura da cultura celular na presença de uma fonte de carbono/energia introduzida a uma taxa de alimentação estabelecida num fermentador de pequena escala configurado de modo a que a concentração de DO_2 em toda a cultura celular não seja homogénea durante a fermentação, (b) depois de produzida uma massa celular significativa, aumentar a taxa de alimentação da fonte de carbono/energia, e (c) determinar se ocorre não linearidade no declive do gráfico de concentração de DO_2 *versus* tempo ou se são induzidas oscilações na concentração de DO_2 depois do aumento da taxa de alimentação da fonte de carbono/energia.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 ilustra a configuração de um fermentador de 10 L desenhado para imitar as instabilidades de DO_2 em larga escala.

A figura 2 ilustra a linhagem da estirpe hospedeira de *E. coli* W3110 deficiente em protease, designada por 27C7.

As figuras 3A e 3B representam os esquemas para a mutação dos genes *tonA* e *phoA* genes, respectivamente, na estirpe W3110 de *E. coli*.

A figura 4 representa em detalhe a construção para a eliminação do gene *tonA* de W3110.

A figura 5 representa a construção do plasmídeo pLS32, um plasmídeo intermediário na preparação de pLS32Tsc, que contém um gene que codifica IGF-I.

A figura 6 representa a construção de pAPlamB, outro plasmídeo intermediário na preparação de pLS32Tsc e na preparação de um plasmídeo intermediário adicional, pLamBIGF.

A figura 7 representa a construção de pLS32lamB, ainda outro plasmídeo intermediário na construção de pLS32Tsc.

A figura 8 representa a construção de pLS33lamB, outro plasmídeo intermediário na preparação de pLS32Tsc.

A figura 9 representa a construção de pLS33Tsc, outro intermediário na preparação de pLS32Tsc e de pBKIGF-2, sendo este último um plasmídeo intermediário na preparação de outro vector de expressão utilizado nos exemplos que se seguem, nomeadamente, pBKIGF-2B.

A figura 10 representa a construção de pLS32Tsc a partir de pLS33Tsc e pLS32lamB.

A figura 11 representa a sequência nucleotídica da cassete de expressão e a sequência de aminoácidos codificada

pela sequência de sinal *lamB* e pelo gene de IGF-I no plasmídeo pLS32Tsc (SEQ ID NO: 11 e 12, respectivamente).

A figura 12 é um diagrama básico do fermentador de 1000 L no qual ocorrem problemas de instabilidade de DO_2.

A figura 13 ilustra a taxa de bombagem de glucose em g/min. (Fig. 13A) e a percentagem de DO_2 (Fig. 13B) *versus* tempo durante uma fermentação de 1000 L da estirpe 27C7 transformada com pLS32Tsc.

A figura 14 ilustra a percentagem de DO_2 (losangos a cheio) e a taxa de bombagem de glucose (círculos a branco) *versus* tempo durante uma fermentação de 1000 L da estirpe 27C7 transformada com pLS32Tsc, em que a taxa de alimentação de glucose está sob controlo manual.

A figura 15 é um diagrama básico do fermentador de 1000 L modificado para investigar a instabilidade de DO_2.

A figura 16 ilustra uma análise da instabilidade de DO_2 *vs*. Tempo no fermentador de 1000 L da estirpe 27C7 transformada com pLS32Tsc, em que são utilizadas alimentação de topo e de fundo de glucose. A % de DO_2 no fundo do vaso é representada por quadrados, a % de DO_2 no topo do vaso é representada por círculos, e a taxa de bombagem de glucose/3 (g/min) é representada por uma linha contínua.

A figura 17 mostra um mapa de restrição para o plasmídeo p200, utilizado para produzir pLamBIGF, um plasmídeo intermediário na produção de pLBIGFTsc, utilizado para preparar pBKIGF-2.

A figura 18 representa a sequência nucleotídica do fragmento *Eco*RI-*Eco*RI (das posições 1149 a 1633) de p200 contendo as sequências do gene de IGF-I e MF alfa I prepro (SEQ ID NO: 13).

A figura 19 representa a construção de pLamBIGF a partir de três fragmentos de plasmídeo e uma porção de ADN sintético (SEQ ID NOS: 14 e 15). pLamBIGF é um plasmídeo intermediário na produção de pLBIGFTsc, utilizado para preparar pBKIGF-2.

A figura 20 representa a construção do plasmídeo intermediário pLBIGFTsc de pLamBIGF.

A figura 21 representa a construção do plasmídeo intermediário pRanTsc utilizado na produção de pBKIGF-2.

A figura 22 representa a construção de pBKIGF-2 a partir de pLS32Tsc, pLBIGFTsc, pLS33Tsc e pRanTsc.

A figura 23 representa a construção de pBKIGF-2A, utilizado para preparar pBKIGF-2B, a partir de pLBIGFTsc, pBKIGF-2 e uma porção de ADN sintético (SEQ ID NOS: 16 e 17).

A figura 24 representa a construção de pLamBRan, utilizado para preparar pBKIGF-2B, a partir de pLS33LamB, pRANTES e uma porção de ADN sintético (SEQ ID NOS: 18 e 19).

A figura 25 representa a construção do vector de expressão pBKIGF-2B a partir de pBKIGF-2, pBKIGF-2A, pLamBRan, e uma porção de ADN sintético (SEQ ID NOS: 20 e 21).

A figura 26 ilustra a % de DO_2 (Fig. 26A) e a taxa de bombagem de glucose (ml/min) (Fig. 26B) *versus* tempo no fermentador de 10 L modificado apresentado na Fig. 1 com um organismo derivado da estirpe 27C7, designado 37D6, transformado com o vector de expressão pBKIGF-2B.

DESCRIÇÃO DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

A. Definições

Tal como aqui se utiliza, "IGF-I" refere-se ao factor do crescimento semelhante a insulina de qualquer espécie, incluindo bovino, ovino, porcino, equino e, preferivelmente, humano, na forma da sequência nativa ou numa forma variante e produzido recombinantemente. Num método preferido, o IGF-I é clonado e o seu ADN é expresso, *e.g.*, através do processo descrito em EP 128 733 publicado em 19 de Dezembro, 1984.

Tal como aqui se utiliza, a frase "fonte de carbono/energia" refere-se a uma fonte de carbono e energia para as células. Exemplos de uma tal fonte incluem glicerol,

succinato, lactato e açúcares tais como, *e.g.*, glucose, lactose, sacarose e frutose. A selecção da fonte particular de carbono/energia a empregar dependerá principalmente da bactéria utilizada. A fonte de carbono/energia preferida para a fermentação de *E. coli* é a glucose.

Tal como aqui se utiliza, a frase "cadeia de transporte de electrões" ou "cadeia respiratória" refere-se à cadeia que consiste numa série de "transportadores de electrões" em bactérias capazes de transferir electrões de moléculas de substrato para oxigénio molecular. Estão assim envolvidos na via de respiração aeróbica, e na promoção da transferência de oxigénio no interior das bactérias. Estes transportadores de electrões incluem, mas não se lhes limitam, uma NADH-desidrogenase, uma quinona tal como ubiquinona e menaquinona, e um componente do complexo de citocromo-o-oxidase ou do complexo de citocromo-d-oxidase.

Um organismo bacteriano com uma cadeia de transporte de electrões "danificada" ou "inactivada" refere-se a bactérias que são mutadas de modo a tornar inactivos ou incapacitar pelo menos um, mas não todos, os transportadores de electrões que constituem as suas cadeias de transporte de electrões. Esta mutação pode ser por meio de deleção do componente genético que representa um transportador de electrões, ou alternativamente, por alterações nos nucleótidos do componente genético de modo a que deixe de funcionar na via definida acima. Assim, por exemplo, se o componente genético é citocromo-o- ou -d-oxidase, o organismo pode produzir o produto do gene da citocromo-o-oxidase mas não o produto do gene da citocromo-d-oxidase, ou o produto do gene da citocromo-d-oxidase mas não o produto do gene da citocromo-o-oxidase. O organismo bacteriano preferido possui um gene inactivado de citocromo d ou o oxidase, mais preferivelmente um gene inactivado de citocromo-o-oxidase, e o mais preferivelmente não possui este último gene.

Tal como aqui se utiliza, fermentação em "larga escala" refere-se a uma fermentação num fermentador que tem pelo menos aproximadamente 1000 litros de capacidade volumétrica, *i.e.*, volume de trabalho, deixando espaço adequado para espaço de cabeça. Fermentação em "pequena escala" refere-se

genericamente a fermentação num fermentador que não tem mais de aproximadamente 100 litros de capacidade volumétrica, preferivelmente não mais de aproximadamente 10 litros.

B. Modos de Realização da Invenção

Na presente invenção, utiliza-se um aparelho de fermentação especialmente configurado para determinar a propensão de uma determinada cultura de células bacterianas para instabilidade de DO_2 durante a progressão de uma fermentação bacteriana em larga escala. Este método de monitoração utiliza um fermentador de pequena escala. O fermentador é configurado de modo a que a concentração de DO_2 em toda a cultura de células não seja homogénea durante a fermentação. Esta falta de homogeneidade pode ser conseguida através de vários meios. Um meio preferido é equipando o fermentador com uma entrada no seu topo para introdução da fonte de carbono/energia. Outra configuração consiste em equipar o fermentador com apenas dois impulsores, em vez dos três normalmente utilizados, de modo que a mistura seja fraca no topo do fermentador. Preferivelmente, a entrada da fonte de carbono/energia e os dois impulsores são ambos parte do aparelho fermentador. Outra característica preferida é de que o fermentador possua não apenas uma sonda para DO_2 mas também uma sonda redox para medir o potencial redox. Estas sondas são preferivelmente montadas no fermentador próximo do impulsor mais no fundo.

A concretização mais preferida utilizada para este método é um fermentador de 10 litros cujo diagrama é mostrado na Fig. 1. Nesta figura o vaso ***1*** está equipado com dois impulsores, um impulsor de fundo ***3*** e um de topo ***5***, preferivelmente impulsores do tipo de Rushton, montados num veio vertical ***7*** normalmente operado a 150-1000 rpm. Os dois impulsores estão localizados significativamente abaixo (*i.e.*, pelo menos um/quarto abaixo do nível do volume total da cultura) da superfície ***9*** do meio de fermentação. Utiliza-se um meio de entrada de gás ***11*** preferivelmente um anel aspersor de ar ou um aspersor de ar rotativo, para introduzir ar no fundo do fermentador, preferivelmente a cerca de 10 litros *standard* por minuto.

Uma sonda de DO_2 ***13*** preferivelmente montada na parede do vaso próximo do impulsor do fundo ***3*** mede a concentração de oxigénio dissolvido no meio de fermentação (e portanto acessível ao organismo) no fundo do vaso. Esse sinal é preferivelmente enviado a um computador de monitoração e controlo, que depois regula a taxa de alimentação da fonte de carbono/energia para as bactérias (tal como glucose) no fermentador. O tanque está também equipado com uma sonda redox ***15*** preferivelmente montada na parede do tanque ao mesmo nível que a sonda de DO_2 próximo do impulsor do fundo ***3***. Esta sonda redox mede o potencial redox do meio, através de um sinal para transformar a leitura no potencial redox. Nesta configuração, a fonte de carbono/energia é alimentada através de um meio de entrada de líquidos ***17***, tal como uma tubagem, no topo do vaso. Não é mostrada uma linha de alimentação no topo do vaso que é utilizada para adicionar NH_4OH conforme necessário para controlar o pH do caldo. Também não é mostrada uma outra linha de alimentação no topo do vaso, que pode ser utilizada para uma alimentação lenta de nutrientes complexos.

O método para a determinação da propensão de uma cultura de células bacterianas para instabilidade de DO_2 em fermentadores em larga escala envolve a cultura no vaso descrito atrás das bactérias contendo o ADN que se deseja expressar num meio de fermentação. Durante este passo inicial de cultura, uma fonte de carbono/energia para as bactérias, tal como glucose, é alimentada a uma taxa de alimentação predeterminada no meio de fermentação. Na Figura 1, esta alimentação seria através dos meios de entrada de topo ***17*** do fermentador. É alimentado ar no fundo do fermentador. Na Figura 1, o ar é alimentado através dos meios de entrada do fundo ***11*** no meio de fermentação. O potencial redox e a concentração de DO_2 do meio de fermentação são monitorados durante a fermentação por meio das suas respectivas sondas ***13*** e ***15***.

Quando está acumulada uma massa celular significativa, *i.e.*, quando a cultura possui suficiente capacidade de captação de oxigénio para exceder a taxa de transferência de oxigénio da reacção, ou seja, cerca de 10-50 gramas por litro de células, peso seco, a taxa de alimentação da fonte de carbono/energia é aumentada para levar o DO_2 do seu ponto de

regulação para um valor inferior. Este aumento da taxa de alimentação é preferivelmente apenas um ligeiro aumento de modo que a DO_2 é diminuída lentamente. Uma não linearidade significativa no declínio da DO_2 (*i.e.*, uma alteração de um declive gradual para um declive rápido no gráfico de DO_2 *vs.* tempo) e/ou uma capacidade de induzir oscilações de DO_2 à superior taxa de alimentação de glucose crítica determinada experimentalmente, indicam propensão da cultura para produzir instabilidades de DO_2.

Os exemplos que se seguem são oferecidos a título de ilustração e não de limitação.

EXEMPLOS

Introdução

Verificou-se aqui que quando o organismo foi previamente induzido para a presença de menaquinona e do complexo de citocromo-d-oxidase, tem a capacidade de sequestrar baixas concentrações de oxigénio mas fá-lo ineficientemente. Quando está presente oxigénio suficiente, parece que esta via ineficiente não pode funcionar.

Um exame da estequiometria do crescimento celular revela as consequências de uma ineficiente utilização de oxigénio facilitada pela menaquinona. A composição em C, H, O, N da *E. coli* é aproximadamente de $C_{4,18}H_{7,36}N_1O_{2,03}$. A equação que descreve o crescimento aeróbico pode portanto ser escrita como: $aC_6H_{16}O_6 + bO_2 + cNH_3 = dC_{4,18}H_{7,36}N_1O_{2,03} + eCO_2 + fH_2O$

Utilizando esta equação, o número de moles de oxigénio utilizadas por mole de glucose consumida pode ser estimado como função do rendimento do crescimento como se mostra na tabela que se segue:

Rendimento do crescimento (g células/g glucose)	Moles de O_2/Moles de Glucose
0,4	3,1
0,7	5,3
0,0	6,0

Se uma cultura de *E. coli* que tem expresso o complexo de citocromo-d-oxidase e menaquinona encontra uma região de baixa concentração de DO_2, o sistema da citocromo-o-oxidase com a sua menor afinidade para o oxigénio deixa de poder suportar a respiração aeróbica. Assim, tem que ser utilizada a via de respiração mediada pela citocromo-d-oxidase. Esta troca para a via de respiração ineficiente reduz o fornecimento de ATP e provoca um menor rendimento do crescimento. Em resultado, o oxigénio utilizado por mole de glucose alimentada aumenta. Como o vaso está já num estado que permite regiões locais de baixa concentração de DO_2, o consumo aumentado de oxigénio expandirá a região de baixa concentração de DO_2 desde que o fornecimento de glucose permaneça constante. Isto faz com que mais células troquem para a via ineficiente e aumentem mais ainda as necessidades de oxigénio locais e globais.

Assim, há uma tendência para uma troca rápida e auto-propagante para taxas de respiração superiores e menores concentrações de DO_2 em todo o tanque. Esta progressão apenas cessará se houver (por meio de aumento da força motriz de oxigénio à medida que a concentração de DO_2 diminui) suficiente capacidade de transferência de oxigénio residual para suportar a superior taxa de utilização de oxigénio que acompanha a respiração ineficiente. Como é desejável utilizar completamente a capacidade máxima do fermentador para transferir oxigénio, qualquer excesso de capacidade disponível sob a operação normal não será provavelmente suficiente e a concentração de DO_2 em todo o vaso será conduzida para zero.

A presente invenção emprega os meios necessários para superar a tendência da operação para perder eficiência em resultado desta troca auto-propagante.

Obtiveram-se dados reveladores por modificação do fermentador grande de forma a seguir o nível de DO_2 tanto no fundo como no topo do vaso. Utilizou-se um fermentador de 10 L modificado para replicar as instabilidades de DO_2 no fermentador grande. As mutações nos complexos de citocromo-oxidase foram utilizadas para confirmar a troca entre as vias de respiração como a origem biológica das instabilidades de DO_2. Os hospedeiros mutados foram também avaliados quanto à sua adequabilidade para produzir proteínas recombinantes

heterólogas. Surpreendentemente, o mutante de citocromo-o-oxidase provou-se superior ao mutante de citocromo-d-oxidase e produziu quantidades equivalentes do produto em comparação com o hospedeiro isogénico não mutado de comparação no fermentador de 10 litros não modificado.

EXEMPLO I

Identificação do Problema de Instabilidade de DO_2 num Fermentador de 1000 L

i. Construção da célula hospedeira da estirpe 27C7

O hospedeiro utilizado para produzir IGF-I humano recombinante na fermentação descrita neste exemplo foi um derivado de *E. coli* W3110, designado 27C7. O genótipo completo de 27C7 é *tonA*Δ *ptr3 phoA*Δ*E15* Δ*(argF-lac)169 ompT*Δ *degP41kan*^{r}. A derivação da estirpe 27C7 está diagramatizada na Figura 2 e está descrita adiante. A estirpe 27C7 foi depositada em 30 de Outubro, 1991, na American Type Culture Collection como ATCC N°. 55 244.

A estirpe 27C7 foi construída em vários passos utilizando técnicas que envolvem transduções com fago P1kc, derivado de P1 (J. Miller, *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972)), e genéticas de transposões [Kleckner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 116: 125-159 (1977)]. O hospedeiro de partida utilizado foi *E. coli* K12 W3110, que é uma estirpe K12 que é *F*-, λ- [Bachmann, *Bact. Rev.*, 36: 525-557 (1972); Bachman, "Derivatives and Genotypes of Some Mutant Derivatives of *Escherichia coli* K-12", p. 1190-1219, em F.C. Niedhardt *et al.*, ed., Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology, vol.2, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1987)].

Primeiro, o gene *tonA* (*fhuA*) [Kadner *et al.*, *J. Bact.*, 143: 256-264 (1980), Bachmann, *Microbiol. Rev.*, 47: 180-230 (1983), Bachman, "Linkage Map of Escherichia coli K-12", 7ª edição, p. 807-876, em F.C. Niedhardt *et al.*, ed., "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Vol. 2, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987] foi eliminado de W3110 através da

inserção e subsequente excisão imprecisa de um transposão *Tn10* no gene *tonA*. Esta construção está diagramatizada nas Fig. 3B e 4.

No primeiro passo deste procedimento, a *E. coli* W3110 foi transduzida com λ::*Tn10* para gerar um conjunto com *Tn10* de células *E. coli* W3110 [Kleckner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, *supra*].

O conjunto de *E. coli* W3110::*Tn10* foi crescido em caldo L a 37°C até uma densidade celular de cerca de 1 x 10^9/ml. Centrifugou-se um total de 0,5 ml da cultura e ressuspendeu-se a pelete em 0,2 ml de um lisado de λ*phi80* contendo 7,0 x 10^9 pfu. Deixou-se o fago adsorver durante 30 minutos a 37°C. Espalhou-se então a suspensão sobre placas de EMB suplementado com tetraciclina (15 μg/ml). Após incubação durante a noite a 37°C, reuniram-se as colónias em 3 ml de caldo L, cresceram-se durante a noite a 37°C, lavaram-se duas vezes, e ressuspenderam-se em caldo L. Foi feito um lisado com bacteriófago P1kc nesta cultura [Miller, J.H., *Experiments in Molecular Biology*, *supra*, página 304].

A *E. coli* AT982 (n°. 4546, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, Conn.) foi transduzida para resistência a tetraciclina com este lisado de P1kc. Os transdutantes foram seleccionados em placas de caldo L suplementado com tetraciclina (15 μg/ml) e 40 μg/ml de ácido diaminopimélico (dap). Os transdutantes resultantes foram rastreados quanto a resistência a tetraciclina e a regeneração do gene *dap* (*dap*$^+$, *tet*^{R}). Os transdutantes com o genótipo dap$^+$, tet^R foram então testados quanto a resistência a λ*phi80*.

Foram então feitos lisados de P1kc em várias estirpes resistentes a λ*phi80*, *dap*$^+$, *tet*^{R}. Os lisados foram utilizados para transduzir *E. coli* W3110 para resistência a tetraciclina. Os transdutantes foram rastreados e seleccionados quanto a resistência a λ*phi80*.

Seleccionaram-se os isolados sensíveis a tetraciclina a partir dos transdutantes W3110 *tonA*::*Tn10*-λ*phi80*R. [Maloy e Nunn, *J. Bacteriol.*, 145: 1110 (1981)]. Estes isolados foram

verificados quanto a resistência a λ*phi80* e sensibilidade a tetraciclina após purificação de colónias individuais.

Isolou-se o ADN de vários mutantes sensíveis a tetraciclina e resistentes a λ*phi80* e digeriu-se com *Sst*II. O ADN digerido com *Sst*II foi caracterizado através do procedimento *Southern blot* utilizando ADN de λ::*Tn10* marcado radioactivamente e digerido com *Sst*II como sonda para determinar se o *Tn10* tinha sido excisado [Davis *et al.*, Advanced Bacterial Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980)]. Um dos isolados sensíveis a tetraciclina mostrou ter perdido duas das bandas de hibridação com *Tn10* em comparação com a hibridação entre ADN do λ::*Tn10* e o progenitor W3110 *tonA*::*Tn10*λ*phi80R*. Uma terceira banda de hibridação tinha uma mobilidade alterada, indicando que tinha ocorrido uma deleção causada pela excisão imprecisa de *Tn10*.

A electroforese em gel de SDS das preparações de membrana externa da estirpe com uma excisão imprecisa de *Tn10* revelou que a banda que se assumiu como sendo a proteína codificada por *tonA* tinha uma mobilidade electroforética alterada em comparação com a proteína do tipo selvagem codificada pelo gene *tonA*. A proteína resultante não era funcional como uma proteína receptora do fago λ*phi80*. Uma segunda estirpe independente que tinha também sofrido excisão imprecisa de *Tn10* não apresentou proteína codificada por *tonA* no gel de SDS.

Nenhuma destas estirpes demonstrou reversão para resistência a tetraciclina ou para susceptibilidade a λ*phi80*, indicando que não houve excisão imprecisa da totalidade ou parte do transposão *Tn10* juntamente com uma deleção parcial ou completa do gene *tonA*. Assim, a proteína codificada pelo gene *tonA* (PM 78 000) foi eliminada da membrana externa, tornando a estirpe W3110 *tonA* resistente a vários bacteriófagos. A estirpe resultante, designada 1A2, é resistente aos bacteriófagos T1 e ϕ80.

O gene *ptr3* [Cheng *et al.*, *J. Bacteriol.*, 140: 125-130 (1979)] foi introduzido na estirpe 1A2 como se segue. Primeiro, a mutação *thyA8* foi isolada em 1A2 através de

selecção por resistência a trimetoprim para formar a estirpe 9E1. Depois, transportou-se o *locus argA81*::*tn*10 de 9D9 (obtido de B. Bachman, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, Conn.) para 9E1 por transdução com fago P1kc para formar 9E3. O *locus ptr3* está entre *thyA8* e *argA81*. A transdução com fago P1 crescido num mutante de *ptr3* [9D7, *J. Bact.*, 140: 125 (1979)] resultou na introdução da mutação *ptr3* simultaneamente com a conversão de *thyA8* e *argA81*::*Tn10* para *loci* do tipo selvagem. Esta estirpe, designada 9E4, não tem a protease III periplasmática. A conclusão de que a mutação *ptr3* está incluída em 9E4 é suportada pela acumulação fortemente melhorada de IGF-I na estirpe resultante.

Depois, mais duas mutações de deleção, *phoA*Δ*E15* [Sarthy *et al* , *J. Bacteriol.* 145: 288-292 (1981)] e Δ*(argF-lac)169* [Schweizer e Boos, *Mol. Gen. Genet.*, 192: 293-294 (1983)], foram transferidas simultaneamente para 9E4 através de ligação genética a um transposão de resistência a canamicina inserido num gene biossintético de prolina (*proC*::*Tn5*), contido em 6D3, obtido do Professor Barry Wanner, Purdue University. Esta construção está diagramatizada na Figura 3B.

O transposão foi eliminado através da selecção de um isolado prototrófico (*pro*$^{+}$) em placas de ágar mínimo de glucose após transdução de P1 com 1A2. A introdução da mutação *phoA* elimina a expressão de fosfatase alcalina e foi reconhecida como transdutantes que formam colónias brancas em placas de ágar mínimo de glucose com fosfato 0,2 mM e fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo a 20 mg/l. Do mesmo modo, a mutação Δ*(argF-lac)169* provoca a perda da enzima beta-galactosidase (um fenótipo *lac*-) e resulta em células que formam colónias brancas em placas de ágar de lactose MacComkey-1%. A estirpe resultante foi designada por 27A7.

A deleção de *ompT* [Earhart *et al.*, *FEBS Microbiol. Lett.*, 6: 277-280 (1979)] foi introduzida em 27A7 por co-transdução com P1. Deverá notar-se que esta deleção de *ompT* se estende para a vizinhança do grupo de genes *ent* que codifica para a fixação de proteínas para colicinas B e D. Primeiro, uma inserção de *Tn10* ligado no gene *purE* foi inserida próximo da deleção de *ompT* utilizando técnicas convencionais de transdução [intermediários 3E9 (estirpe similar obtida do Dr.

Carol Gross, University of Wisconsin), 16B2, 25C9 (*J. Bacter.*, 153: 1104-11G6 (1983)), e 25D3]. Depois, *purE*::*Tn10* foi transduzida para 27A7. Finalmente, esta estirpe foi transduzida para prototrofia para purina para remover o transposão. A manutenção do genótipo *ompT*Δ foi confirmada por resistência a colicina B na estirpe resultante, que é designada por 27C6. Esta estirpe não tem a protease VII da membrana externa.

Finalmente, uma mutação adicional da protease periplasmática, *degP41kan*^{r} [Strauch *et al.*, *J. Bacteriol.*, 171: 2689-2696 (1989); Harvard Medical School] foi transduzida na estirpe 27C6 por técnicas *standard*. Esta mutação foi construída *in vitro* substituindo uma secção do gene *degP* com o gene da canamicina. Este não é um transposão mas permite a selecção da deleção utilizando a resistência a canamicina.

Esta estirpe final, 27C7, tem as seguintes características: é resistente a fagos, não tem três proteases, não consegue crescer em lactose, e não consegue produzir fosfatase alcalina após esgotamento de fosfato nos meios, as mesmas condições que induzem a produção de rhIGF-I.

ii. Descrição/Construção do Plasmídeo de Expressão de IGF-I, pLS32Tsc

O plasmídeo de secreção pLS32Tsc utilizado para transformar a estirpe 27C7 contém o gene de IGF-I. As sequências de transcrição e tradução necessárias para a expressão do gene de IGF-I em *E. coli* são proporcionadas pelo promotor da fosfatase alcalina e pela sequência de Shine-Dalgarno *trp*. O terminador da transcrição lambda t_0 está situado adjacente ao codão de terminação de IGF-I. A secreção da proteína a partir do citoplasma é dirigida pela sequência de sinal *lamB* ou alternativamente pela sequência de sinal STII. A maioria do rhIGF-I encontra-se no espaço periplasmático da célula. O plasmídeo pLS32Tsc confere resistência a tetraciclina ao hospedeiro transformado.

O plasmídeo pLS32Tsc foi construído em vários passos utilizando como plasmídeos intermediários pLS32, pAPlamB, pLS32lamB, pLS33lamB e pLS33Tsc.

Passo 1: pLS32

O plasmídeo pLS32 resulta na fusão da sequência de codificação de IGF-I com a sequência de sinal da enterotoxina II estável ao calor (STII) e foi preparado através da ligação mútua de quatro fragmentos de ADN como mostrado em Figura 5. O primeiro destes foi o vector pTF2A12 [Paborsky *et al.*, *Biochemistry*, 28: 8072-8077 (1989)] do qual o pequeno fragmento *Nsi*I-*Bam*HI contendo o gene do factor tissular tinha sido removido. A sequência de sinal STII é descrita por Picken *et al.*, *Infect. Immun.*, 42: 269-275 (1983).

O segundo fragmento era uma dúplice sintética de 55 pb que codifica os primeiros 18 aminoácidos do IGF-I maduro. Esta dúplice possui a sequência seguinte:

5'- GGTCCCGAAACTCTGTGCGGTGCTGAACTGGTTGACGCTCTGCAGTTTGTTTGCG-3'
3'-ACGTCCAGGGCTTTGAGACACGCCACGACTTGACCAACTGCGAGACGTCAAACAAACGCCACTG-5'

(SEQ ID NO: 1 e 2, respectivamente)

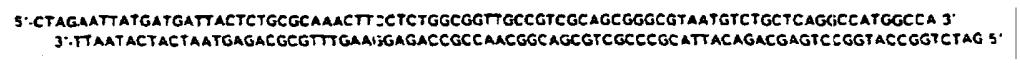
A terceira porção na ligação era um fragmento *BstE*II-*Hind*III de 154 pb de pK1ZZIGF-I que codifica os restantes aminoácidos 19-70 de IGF-I. O pK1ZZIGF-I é um plasmídeo resistente a canamicina contendo um promotor *lac* ligado a um promotor de Proteína A ligado a um sinal de Proteína A, ligado a duas regiões de consenso Z de Proteína A que se liga a IgG e segrega proteínas, fundido utilizando dois codões que codificam uma interface Asn-Gly a um gene sintético de IGF-I e também contendo uma região F para obter um elevado número de cópias. Este plasmídeo é semelhante a pZZ-IGF-I mostrado na Fig. 6 é descrito em EP 230 869 publicado em 5 de Agosto, 1987, onde o gene da ampicilina está substituído por um gene de canamicina.

O último fragmento era um fragmento *Hind*III-*Bam*HI de 291 pb do plasmídeo pLS8. Este último fragmento é simplesmente a sequência de codificação para o início do gene da tetraciclina de pBR322 [Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 43: 77-90 (1978)] em que um local de restrição *Hind*III foi introduzido imediatamente a montante do codão de iniciação de metionina.

O plasmídeo resultante, pLS32, expressa e segrega eficientemente rhIGF-I para o meio. Realizaram-se os seguintes dois passos de construção para substituir a sequência de sinal STII pela sequência de sinal *lamB*, o que melhora o rendimento do produto.

Passo 2: pAPlamB

O plasmídeo pAPlamB foi construído como se mostra na Figura 6 através da ligação de dois fragmentos de ADN, e resulta na substituição da sequência de codificação de sinal *lamB* a jusante do promotor AP e da sequência de Shine-Dalgarno *trp*. Foi incluído na ligação o vector pRA1 em que o pequeno fragmento *Xba*I-*Bgl*II tinha sido removido. Este plasmídeo é um derivado de phGH1 [Chang *et al.*, *Gene*, 55: 189-196 (1987)], em que este último plasmídeo contém o promotor AP, o sinal STII, e ADN que codifica hGH. O pRA1 difere do phGH1 porque contém ADN que codifica a cadeia A da relaxina (cuja sequência é descrita em Pat. N°. U.S. 4 758 516) em vez de hGH e contém um local de restrição *Bgl*II conveniente a jusante do promotor e do local de ligação ao ribossoma. A segunda porção na ligação era uma dúplice de ADN sintética de 80 pb com a seguinte sequência, que codifica a sequência de sinal *lamB*, que foi descrita por Clement e Hofnung, *Cell*, 27: 507-514 (1981):



(SEQ ID NO: 3 e 4, respectivamente)

Passo 3: pLS32lamB

O plasmídeo pLS32lamB resulta na fusão da sequência de sinal *lamB* com a região de codificação de IGF-I e foi construída como mostrado na Figura 7 através da ligação de três fragmentos de ADN. O primeiro destes foi o vector pLS32 no qual o pequeno fragmento *Xba*I-*BstE*II tinha sido removido. O segundo foi um fragmento *Xba*I-*Eae*I de 75 pb de pAPlamB que codifica a sequência de sinal *lamB*. O terceiro foi uma dúplice de ADN sintética de 55 pb que codifica os primeiros 18 aminoácidos do IGF-I maduro, e possuindo a seguinte sequência:

5'-GGCCGGTCCCGAAACTCTGTGCGGTGCTGAACTGGTTGACGCTCTGCAGTTTGTTTGCG-3'
3'-CCAGGGCTTTGAGACACGCCACGACTTGACCAACTGCGAGACGTCAAACAAACGCCACTG-5'

(SEQ ID NO: 5 e 6, respectivamente)

Os passos seguintes introduzem no plasmídeo o terminador de transcrição. Estas alterações no plasmídeo resultaram num rendimento melhorado do produto.

Passo 4: pLS33lamB

O plasmídeo pLS33lamB é um intermediário na preparação de pLS32Tsc e foi construído como se mostra na Figura 8 através da ligação mútua de três fragmentos de ADN. O primeiro destes foi o vector pLS32 em que o pequeno fragmento *Xba*I-*BstE*II tinha sido removido. O segundo foi um fragmento *Xba*I-*Eae*I de 75 pb de pAPlamB que codifica a sequência de sinal *lamB*. O terceiro foi uma dúplice de ADN sintética de 46 pb com a seguinte sequência:

5'-GGCCACTCTGTGCGGTGCTGAACTGGTTGACGCTCTGCAGTTTGTTTGCG-3'
3'-TGAGACACGCCACGACTTGACCAACTGCGAGACGTCAAACAAACGCCACTG-5'

(SEQ ID NO: 7 e 8, respectivamente)

A sequência anterior codifica os aminoácidos 4-18 de IGF-I maduro.

Passo 5: pLS33Tsc

O plasmídeo pLS33Tsc resulta na colocação do terminador da transcrição lambda t_0 imediatamente a jusante da sequência de codificação de IGF-I. Três fragmentos de ADN foram ligados mutuamente como mostrado na Figura 9 para construir este plasmídeo. A primeira porção foi o vector pLS18 no qual o pequeno fragmento *Xba*I-*Bam*HI tinha sido removido. O pLS18 é um derivado de phGH1 [Chang *et al.*, *supra*] que contém ADN que codifica ADNase humana (como descrito em WO 90/07572 publicado em 12 de Julho, 1990) em vez de hGH. O phGH1 pode ser utilizado para gerar o mesmo fragmento. A segunda parte da ligação foi um fragmento *Xba*I-*Hind*III de 288 pb de pLS33lamB em que o local de restrição *Hind*III tinha sido tornado de extremidades lisas por tratamento com ADN-polimerase I (Klenow). A terceira parte da ligação foi um fragmento *Stu*I-

*Bam*HI de 412 pb do plasmídeo pdH108-4. Este fragmento contém o terminador da transcrição lambda t_0 [Scholtissek e Grosse, *Nuc. Acids Res.*, 15: 3185 (1987)] e os pares de bases 2-375 de pBR322 [Sutcliffe, *supra*], em que os pares de bases 2-375 estão a jusante ou a 3' do terminador da transcrição. A sequência da região terminadora deste fragmente é a seguinte:

5'-CCTAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGTTAA-3'
3'-GGATTGCGAGCCAACGGCGGCCCGCAAAAAATAACAATT-5'

(SEQ ID NO: 9 e 10, respectivamente)

Passo 6: pLS32Tsc

O plasmídeo final pLS32Tsc foi construído como mostrado na Figura 10 através da ligação mútua de dois fragmentos de ADN. O primeiro deles era o vector pLS33Tsc do qual o pequeno fragmento *Eco*RI-*BstE*II tinha sido removido. O segundo era um fragmento *Eco*RI-*BstE*II de 550 pb de pLS32lamB contendo o promotor AP, a Shine-Dalgarno *trp*, e a sequência de codificação para a sequência de sinal *lamB* fundida com os primeiros 18 aminoácidos de IGF-I. O plasmídeo resultante foi analisado por digestão com endonucleases de restrição. A totalidade do promotor e sequência de codificação foi verificada por sequenciação de ADN, sendo a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 11) e a sequência de aminoácidos da proteína de fusão de *lamB* e IGF-I (SEQ ID NO: 12) dadas na Figura 11.

iii. Fermentação e Procedimento de Recuperação

A. Transformação

Células *E. coli* 27C7 competentes foram transformadas com pLS32Tsc através de técnicas *standard* de transformação. Os transformantes foram seleccionados e purificados em placas de LB contendo 20 mg/L de tetraciclina. Este meio tinha a seguinte composição: 10 g/L de Bacto-Tryptone, 5 g/L de extracto de levedura, 10 g/L de cloreto de sódio e 20 mg/L de tetraciclina-HCl.

Utilizou-se uma colónia transformada para inocular caldo LB estéril contendo 20 mg/L de tetraciclina. O balão de cultura foi incubado a 35°-39C, até a densidade óptica a 550 nm atingir aproximadamente 1,0. Adicionou-se DMSO estéril à cultura para obter uma concentração final de DMSO de

10% (v/v). Distribuíram-se alíquotas de 1-2 mL por frascos estéreis e armazenou-se a -60°C ou inferior.

B. Inóculo de Fermentação

Preparou-se um inóculo num fermentador de 10 L inoculando primeiro um balão de agitação de dois litros contendo aproximadamente 500 ml de meio LB estéril contendo tetraciclina com o frasco de cultura recentemente descongelada de 1-2 ml atrás descrito. Este balão foi incubado a 35°-39°C durante 8 horas e transferido para um fermentador de 10 litros contendo o meio de produção descrito na Secção D deste Exemplo. O inóculo do fermentador de 10 litros foi incubado a 35°-39°C a 50-200 rpm durante cerca de 5-8 horas, *i.e.*, cresceu até uma DO de 25. O inóculo foi então transferido assepticamente para o vaso de fermentação de 1000 L da Figura 12.

C. Aparelho de Fermentação

A figura 12 apresenta um diagrama do sistema de fermentação utilizado para a produção de produtos recombinantes derivados de bactérias à escala de 1000 L. O vaso tem aproximadamente 1500 L de volume total, com um volume de trabalho nominal (com espaço de cabeça) de 1000 L. O vaso está equipado com três impulsores do tipo de Rushton montados num veio vertical com um motor de topo normalmente operado a 150-300 rpm. Utiliza-se um aspersor de ar em anel para introduzir ar no fundo do fermentador a aproximadamente 1000 litros *standard* por minuto. Uma sonda de DO_2 montada na parede do vaso próximo do impulsor do fundo mede a concentração de oxigénio dissolvido no líquido (e portanto acessível ao organismo). Esse sinal é enviado a um computador de monitoração e controlo, que depois regula a taxa de alimentação de glucose no fermentador.

Nesta configuração, a glucose é alimentada no topo do vaso para simplificar a esterilização da linha de alimentação de glucose. Não é mostrada uma linha de alimentação no topo do vaso que é utilizada para adicionar NH_4OH conforme necessário para controlar o pH do caldo. Também não se mostra uma outra linha de alimentação no topo do vaso, que pode ser utilizada para uma alimentação lenta de nutrientes complexos.

D. Procedimento da Fermentação

O vaso de 1000 L inicialmente continha 600-800 litros de meio de fermentação composto como se segue:

Ingrediente	Quantidade/Litro
glucose*	250-350 g
sulfato de amónio	2-6 g
hidróxido de amónio	o necessário para controlar pH 7,1 a 7,5
fosfato de sódio, di-hidrato monobásico	1-2 g
fosfato de potássio, dibásico	2-3 g
citrato de sódio, di-hidrato	0,5-1,5 g
cloreto de potássio	1-2 g
Pluronic Polyol L61 a 25%	0,2 ml no início e o necessário para controlar a espuma
sulfato de magnésio, hepta-hidrato	1-3 g
tetraciclina HCl	5-20 mg
extracto de levedura**	5-15 g
NZ amina AS**	5-20 g
isoleucina	0-10 g
cloreto férrico, hepta-hidrato	10-30 mg
sulfato de zinco, hepta-hidrato	2-5 mg
cloreto de cobalto, hexa-hidrato	2-5 mg
molibdato de sódio, di-hidrato	2-5 mg
sulfato cúprico, penta-hidrato	2-5 mg
Ácido bórico	0,5-2 mg
sulfato de manganês, mono-hidrato	1-3 mg

* adicionaram-se 1-5 g/L de glucose à cultura inicialmente. O restante foi alimentado à cultura ao longo do decorrer da fermentação.
** o extracto de levedura e a NZ amina AS podem ser adicionados inicialmente e/ou alimentados ao longo da fermentação.

O processo de fermentação foi realizado a 35°-39°C a pH 7,1-7,5. A velocidade de agitação foi regulada para 150-300 rpm e a taxa de arejamento para 0,7-1,5 volumes de ar por volume de cultura por minuto. A produção de IGF-I ocorreu após o fosfato no meio se ter esgotado.

Um algoritmo de computador utilizou um aumento na leitura da sonda de DO_2 para sentir quando a carga inicial de glucose estava esgotada e depois alimentar uma solução a 50% de glucose para manter o organismo a uma taxa de crescimento próxima da sua taxa de crescimento máxima até a leitura de DO_2 ter descido para 30% de saturação de ar. Depois o computador regulou a alimentação de glucose para manter a leitura de DO_2

a 30% utilizando um algoritmo de controlo proporcional integral (PI) *standard*.

Após aproximadamente 12 horas de incubação, a carga inicial de fosfato estava esgotada. A taxa de alimentação de glucose foi diminuída pelo computador pois estava a ser utilizada menos glucose pela síntese das célula e portanto uma menor taxa de alimentação de glucose produzia a taxa de consumo de oxigénio que correspondia à taxa de transferência de oxigénio e mantinha a DO_2 a 30%.

iv. Resultados

A figura 13 apresenta a taxa de bombagem de glucose (Fig. 13A) e a leitura de DO_2 (Fig. 13B) em função do tempo para a fermentação de 1000 L deste exemplo que produz IGF-I. Às 12 horas, o computador estava a controlar a 30% de DO_2, mas pouco depois, o fosfato esgotou e a taxa de alimentação de glucose começou a diminuir por acção do algoritmo de controlo. Como se pode observar, contudo, esta transição despoletou flutuações violentas na concentração de DO_2 que o computador não foi capaz de controlar. Mesmo após a taxa de alimentação de glucose ter diminuído, as instabilidades continuaram. A aproximadamente 16 horas, a taxa de alimentação de glucose foi colocada sob controlo manual para manter uma taxa de alimentação constante. A concentração de DO_2 permaneceu aproximadamente constante, diminuindo muito lentamente até atingir aproximadamente 28%. Neste ponto, houve um declínio abrupto da concentração de DO_2.

Por exame do período de tempo total, pareceu haver um padrão comum no registo da DO_2. Isto é apresentado com maior detalhe na Figura 14, que apresenta as leituras de DO_2 e taxas de alimentação de glucose registadas a intervalos de um minuto. Mesmo com uma taxa de alimentação de glucose constante, a concentração de DO_2 caiu drasticamente após diminuir lentamente para aproximadamente 25%. Em dois minutos ou menos, a concentração de DO_2 caiu de 25% para zero.

O fermentador e o seu equipamento de suporte foram examinados quanto a deficiências de funcionamento que pudessem provocar estas observações. Não se encontrou nenhuma.

EXEMPLO II

Utilização de duas sondas de DO_2 e uma localização de alimentação alternativa para estudar as instabilidades de DO_2

A figura 15 apresenta um diagrama do fermentador de 1000 L conforme modificado para estudar adicionalmente as instabilidades de DO_2. Montou-se uma sonda de DO_2 próximo do topo do vaso de modo a que ficasse imersa no meio de fermentação no momento do esgotamento do fosfato. A linha de alimentação de glucose foi modificada de modo a que o ponto de entrada de glucose pudesse ser alterado durante a fermentação do topo para o fundo do fermentador.

A fermentação foi conduzida como descrito no Exemplo I excepto controlando a DO_2 a 40% para evitar as quedas bruscas de DO_2. A glucose foi alimentada no topo do vaso. Após o esgotamento do fosfato, deixou-se que a taxa de alimentação de glucose fosse para o seu novo valor de estado pseudo-estacionário, e a taxa de alimentação de glucose foi novamente colocada sob controlo manual. Para testar a indutibilidade reprodutível da instabilidade de DO_2, a taxa de alimentação de glucose foi então aumentada lentamente em pequenos incrementos até as leituras da sonda de DO_2 diminuírem até zero. A taxa de alimentação de glucose foi então aumentada para recuperar um nível de DO_2 positivo, controlável.

Para determinar se o ponto de adição de glucose influenciou a resposta da DO_2 aos aumentos da alimentação de glucose, conduziu-se uma segunda fase da experiência. O ponto de alimentação de glucose foi trocado para o fundo do tanque e o controlo da DO_2 foi restabelecido a 40%. A taxa de alimentação de glucose foi novamente aumentada lentamente por incrementos até a DO_2 atingir zero. A taxa de alimentação de glucose foi novamente diminuída de modo a recuperar o nível de DO_2. Toda esta sequência foi então repetida.

A figura 16 mostra os resultados obtidos do conjunto de ciclos repetidos. Os resultados do primeiro conjunto de ciclos foram similares, sugerindo indutibilidade reprodutível da instabilidade de DO_2. Primeiro, a DO_2 foi levada sob controlo a um ponto de regulação de 40% (de acordo com a sonda de DO_2

do fundo) com a alimentação de glucose no topo do fermentador. A taxa de alimentação de glucose foi depois colocada sob controlo manual e a taxa de alimentação foi aumentada 8%.

Num reactor homogéneo, esta sequência de eventos eliciaria um aumento de 8% na taxa de captação de oxigénio, que por sua vez requereria um aumento de 8% de força motriz de oxigénio para transferir o oxigénio necessário da fase gasosa para a fase líquida. Como estava a ser aplicada uma sobrepressão de 1 bar no fermentador e como uma cabeça de líquido hidrostática exerce uma pressão adicional estimada de 0,2 bar, um cálculo simples sugere que um aumento de 8% na força motriz da concentração de oxigénio seria obtido através de uma diminuição na concentração de DO_2 de 40% para aproximadamente 26%.

A leitura de DO_2 no fundo diminui de facto de 40% para aproximadamente 25% quando se esperaria um novo equilíbrio. Contudo, neste ponto, a leitura de DO_2 no fundo caiu para zero. Isto reproduziu a observação feita na operação descrita no Exemplo I. É importante notar que em quase toda a sequência, a leitura da sonda de DO_2 do topo era mais de 20% inferior à leitura da sonda do fundo. Isto indica uma heterogeneidade significativa nas concentrações de DO_2 em todo o volume do caldo de fermentação. Durante aproximadamente 15 minutos após a taxa de alimentação de glucose ter aumentado, a leitura da sonda do topo diminuiu aproximadamente à mesma velocidade que a leitura da sonda do fundo. Foi quando a leitura da sonda do topo atingiu zero que o declínio abrupto na leitura da sonda do fundo foi despoletado.

Quando a glucose foi alimentada no fundo do vaso, a concordância entre as leituras das sondas do fundo e do topo sugeriu muito menos heterogeneidade de DO_2. Novamente, foi estabelecido o controlo a 40% de DO_2 de acordo com a sonda de DO_2 do fundo e a taxa de alimentação de glucose foi aumentada em 8%. Neste momento foi atingido um novo estado estacionário a aproximadamente a leitura prevista de DO_2. Quando a taxa de alimentação de glucose foi aumentada mais 8%, as leituras de DO_2 diminuíram novamente e estabilizaram aproximadamente no valor previsto. Foi estabelecida uma operação aparentemente estável a aproximadamente 10% de DO_2. Finalmente, um aumento adicional de 5% na taxa de alimentação de glucose conduziu as

leituras de DO_2 para zero como seria de prever pela utilização de oxigénio e pelos cálculos da força motriz do oxigénio.

Estes resultados sugerem que as instabilidades de DO_2 representadas na Figura 13 podem ser prevenidas proporcionando concentrações homogéneas de oxigénio dissolvido em todo o vaso. Neste fermentador em particular, a alimentação de glucose no fundo do fermentador melhorou significativamente a homogeneidade da DO_2. Em fermentadores maiores e/ou mais complexos (por exemplo, fermentadores com serpentinas de arrefecimento), a homogeneidade da DO_2 será muito mais difícil de conseguir.

Os resultados sugerem também que os eventos de instabilidade de DO_2 (observados enquanto se monitoriza a DO_2 no fundo do fermentador) são coincidentes com o esgotamento da concentração de DO_2 mensurável no topo do caldo de fermentação. Estes resultados sugerem um fenómeno hidrodinâmico complicado e muito rápido ou um súbito evento biológico despoletado por concentrações muito baixas de DO_2 que aumentam a taxa de utilização global de oxigénio.

EXEMPLO III

Reprodução das instabilidades de DO2 num fermentador de 10 L modificado

Embora os resultados do Exemplo II sejam bastante informativos, as experiências à escala dos 1000 L são difíceis e dispendiosas. Portanto, desejou-se desenvolver métodos que produzem os fenómenos de instabilidade de DO2 numa escala de bancada, um fermentador com um volume de trabalho de 10 L.

i. Fermentador

A figura 1 mostra um diagrama do fermentador de 10 L modificado aqui utilizado. Normalmente, o fermentador utilizaria três impulsores do tipo de Rushton. Nesta configuração modificada, o impulsor de topo é removido e o fermentador é operado com um volume de líquido relativamente elevado. Isto produz uma grande região de mistura fraca no topo do caldo de fermentação. A glucose é alimentada no topo do fermentador ***17*** para imitar a configuração de larga escala e para contribuir adicionalmente com heterogeneidade de DO_2.

Finalmente, é instalada uma sonda redox ***15*** em adição à sonda de DO_2 polarográfica normal ***13***. Como se irá observar, esta proporciona informação sobre a cultura quando a leitura da sonda de DO_2 é nula ou está próxima de zero.

ii. Organismo hospedeiro

O organismo hospedeiro utilizado foi o mesmo que se utilizou no Exemplo I (27C7) excepto possuindo uma deleção de *rbs*7 (utilização de ribose menos) e possuindo um *locus ilvG* restabelecido. Ambos os marcadores foram introduzidos por transdução com P1. O organismo é designado 37D6.

iii. Descrição/Construção do Plasmídeo de Expressão de IGF-I, pBKIGF-2B

No plasmídeo que expressa IGF-I, pBKIGF-2B, as sequências de transcrição e de tradução necessárias para a expressão do gene de IGF-I em *E. coli* são proporcionadas pelo promotor da fosfatase alcalina e pela sequência de Shine-Dalgarno *trp*. O terminador da transcrição lambda t_0 está situado adjacente ao codão de terminação de IGF-I. A secreção da proteína a partir do citoplasma é dirigida pela sequência de sinal *lamB* ou alternativamente pela sequência de sinal STII. A maioria do rhIGF-I encontra-se no espaço periplasmático da célula. O plasmídeo pBKIGF-2B confere resistência a tetraciclina ao hospedeiro transformado.

O plasmídeo pBKIGF-2B foi construído em vários passos utilizando como plasmídeos intermediários pLS32Tsc, pLBIGFTsc, pLS33Tsc e pRanTsc.

Passo 1: pLS32Tsc

Este plasmídeo foi construído como descrito no Exemplo I.

Passo 2: pLBIGFTsc

Passo a: pLamBIGF

Para a primeira parte da ligação, isolou-se o fragmento vector *Eco*RI-*Pst*I de pBR322. Para a segunda parte da ligação,

isolou-se um fragmento *Pst*I-*Nco*I de 1244 pb de pAPLamB. Para a terceira parte da ligação, isolou-se o fragmento *Hae*II-*Eco*RI de 196 pb contendo o gene de IGF-I excepto a extremidade 5' inicial, do plasmídeo p200. O p200 é um plasmídeo derivado de pBR322 possuindo, na ordem de 5' para 3', o promotor da quelatina, a sequência de sinal MF alfa I prepro, ADN que codifica IGF-I maduro e o terminador de 2-micra. Contém a origem de replicação de ColE1 para bactérias e a origem de 2-micra para leveduras. Um diagrama das enzimas de restrição do plasmídeo de p200 é proporcionado na Figura 17. A sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 13) do fragmento de p200 de *Eco*RI (partindo da posição 1149) até ao *Eco*RI (partindo da posição 1628), contendo o gene de IGF-I e MF alfa I prepro, é proporcionado na figura 18. Os locais de restrição *Hae*II, *Pst*I, *Bam*HI e *Sal*I que estão também no diagrama na figura 17 estão indicados na sequência com sublinhado. Foi preparada uma porção de ADN sintético que liga a sequência de sinal ao gene de IGF-I (*Nco*I a *Hae*II) possuindo a sequência seguinte:

5'-CATG GCC GGT CCG GAA ACT CTG TGC GGC GC (SEQ. ID NO. 14)

3'- CGG CCA GGC CTT TGA GAC ACG C (SEQ. ID NO. 15).

Os três fragmentos plasmídicos e o ADN sintético foram ligados unas aos outros para formar pLamBIGF, como mostrado na figura 19.

Passo b: pLBIGFTsc

Isolou-se o fragmento vector *Xba*I-*Bam*HI de pLS18 como primeiro fragmento de ligação. A segunda parte da ligação foi um fragmento *Stu*I-*Bam*HI de 412 pb do plasmídeo pdH108-4 atrás descrito. A terceira parte da ligação foi preparada através de uma digestão com *Eco*RI de pLamBIGF, seguida pelo tratamento com fragmento de Klenow de ADN-polimerase, seguido por uma digestão com *Xba*I. Isolou-se o fragmento de 302 pb resultante. Estes três fragmentos foram ligados para obter pLBIGFTsc, como mostrado na figura 20.

Passo 3: pRanTsc

Isolou-se o fragmento vector *Xba*I-*Bam*HI de pLS18 como primeiro fragmento de ligação. A segunda parte da ligação foi

um fragmento *Stu*I-*Bam*HI de 412 pb do plasmídeo pdH108-4 atrás descrito. A terceira parte da ligação foi preparada a partir de pRANTES. O pRANTES é um plasmídeo baseado no pBR322 contendo um fragmento de um ligante *Xba*I seguido pelo sinal STII, seguido pelo ADNc que codifica RANTES [como publicado por Schall *et al.*, *J. Immunol.*, 141: 1018 (1988)], seguido pelo ligante *Bam*HI. O terceiro fragmento foi preparado por digestão de pRANTES com *Bam*HI, seguida por tratamento com fragmento de Klenow de ADN-polimerase, seguido por uma digestão com *Xba*I. Isolou-se o fragmento resultante de 303 pb. Estes três fragmentos foram ligados para obter pRanTsc, como mostrado na figura 21.

Passo 4: pBKIGF-2

Como mostrado na figura 22, o fragmento *Eco*RI-*Pst*I de 540 pb contendo o promotor da fosfatase alcalina, a sequência de sinal *lamB* e ADN que codifica os primeiros 15 aminoácidos de IGF-I, foi excisado a partir de pLS32Tsc. O fragmento *Pst*-*Bsp*1286I (~70 pb) contendo ADN que codifica os aminoácidos 16-38 de IGF-I foi excisado de pLBIGFTsc. O fragmento *Bsp*1286I-*Hind*III (~179 pb) contendo ADN que codifica os aminoácidos 39-70 de IGF-I, o terminador lambda e o promotor Tc, foi excisado de pLS33Tsc. Finalmente, o fragmento vector *Eco*RI-*Hind*III de ~4331 pb (baseado no pBR322) foi excisado a partir de pRanTsc. Estes quatro fragmentos foram ligados para obter pBKIGF-2, que contém o promotor AP, a sequência de sinal *lamB*, o ADN que codifica a totalidade da proteína IGF-I, o terminador de transcrição, o promotor Tc e os marcadores de resistência a tetraciclina e ampicilina.

Passo 5: pBKIGF-2A

Digeriu-se o pBKIGF-2 com *Pst*I e *Cla*I e isolou-se o fragmento de ~245 pb. Este contém os aminoácidos 16-70 de IGF-I e o terminador lambda T_o. Digeriu-se o pLBIGFTsc com *Nco*I e *Cla*I e isolou-se o fragmento vector. Este fragmento vector contém o promotor AP, o sinal *lamB* e o gene Tet^r. Estes dois fragmentos foram ligados a uma porção de ADN sintético que substitui a extremidade 5' do ADN de IGF-I desde *Nco*I até *Pst*I por codões derivados sinteticamente como se seguem:

5'-CATGGCC GGT CCC GAA ACT CTG TGC GGT GCT GAA CTG GTT GAC GCT CTG CA-3'
3'- CGG CCA GGG CTT TGA GAC ACG CCA CGA CTT GAC CAA CTG CGA G-5'

(SEQ ID NO: 16 e 17, respectivamente)

O plasmídeo resultante foi designado por pBKIGF-2A. A construção é mostrada na figura 23.

Passo 6: pLamBRan

Preparou-se este plasmídeo através de digestão do pLS33LamB com *Nco*I e *Bam*HI e isolou-se o fragmento vector. O pLS33LamB é um plasmídeo feito a partir de pBR122 no qual foi inserido o promotor AP, o sinal *lamB* e o gene de IGF-I. *Bam*HI corta na porção Tc do plasmídeo e *Nco*I corta na extremidade 5' do gene de IGF-I. O segundo fragmento foi gerado através de digestão de pRANTES com *Bsa*JI e *Bam*HI e isolamento do fragmento resultante de ~200 pb. O terceiro fragmento era uma porção de ADN sintético para ligar o gene de RANTES à sequência de sinal de *Nco*I a *Bsa*JI. Este ADN sintético possui a sequência:

*Nco*I *Bsa*JI
5'-CATGGCCTCCCCATATTC-3'
3'-CGGAGGGGTATAAGGAGC-5'

(SEQ ID NO: 18 e 19, respectivamente)

O vector resultante foi denominado pLamBRan, e a sua construção é mostrada na Figura 24.

Passo 7: pBKIGF-2B

A construção deste plasmídeo é mostrada na figura 25. Digeriu-se o pLamBRan com *Nco*I e *Sph*I e isolou-se o fragmento vector contendo o promotor e a sequência de sinal. Digeriu-se o pBKIGF-2 com *Dde*I e *Sph*I e isolou-se o fragmento de ~600 pb contendo o terminador de transcrição lambda e a extremidade 5' do gene Tet^R. Digeriu-se o pBKIGF-2A com *Nco*I e *Bsp*1286I e isolou-se o fragmento de ~110 pb contendo o ADN que codifica os aminoácidos 1-38 de IGF-I. Estes três fragmentos foram ligados uns aos outros com ADN sintético que codifica os

aminoácidos 39-70 de IGF-I para obter pBKIGF-2B. Este ligante sintético possui a sequência:

5'-TCGTCGTGCTCCC CAG ACT GGT ATT GTT GAC GAA TGC TGC TTT CGT TCT TGC GAC CTG CGT CGT CTG-3'
(SEQ. ID NO. 20)

3'-AGA ACG CTG GAC GCA GCA GAC CTT TAC ATA ACG CGA GGG GAC TTT GGG CGATTTAGACGAATCTTCGAGG-5'
(SEQ. ID NO. 21)

iv. Transformação e Fermentação

A estirpe 37D6 atrás descrita foi transformada com pBKIGF-2B utilizando técnicas *standard* de transformação. Depois, cresceu-se da mesma maneira que se descreveu no Exemplo I excepto que, após a cultura em 500 ml de meio LB ser utilizada para inocular o fermentador de 10 L, a fermentação foi conduzida como descrito para o fermentador de 1000 L. Em adição, os sais minerais foram reduzidos para 60% da concentração utilizada na fermentação de 1000 L. Isto teve como resultado que o fosfato se esgotou aproximadamente duas horas mais cedo no fermentador de 10 L modificado, em relação ao fermentador de 1000 L.

Finalmente, iniciou-se uma alimentação de azoto complexo a DO 40 (A550) para proporcionar uma fonte de alimentação lenta de aminoácidos e fosfato após o esgotamento dos aminoácidos e do fosfato inicialmente carregados no fermentador. Esta alimentação consistiu em 290 ml de NZ Amina AS a 20% misturada com 140 ml de extracto de levedura a 20% e foi alimentada a uma taxa de 0,4 ml/min. O volume inicial de partida após a adição do inóculo era de aproximadamente 8 L.

v. Resultados

A figura 26 apresenta os resultados de uma experiência conduzida no fermentador modificado de 10 L. Como se pode observar desta figura, entre 10 e 11 horas, a taxa de alimentação de glucose (Fig. 26B) diminuiu sob o controlo do computador para manter o ponto de regulação de 30% de DO_2. isto sugere que o fosfato estava a esgotar e era utilizada menos glucose para a produção de massa celular. A aproximadamente 11,5 horas, a taxa de alimentação de glucose foi colocada sob controlo manual. A taxa de alimentação de

glucose foi então aumentada por incrementos até a DO_2 ser conduzida até zero.

Nesta experiência em particular, a sonda de DO_2 produziu uma leitura de aproximadamente 5% quando a concentração real de DO_2 era nula. Embora o formato da curva de declínio inicial de DO_2 (Fig. 26A) sugira instabilidade de DO_2, o resultado não foi conclusivo. Portanto, a taxa de bombagem de glucose (GPR) foi reduzida para permitir a recuperação de DO_2 e foi depois aumentada por pequenos incrementos. Quando ocorreu outra quebra de DO_2 a aproximadamente 13 horas, a GPR foi novamente diminuída para permitir a recuperação. Neste ponto, um aumento na GPR inferior a 4% provocou o perfil característico de um declínio lento de DO_2 seguido por um declínio brusco e muito maior do que o previsto na concentração de DO_2.

Quando a GPR foi novamente diminuída para permitir a recuperação, seguiu-se uma surpreendente série de acontecimentos. A concentração de DO_2 no fermentador entra em ciclos reprodutíveis sem estímulos exteriores. A irregularidade observada no padrão dos ciclos de DO_2 às 14,2 h foi provocada por uma breve interrupção do fornecimento de glucose. Para além desse único evento, nada foi feito para alterar os parâmetros operacionais da fermentação. Como se pode observar, os ciclos foram bastante consistentes em amplitude e apenas variaram em frequência, tornando-se mais afastados até pararem às 17,3 horas. Estimularam-se duas séries adicionais de ciclos praticamente idênticos diminuindo a taxa de alimentação de glucose às 20,25 e 22,2 horas.

Estes resultados demonstram uma instabilidade drástica na concentração de DO_2 neste fermentador de 10 L modificado. O formato geral da parte de declínio de DO_2 do ciclo é semelhante ao observado no fermentador de 1000 L. Isto sugere que o reactor de 10 L duplica adequadamente os fenómenos primeiro observados no fermentador maior. A velocidade e a regularidade dos ciclos observados no reactor pequeno sugerem uma origem biológica.

Lisboa, 2009-08-07

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinação da propensão de uma cultura de células bacterianas para instabilidade de oxigénios dissolvido num fermentador de larga escala possuindo pelo menos 1000 litros de capacidade volumétrica compreendendo (a) realizar a cultura da cultura celular na presença de uma fonte de carbono/energia introduzida a uma taxa de alimentação estabelecida num fermentador de pequena escala não tendo mais de 100 litros de capacidade volumétrica configurado de modo a que a concentração de oxigénio dissolvido em toda a cultura celular não seja homogénea durante a fermentação, (b) quando a cultura tem suficiente capacidade de captação de oxigénio para exceder a taxa de transferência de oxigénio do reactor, aumentar a taxa de alimentação da fonte de carbono/energia, e (c) determinar se ocorre não linearidade no declive do gráfico de concentração de oxigénio dissolvido *versus* o tempo ou se são induzidas oscilações na concentração de oxigénio dissolvido depois do aumento da taxa de alimentação da fonte de carbono/energia.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o fermentador tem uma capacidade de 10 litros.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o fermentador tem uma entrada no seu topo para introdução da fonte de carbono/energia.

4. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o fermentador tem dois impulsores.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o fermentador tem uma sonda para oxigénio dissolvido e uma sonda redox.

6. Método de acordo com a reivindicação 5 em que as sondas estão montadas no fermentador o mais próximo do impulsor mais no fundo.

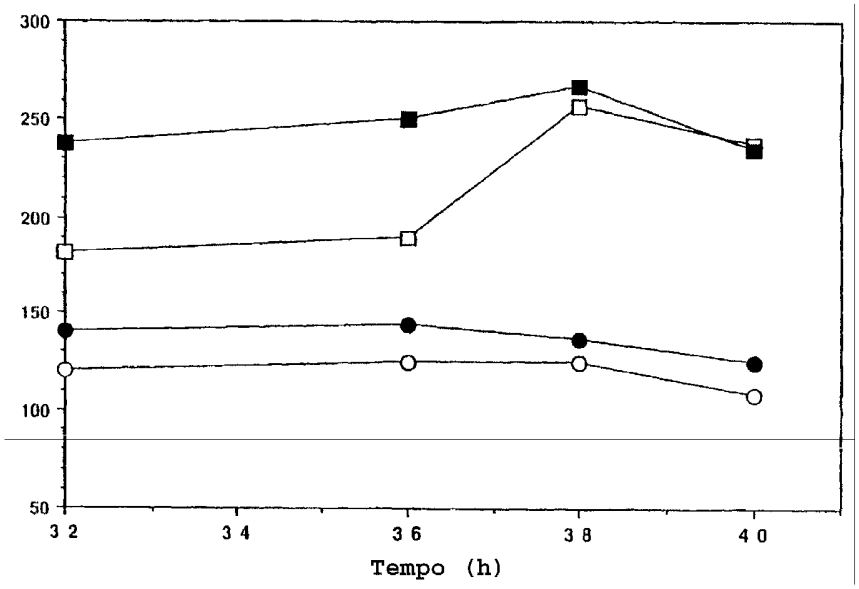
7. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o fermentador tem um veio vertical disposto no seu centro ao qual estão ligados dois impulsores, um acima do outro,

impulsores estes que estão localizados significativamente abaixo da superfície da cultura bacteriana, fermentador este que também tem meios para entrada de gás no seu fundo, uma sonda para oxigénio dissolvido e uma sonda redox, ambas ligadas ao fermentador próximo do impulsor do fundo, sondas estas que são utilizadas para medir a concentração de oxigénio dissolvido e o potencial redox, respectivamente, da cultura celular, e meios para entrada de líquido dispostos no topo do fermentador.

Lisboa, 2009-08-07

RESUMO

"Método para a determinação da propensão de bactérias para instabilidade do oxigénio dissolvido"



Proporciona-se um método para determinar se uma cultura de células bacterianas particular tem propensão para instabilidade do oxigénio dissolvido quando fermentada em larga escala.

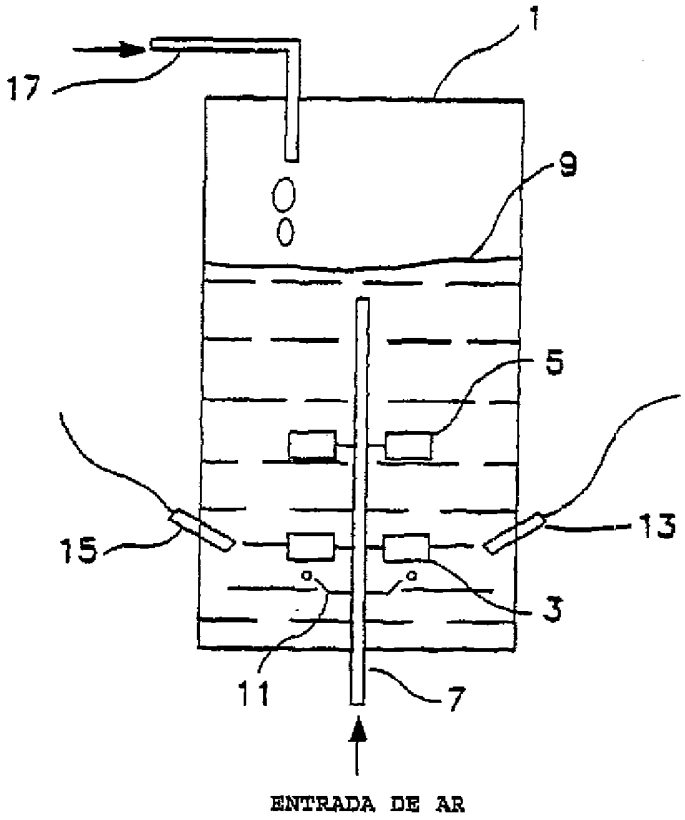
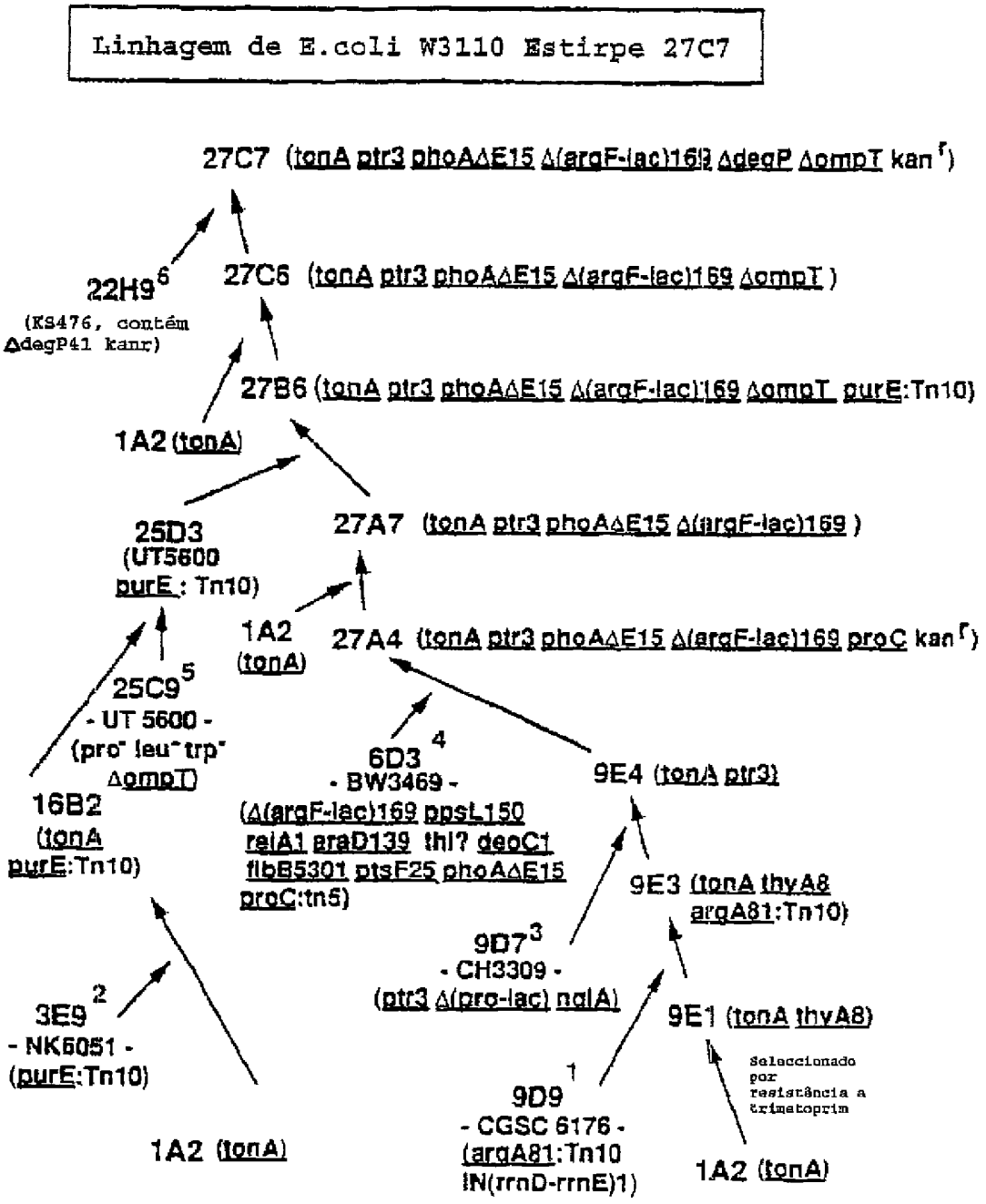


FIG. 1

FIG.2



1. Obtido de B. Bachman, E.coli Genetic Stock Center
2. Do laboratório de Dr. Nancy Kleckner, estirpe semelhante disponível de Dr. Carol Gros, University of Wisconsin
3. J. Bact. 140, 1979, p. 125
4. Obtido do Professor Barry Wanner, Purdue University
5. J. Bact. 153, 1983, p. 1104-1106
6. Obtido de Harvard Medical School, Office of Technology Licensing and Industry-Sponsored Research.

FIG.3A

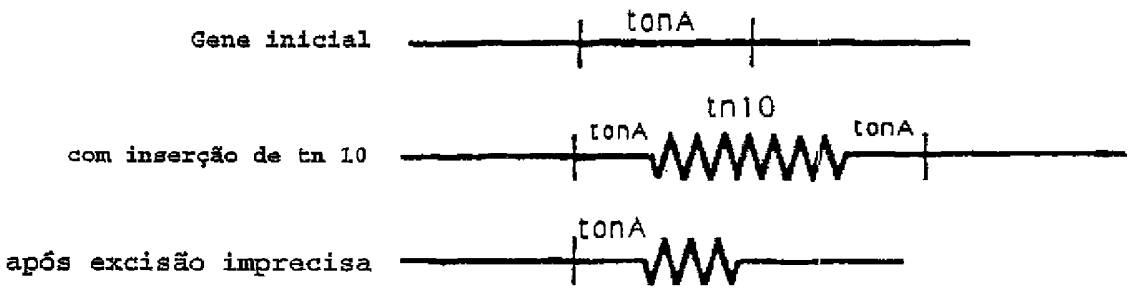

Gene inicial
tonA
tn10
com inserção de tn 10
tonA
tonA
tonA
após excisão imprecisa

FIG.3B

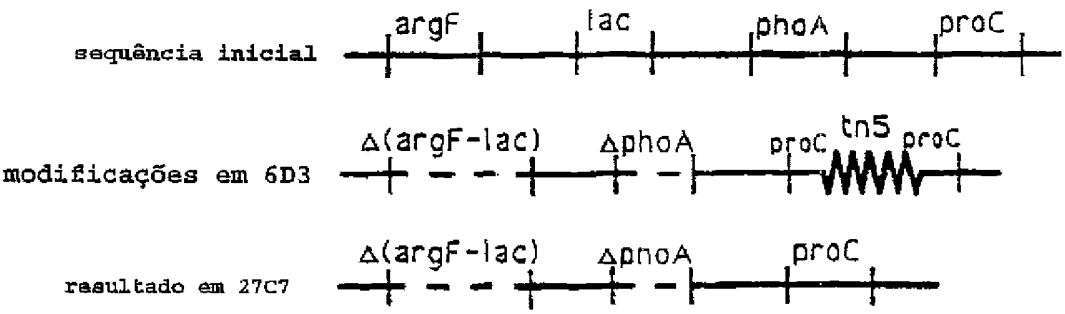
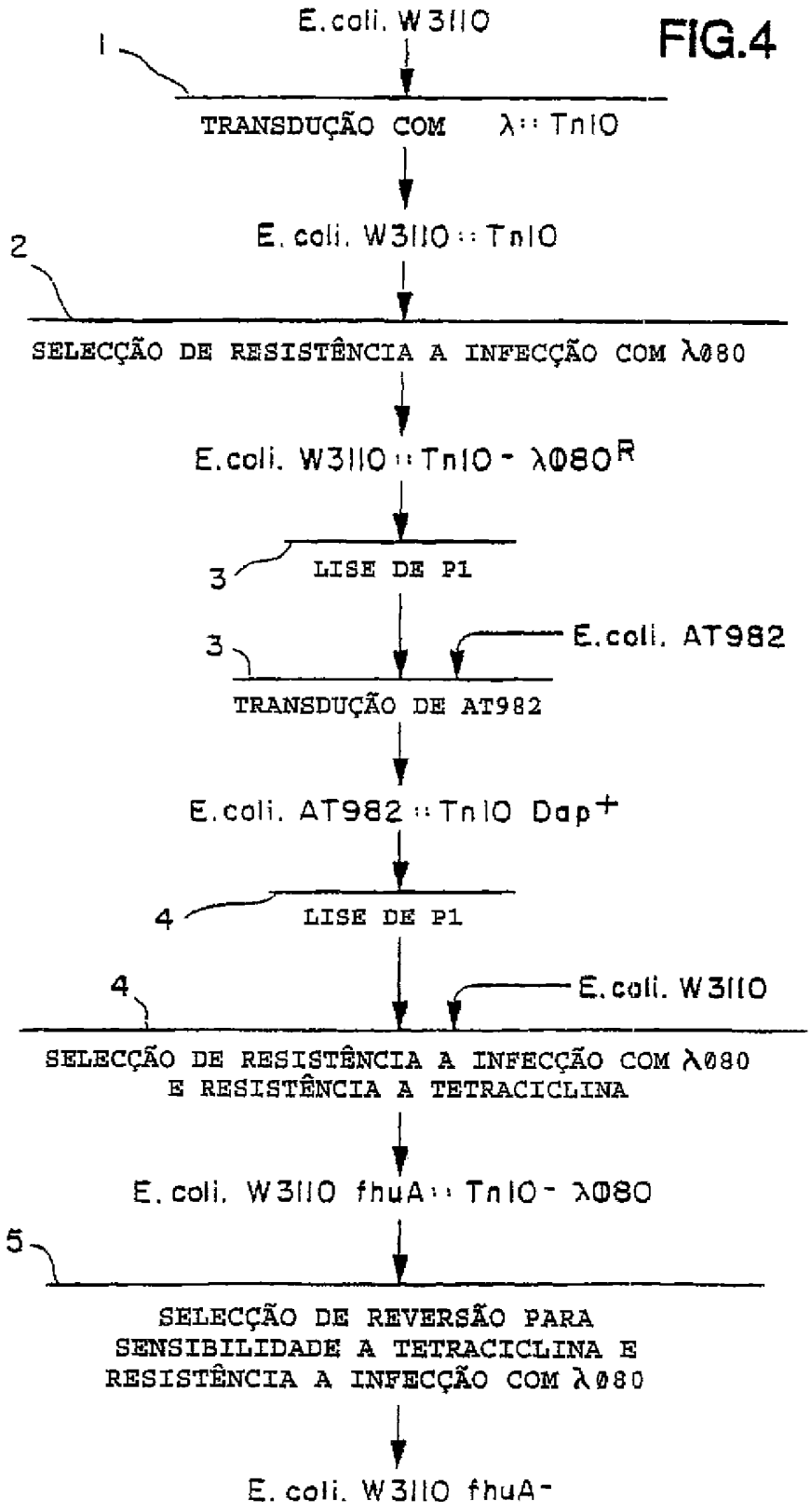

sequência inicial
argF
lac
phoA
proC
Δ(argF-lac)
ΔphoA
proC
tn5
proC
modificações em 6D3
Δ(argF-lac)
ΔphoA
proC
resultado em 27C7

FIG.4


E.coli. W3110
1
TRANSDUÇÃO COM λ:: Tn10
E. coli. W3110 :: Tn10
2
SELECÇÃO DE RESISTÊNCIA A INFECÇÃO COM λ080
E.coli. W3110 :: Tn10 - λ080R
3
LISE DE P1
3
E.coli. AT982
TRANSDUÇÃO DE AT982
E.coli. AT982 :: Tn10 Dap+
4
LISE DE P1
4
E.coli. W3110
SELECÇÃO DE RESISTÊNCIA A INFECÇÃO COM λ080
E RESISTÊNCIA A TETRACICLINA
E. coli. W3110 fhuA :: Tn10 - λ080
5
SELECÇÃO DE REVERSÃO PARA
SENSIBILIDADE A TETRACICLINA E
RESISTÊNCIA A INFECÇÃO COM λ080
E. coli. W3110 fhuA-

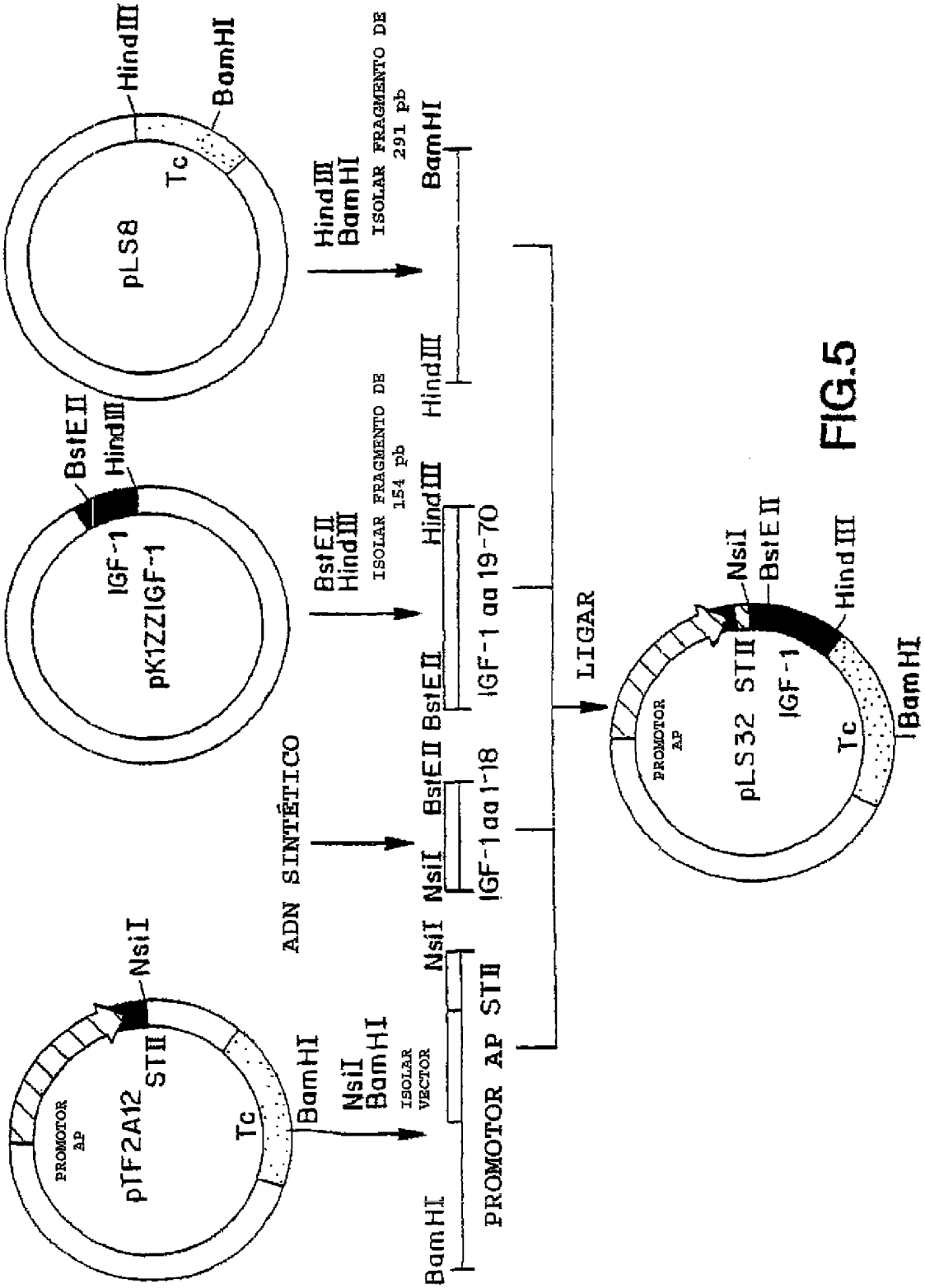
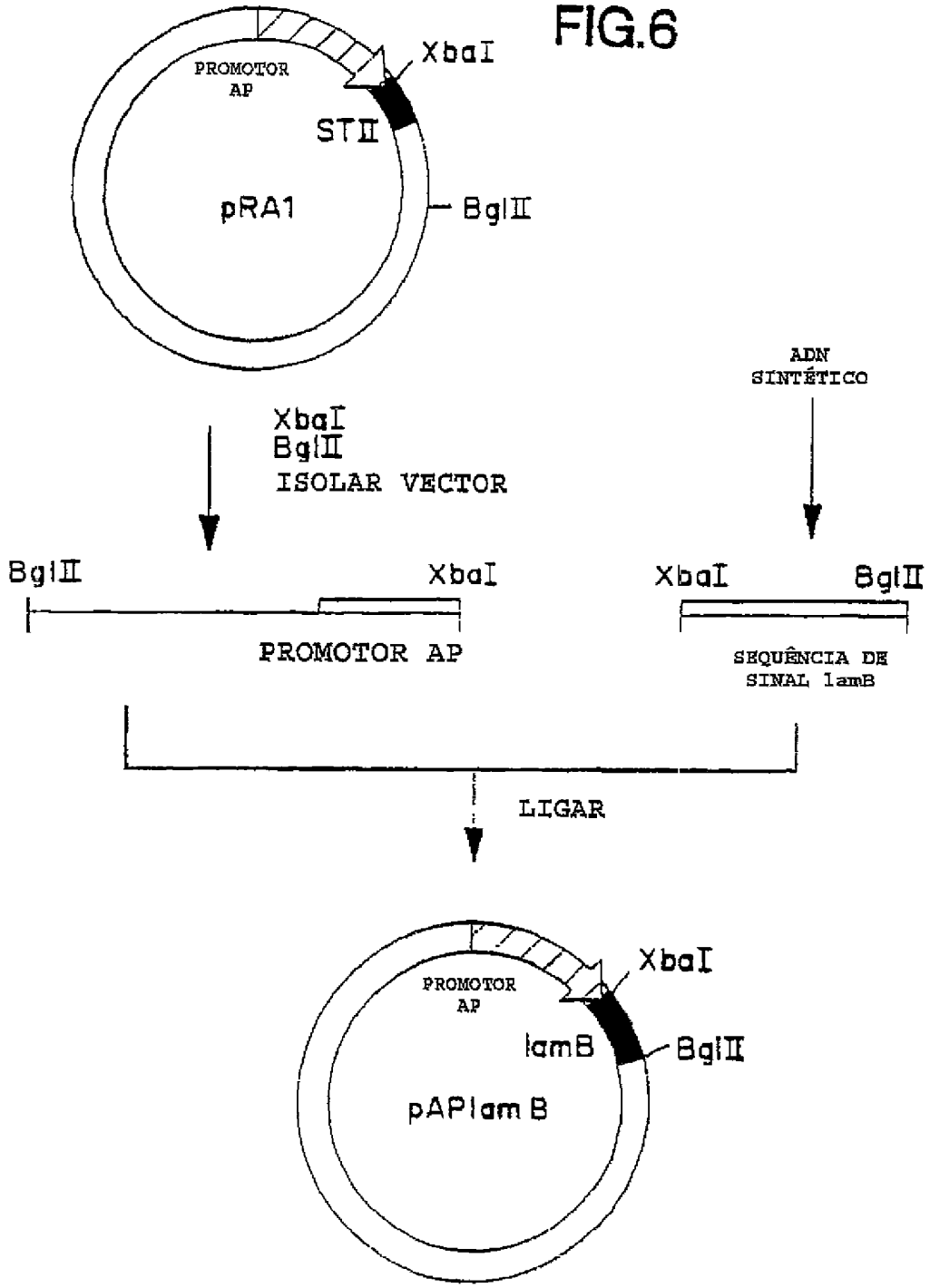

HindIII
BamHI
pLS8
Tc
BstEII
HindIII
IGF-1
pK1ZZIGF-1
HindIII
BamHI
ISOLAR FRAGMENTO DE 291 pb
BstEII
HindIII
ISOLAR FRAGMENTO DE 154 pb
HindIII
IGF-1 aa 19-70
ADN SINTÉTICO
NsiI
BstEII
BstEII
IGF-1 aa 1-18
LIGAR
NsiI
BamHI
ISOLAR VECTOR
BamHI
PROMOTOR AP STII
NsiI
STII
PROMOTOR AP
pTF2A12
Tc
BamHI
NsiI
BstEII
HindIII
PROMOTOR AP
pLS32 STII
IGF-1
Tc
BamHI

FIG.5

FIG.6


PROMOTOR
AP
XbaI
STII
pRA1
BglII
ADN
SINTÉTICO
XbaI
BglII
ISOLAR VECTOR
BglII
XbaI
PROMOTOR AP
XbaI
BglII
SEQUÊNCIA DE
SINAL lamB
LIGAR
PROMOTOR
AP
XbaI
lamB
BglII
pAPlam B

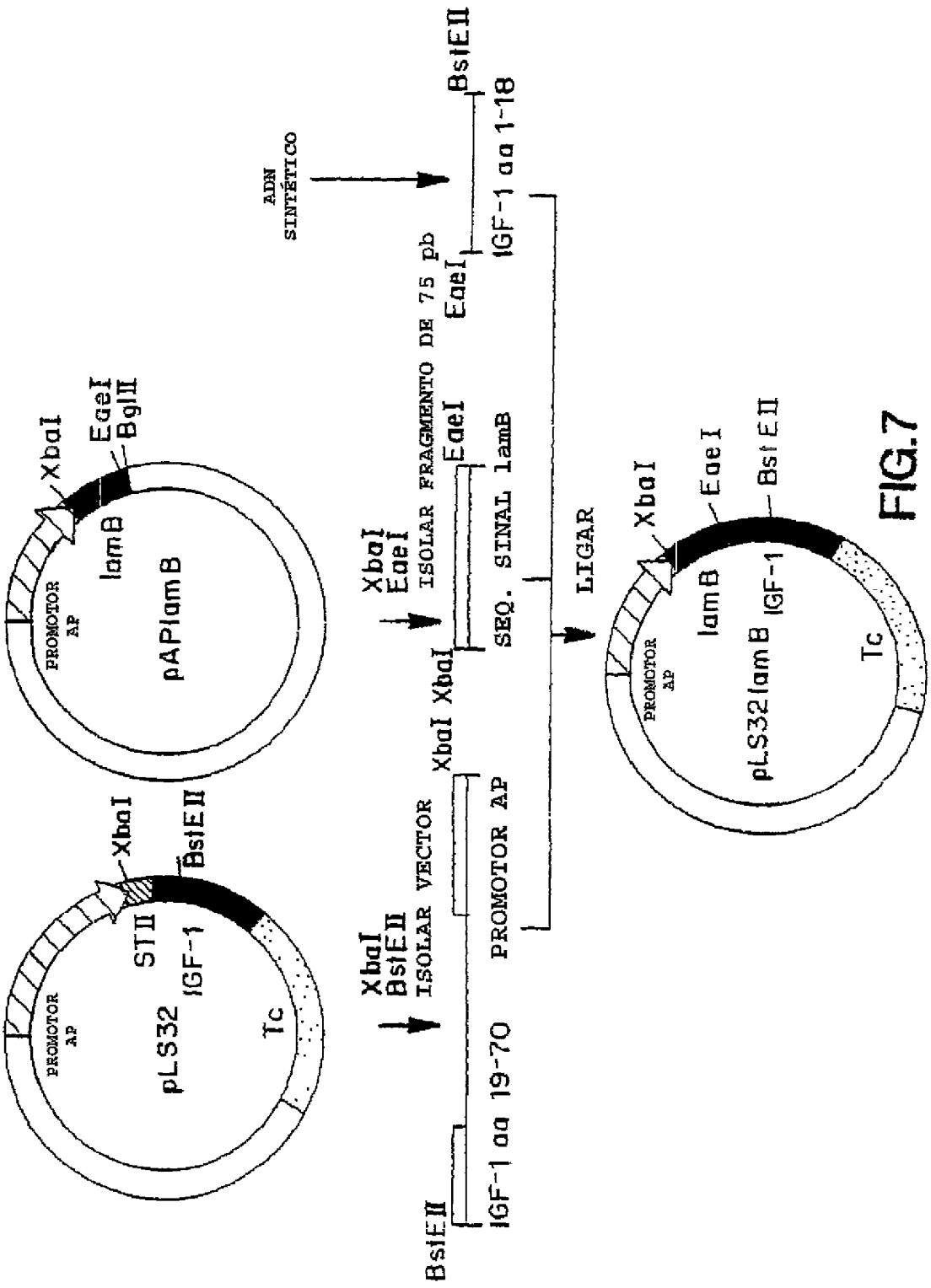

ADN SINTÉTICO
BstEII
IGF-1 aa 1-18
EaeI
ISOLAR FRAGMENTO DE 75 pb
XbaI
EaeI
SEQ. SINAL lamB
XbaI XbaI
ISOLAR VECTOR
XbaI
BstEII
IGF-1 aa 19-70
BstEII
PROMOTOR AP
LIGAR
XbaI
EaeI
BglII
lamB
PROMOTOR AP
pAPlamB
XbaI
BstEII
STII
IGF-1
PROMOTOR AP
pLS32
Tc
XbaI
EaeI
BstEII
lamB
IGF-1
PROMOTOR AP
pLS32lamB
Tc

FIG.7

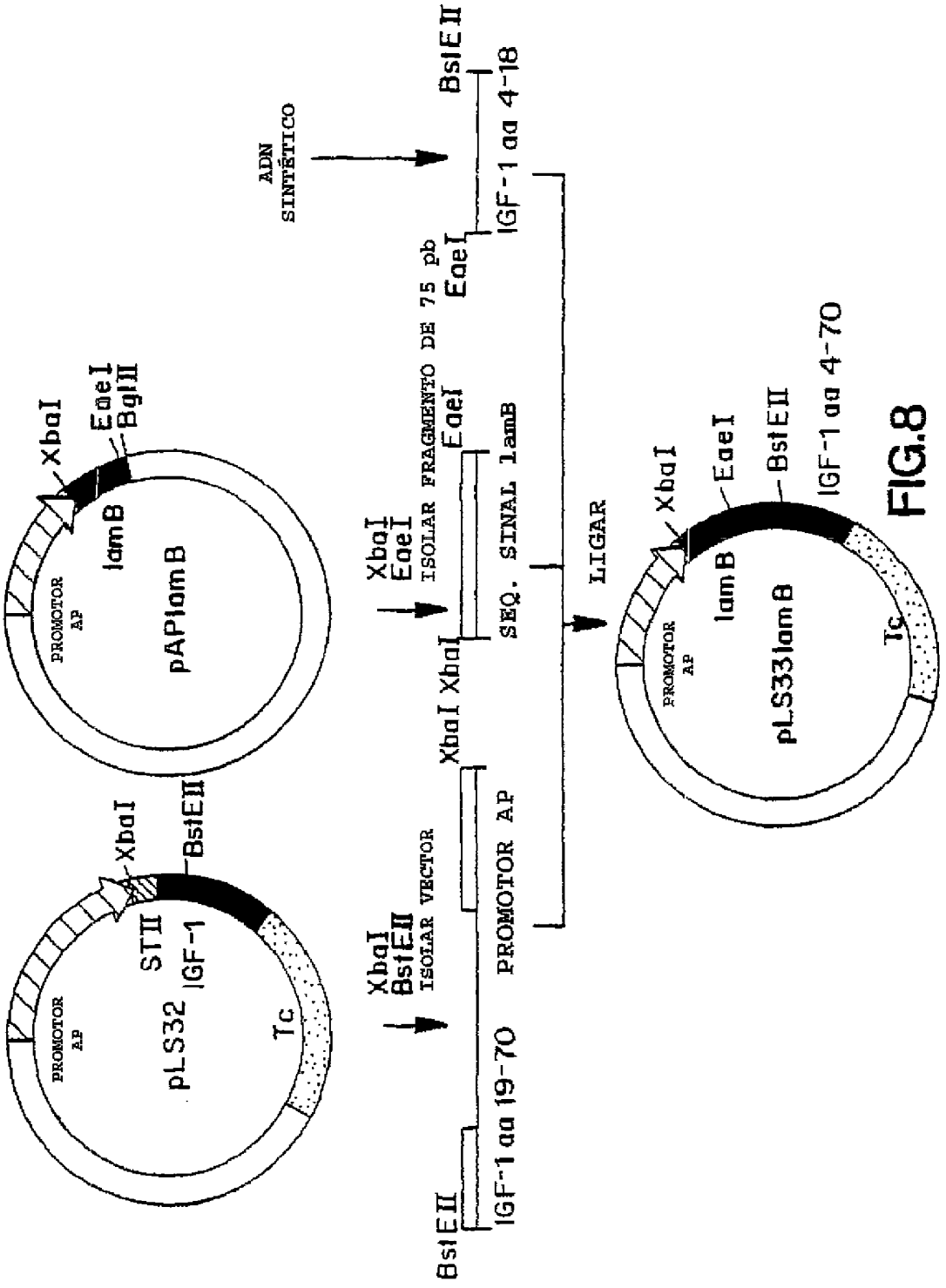

ADN SINTÉTICO
BstEII
IGF-1 aa 4-18
EaeI
XbaI
EaeI
ISOLAR FRAGMENTO DE 75 pb
EaeI
XbaI
EaeI
SEQ. SINAL lamB
XbaI XbaI
LIGAR
XbaI
BstEII
ISOLAR VECTOR
XbaI
PROMOTOR AP
BstEII
IGF-1 aa 19-70
XbaI
EaeI
BstEII
IGF-1 aa 4-70
lamB
pAPlamB
PROMOTOR AP
XbaI
EaeI
BglII
lamB
pAPlamB
PROMOTOR AP
XbaI
BstEII
STII
IGF-1
pLS32
Tc
PROMOTOR AP
lamB
pLS33lamB
Tc
PROMOTOR AP

FIG.8

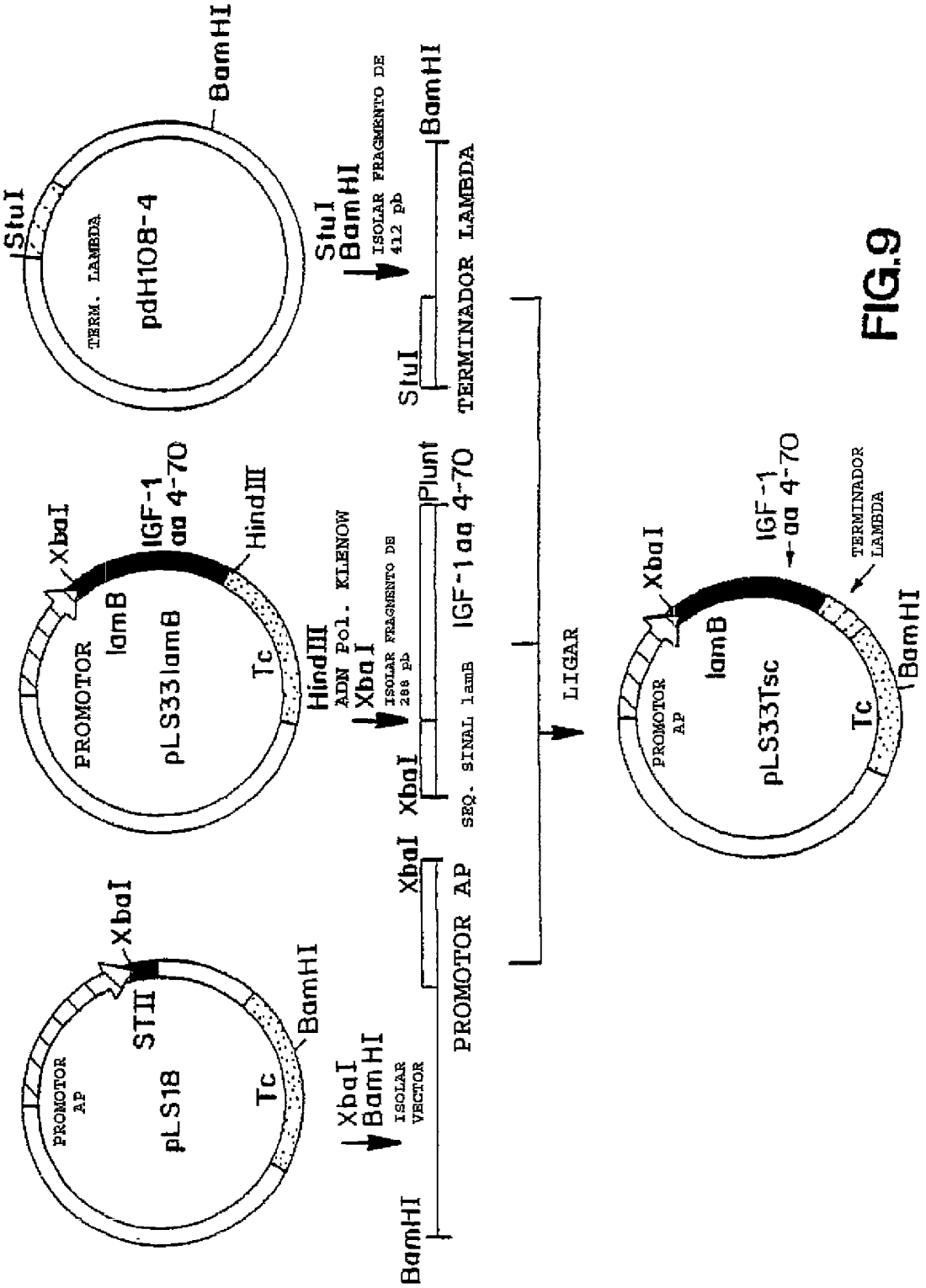

StuI
BamHI
TERM. LAMBDA
pdH108-4
StuI
BamHI
ISOLAR FRAGMENTO DE 412 pb
StuI
TERMINADOR LAMBDA
BamHI
XbaI
IGF-1 aa 4-70
HindIII
PROMOTOR
lamB
pLS33lamB
Tc
HindIII
ADN Pol. KLENOW
XbaI
ISOLAR FRAGMENTO DE 288 pb
XbaI
PstI
SEQ. SINAL lamB
IGF-1aa 4-70
XbaI
BamHI
ISOLAR VECTOR
PROMOTOR AP
PROMOTOR AP
pLS18
STII
Tc
XbaI
BamHI
LIGAR
XbaI
IGF-1 aa 4-70
TERMINADOR LAMBDA
PROMOTOR AP
lamB
pLS33Tsc
Tc
BamHI

FIG.9

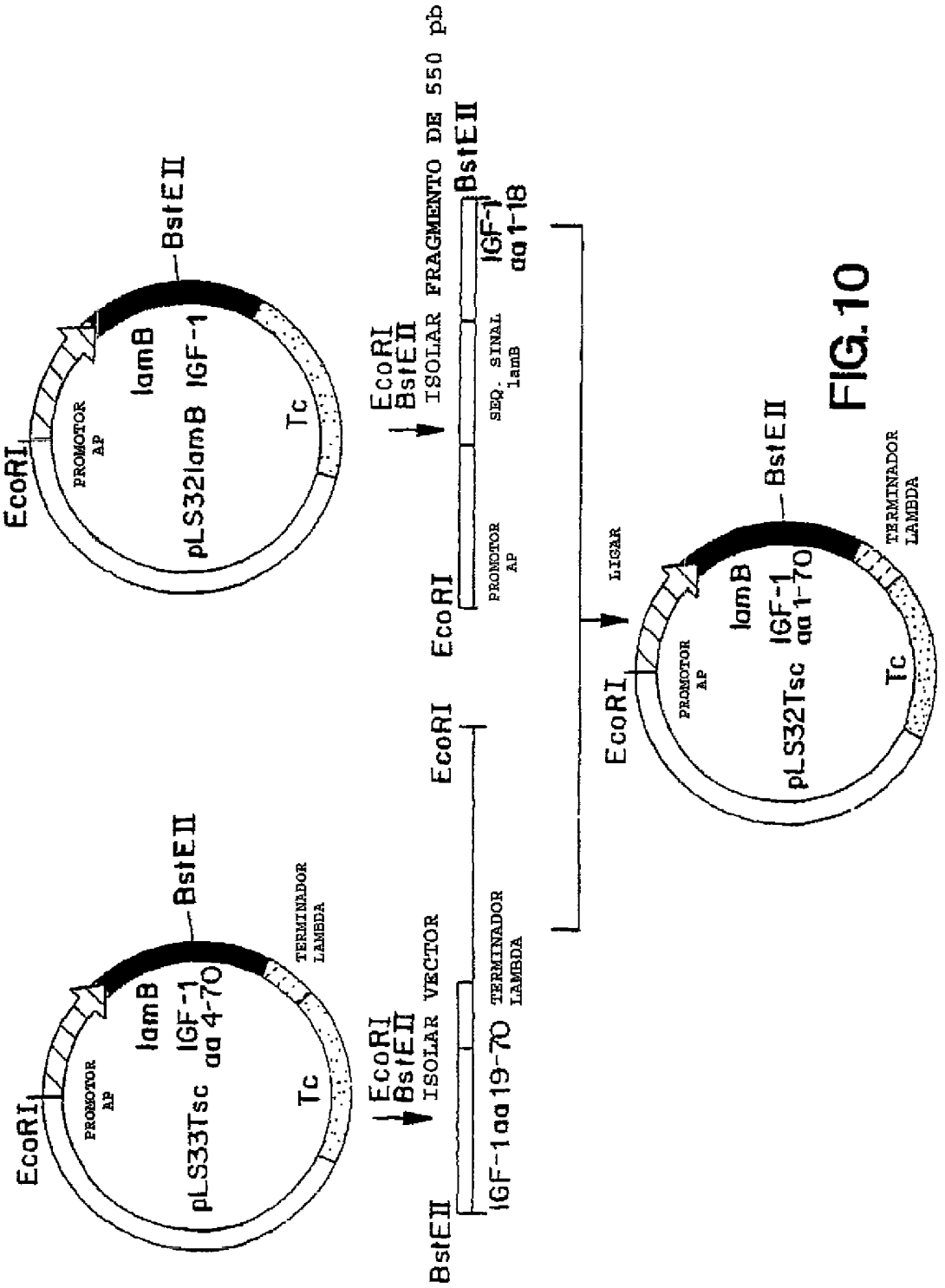

EcoRI
PROMOTOR AP
lamB
IGF-1
pLS32lamB IGF-1
Tc
BstEII
EcoRI
BstEII
ISOLAR FRAGMENTO DE 550 pb
EcoRI
PROMOTOR AP
SEQ. SINAL lamB
IGF-1 aa 1-18
BstEII
EcoRI
BstEII
ISOLAR VECTOR
IGF-1 aa 19-70
TERMINADOR LAMBDA
LIGAR
EcoRI
PROMOTOR AP
lamB
IGF-1 aa 4-70
pLS33Tsc
Tc
TERMINADOR LAMBDA
EcoRI
PROMOTOR AP
lamB
IGF-1 aa 1-70
pLS32Tsc
Tc
BstEII
TERMINADOR LAMBDA

FIG. 10

```
GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC 50

TCATTGCTGA GTTGTTATTT AAGCTTGCCC AAAAAGAAGA AGAGTCGAAT 100

GAACTGTGTG CGCAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT 150

TCGCAATATG GCGCAAAATG ACCAACAGCG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG 200

GGGCGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCCTGA CGACGATACG 250

GAGCTGCTGC GCGATTACGT AAAGAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTCAGTA 300

AAAAGTTAAT CTTTTCAACA GCTGTCATAA AGTTGTCACG GCCGAGACTT 350

ATAGTCGCTT TGTTTTTATT TTTTAATGTA TTTGTAACTA GTACGCAAGT 400
```

FIG.11A

```
TCACGTAAAA AGGGTATCTA GAATTATG  ATG ATT ACT CTG CGC 443
                                Met Ile Thr Leu Arg
                                -24             -20

AAA CTT CCT CTG GCG GTT GCC GTC GCA GCG GGC GTA ATG 482
Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala Gly Val Met
                                    -10

TCT GCT CAG GCC ATG GCC GGT CCC GAA ACT CTG TGC GGT 521
Ser Ala Gln Ala Met Ala Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly
                        1

GCT GAA CTG GTT GAC GCT CTG CAG TTT GTT TGC GGT GAC 560
Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp
          10                                    20

CGT GGT TTT TAT TTT AAC AAA CCC ACT GGT TAT GGT TCT 599
Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser
                                30
```

FIG.11B

```
TCT TCT CGT CGT GCT CCC CAG ACT GGT ATT GTT GAC GAA 638
Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu
                        40

TGC TGC TTT CGT TCT TGC GAC CTG CGT CGT CTG GAA ATG 677
Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met
            50

TAT TGC GCT CCC CTG AAA CCC GCT AAA TCT GCT TAG AAGCTC 719
Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala AM*
 60                                      70

CTAACGCTCGG TTGCCGCCGG GCGTTTTTTA TTGTTAA 757
```

Número de Posição -24 significa o início da sequência de sinal lamB.
Número de Posição 1 significa o início da proteína IGF-I.

FIG.11C

FIG.12

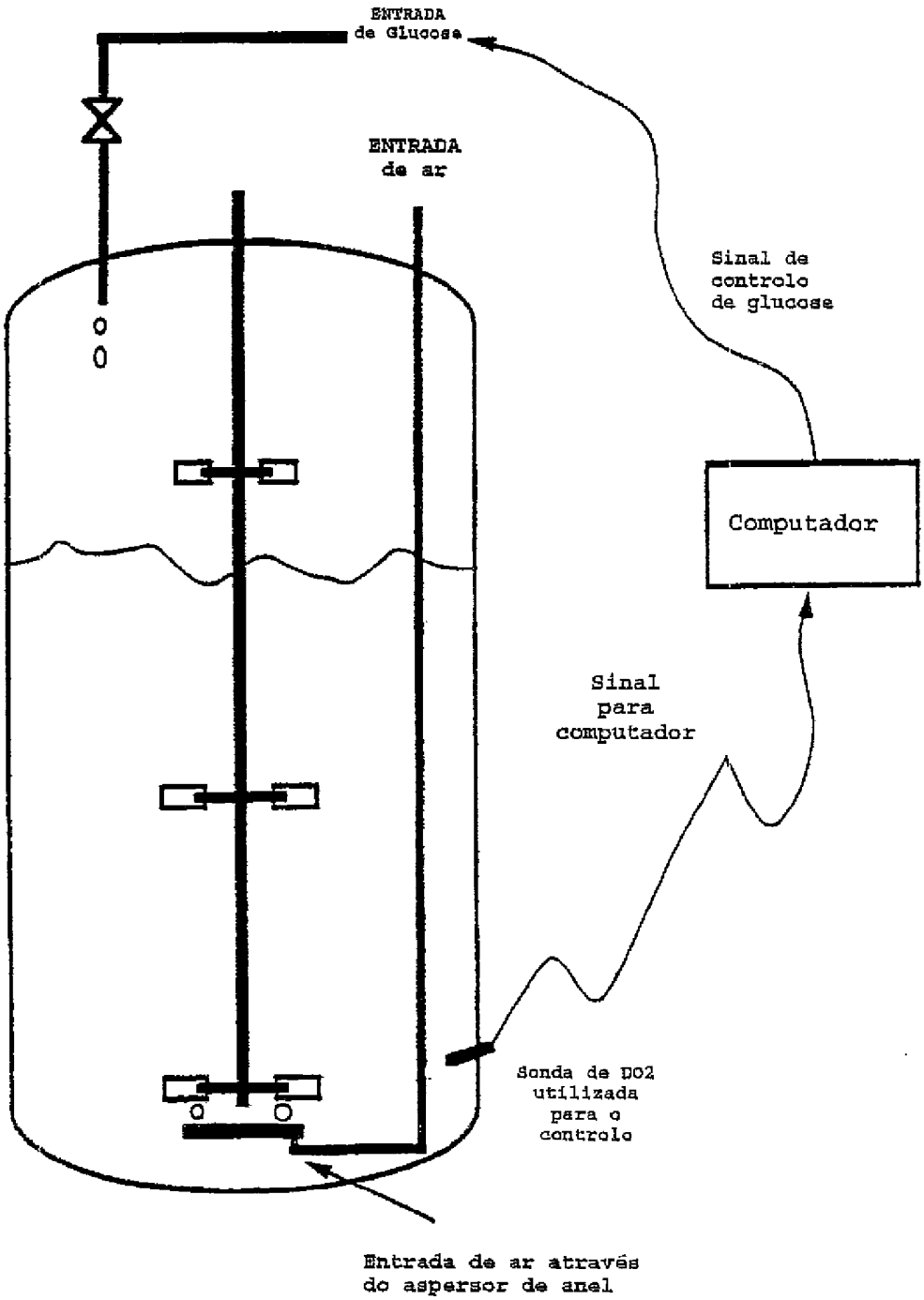

ENTRADA
de Glucose
ENTRADA
de ar
Sinal de
controlo
de glucose
Computador
Sinal
para
computador
Sonda de DO2
utilizada
para o
controlo
Entrada de ar através
do aspersor de anel

FIG.13A

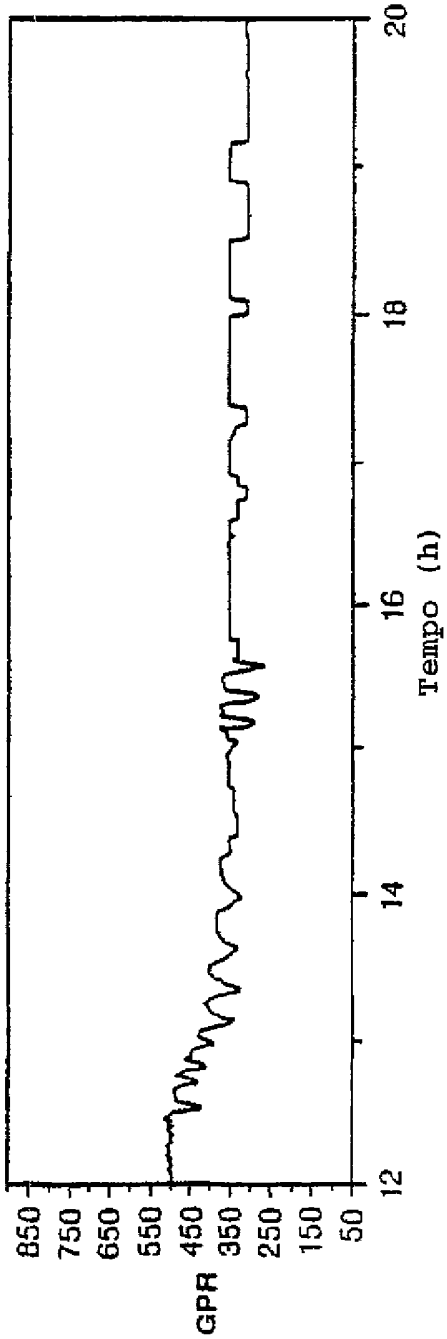
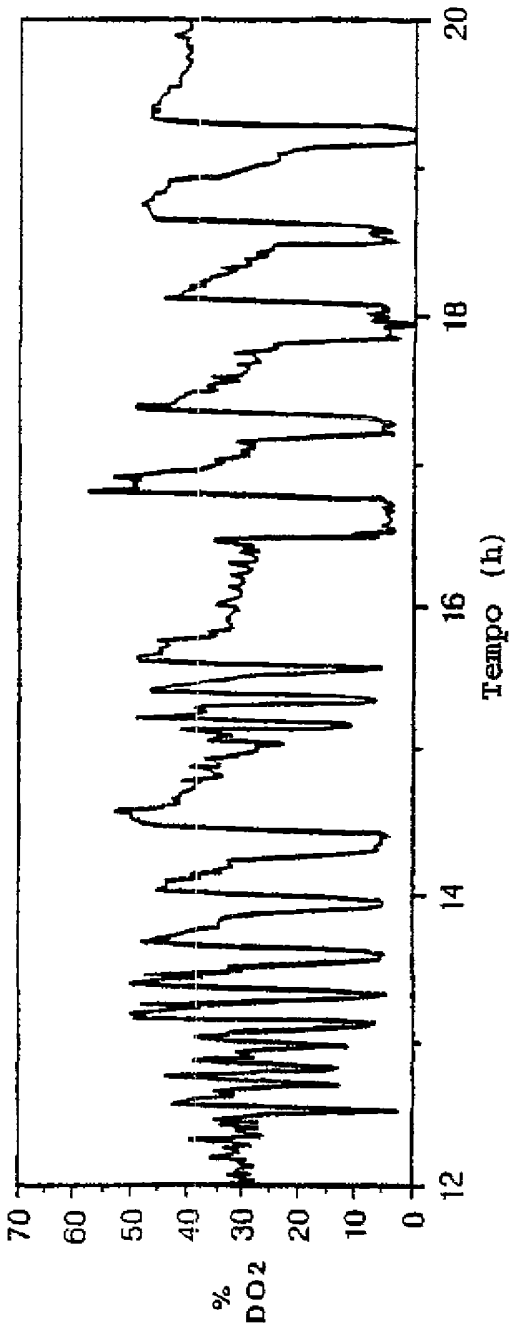


FIG.13B



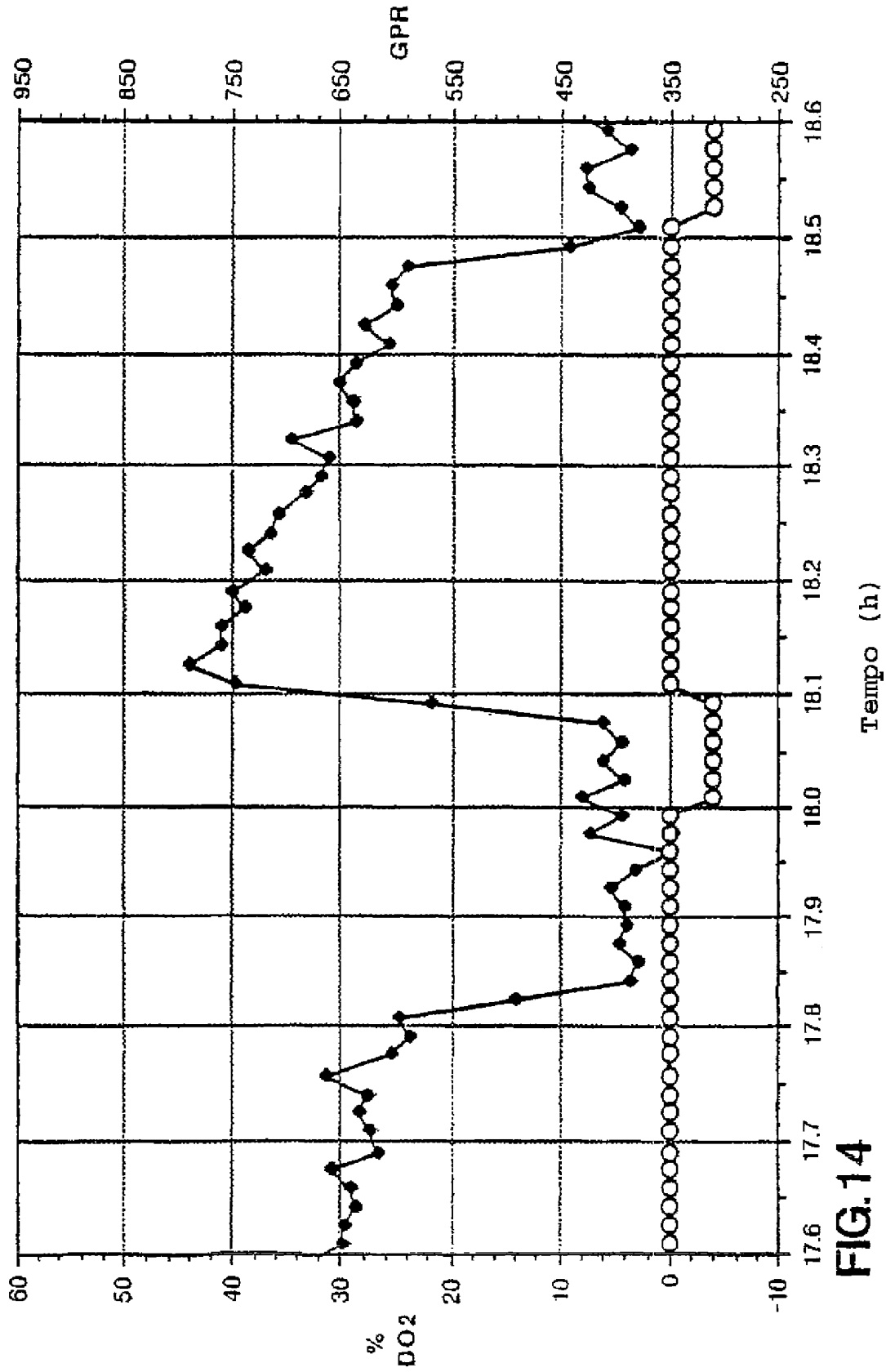

GPR
950
850
750
650
550
450
350
250
% DO2
60
50
40
30
20
10
0
-10
17.6
17.7
17.8
17.9
18.0
18.1
18.2
18.3
18.4
18.5
18.6
Tempo (h)

FIG.14

FIG.15

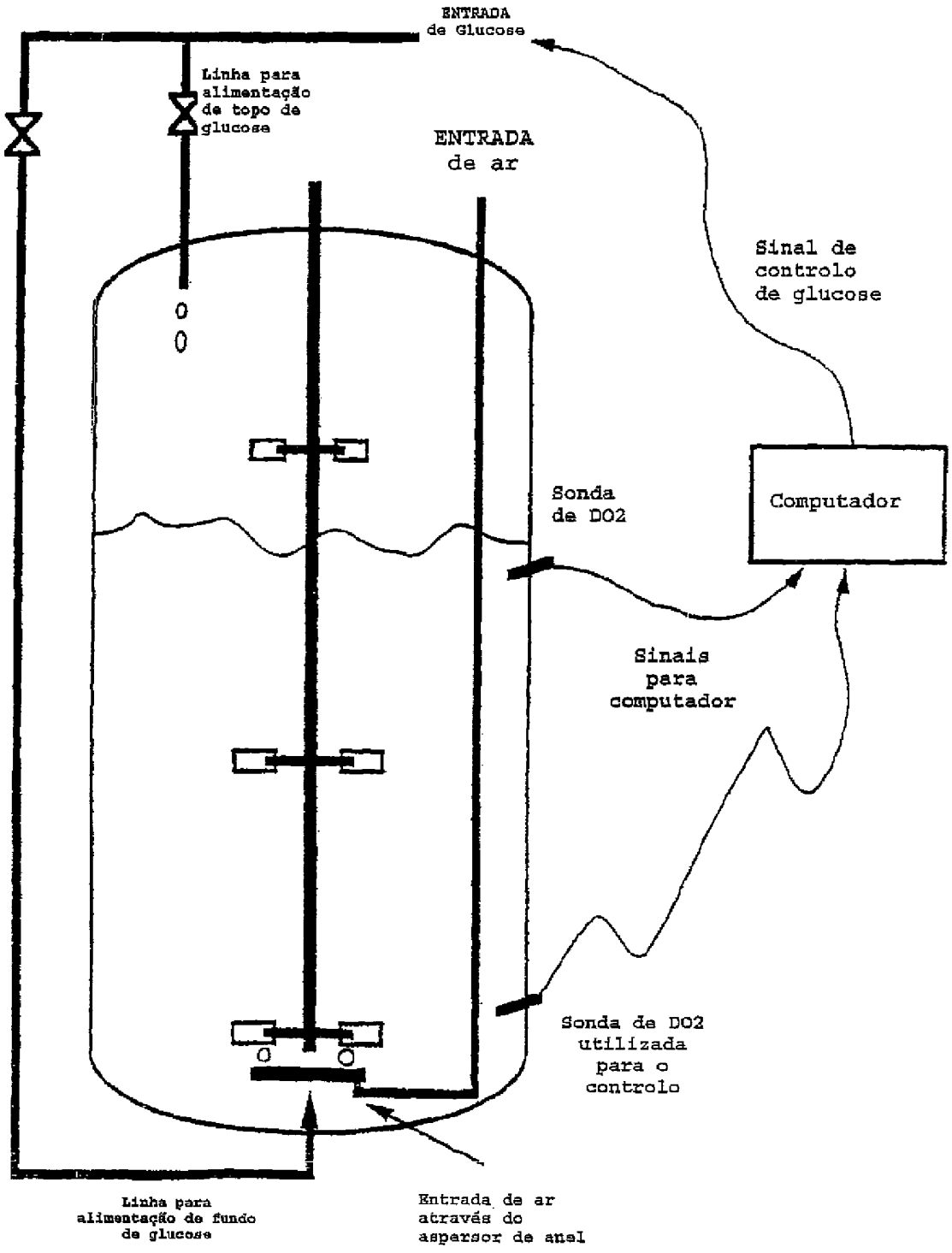
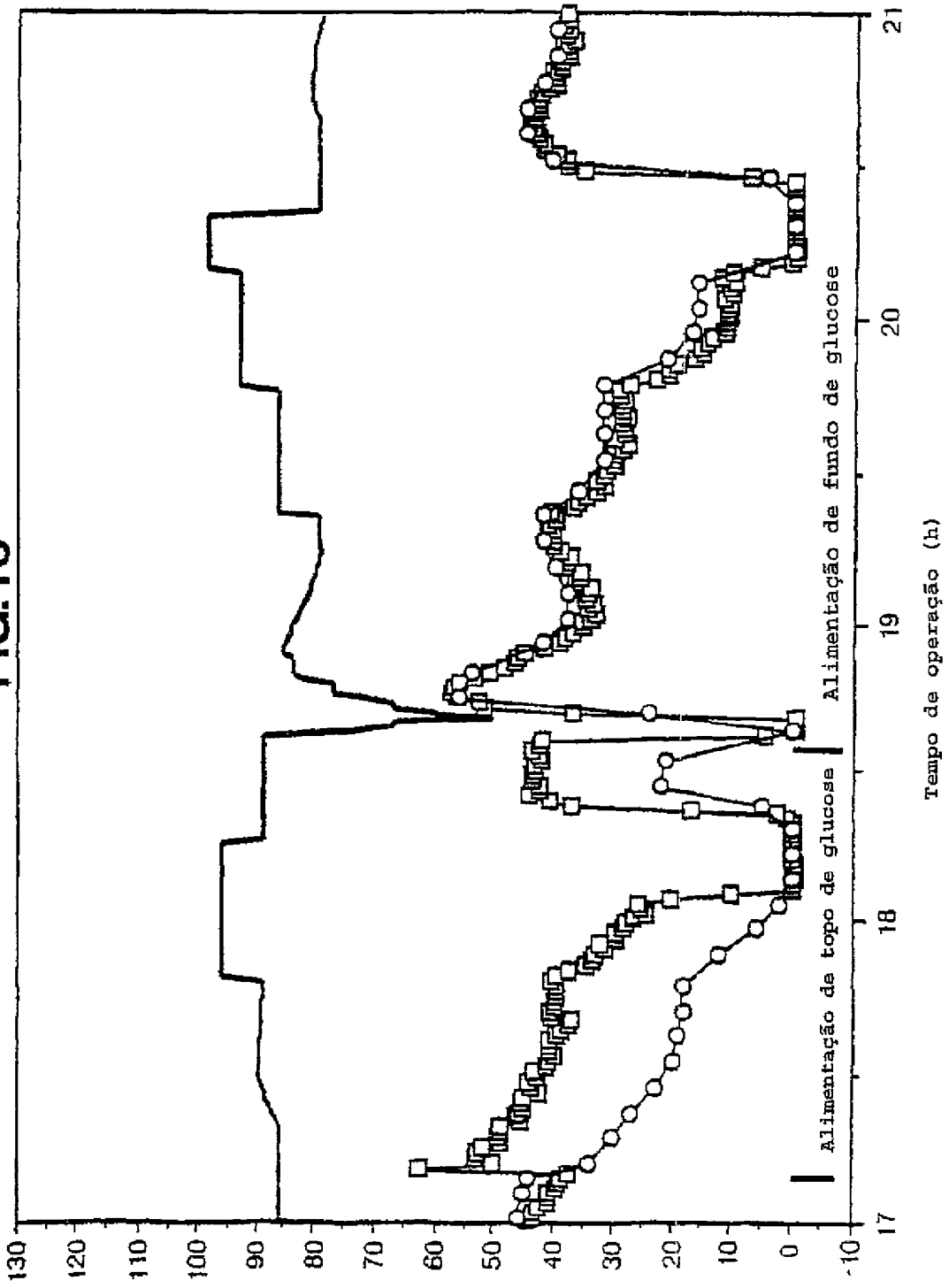

ENTRADA
de Glucose
Linha para
alimentação
de topo de
glucose
ENTRADA
de ar
Sinal de
controlo
de glucose
Computador
Sonda
de DO2
Sinais
para
computador
Sonda de DO2
utilizada
para o
controlo
Linha para
alimentação de fundo
de glucose
Entrada de ar
através do
aspersor de anel

FIG.16


130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
17
18
19
20
21
Alimentação de topo de glucose
Alimentação de fundo de glucose
Tempo de operação (h)

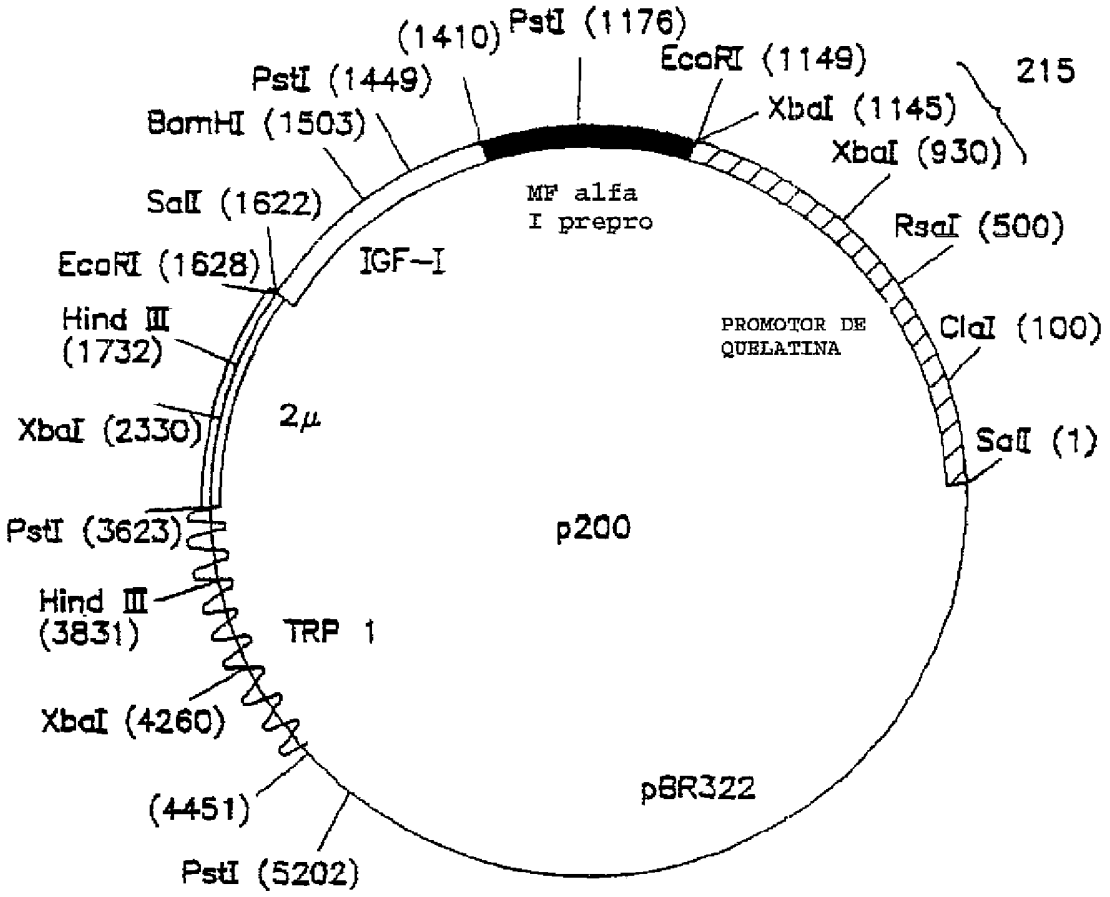

(1410)
PstI (1176)
EcoRI (1149)
215
PstI (1449)
XbaI (1145)
BamHI (1503)
XbaI (930)
MF alfa
I prepro
SalI (1622)
RsaI (500)
EcoRI (1628)
IGF-I
PROMOTOR DE
QUELATINA
Hind III
(1732)
ClaI (100)
XbaI (2330)
2μ
SalI (1)
PstI (3623)
p200
Hind III
(3831)
TRP 1
XbaI (4260)
(4451)
pBR322
PstI (5202)

FIG. 17

FIG. 18

*Eco*RI (1149)
5'-GAATTCATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGC

TGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTT

ACTTAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGG

TTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTTTGGATAA

HaeII *PstI*
AAGAGGTCCGGAAACTCTGTGCGGCGCTGAGCTGGTTGACGCTCTGCAGTTCGTATGTGGTGATC

BamHI
GAGGCTTCTACTTCAACAAACCGACTGGGTACGGATCCTCCTCTCGTCGTGCTCCGCAAACCGGC

ATCGTTGATGAATGCTGTTTTCGGTCCTGTGACCTTCGCCGTCTGGAAATGTACTGCGCTCCGCT

SalI *EcoRI* (1633)
GAAACCGGCTAAGTCTGCATAGTCGACGAATTC-3'

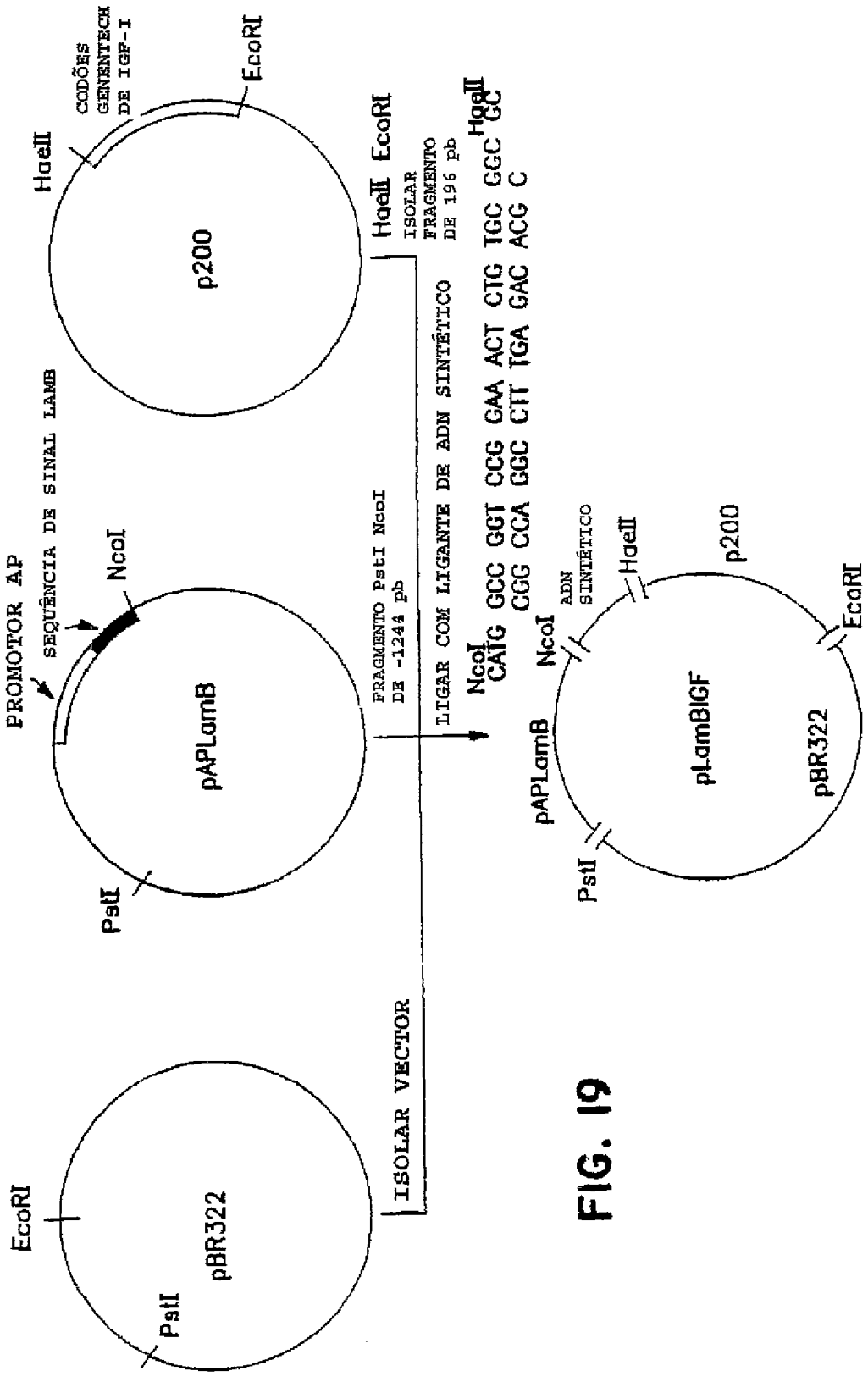

EcoRI
PstI
pBR322
ISOLAR VECTOR
PROMOTOR AP
SEQUÊNCIA DE SINAL LAMB
NcoI
PstI
pAPLamB
FRAGMENTO PstI NcoI
DE -1244 pb
LIGAR COM LIGANTE DE ADN SINTÉTICO
NcoI
CATG GCC GGT CCG GAA ACT CTG TGC GGC GC
CGG CCA GGC CTT TGA GAC ACG C
HaeII EcoRI
ISOLAR
FRAGMENTO
DE 196 pb
HaeII
CODÕES
GENENTECH
DE IGF-I
HaeII
EcoRI
p200
pAPLamB
NcoI
ADN
SINTÉTICO
HaeII
p200
EcoRI
pLamBIGF
pBR322
PstI

FIG. 19

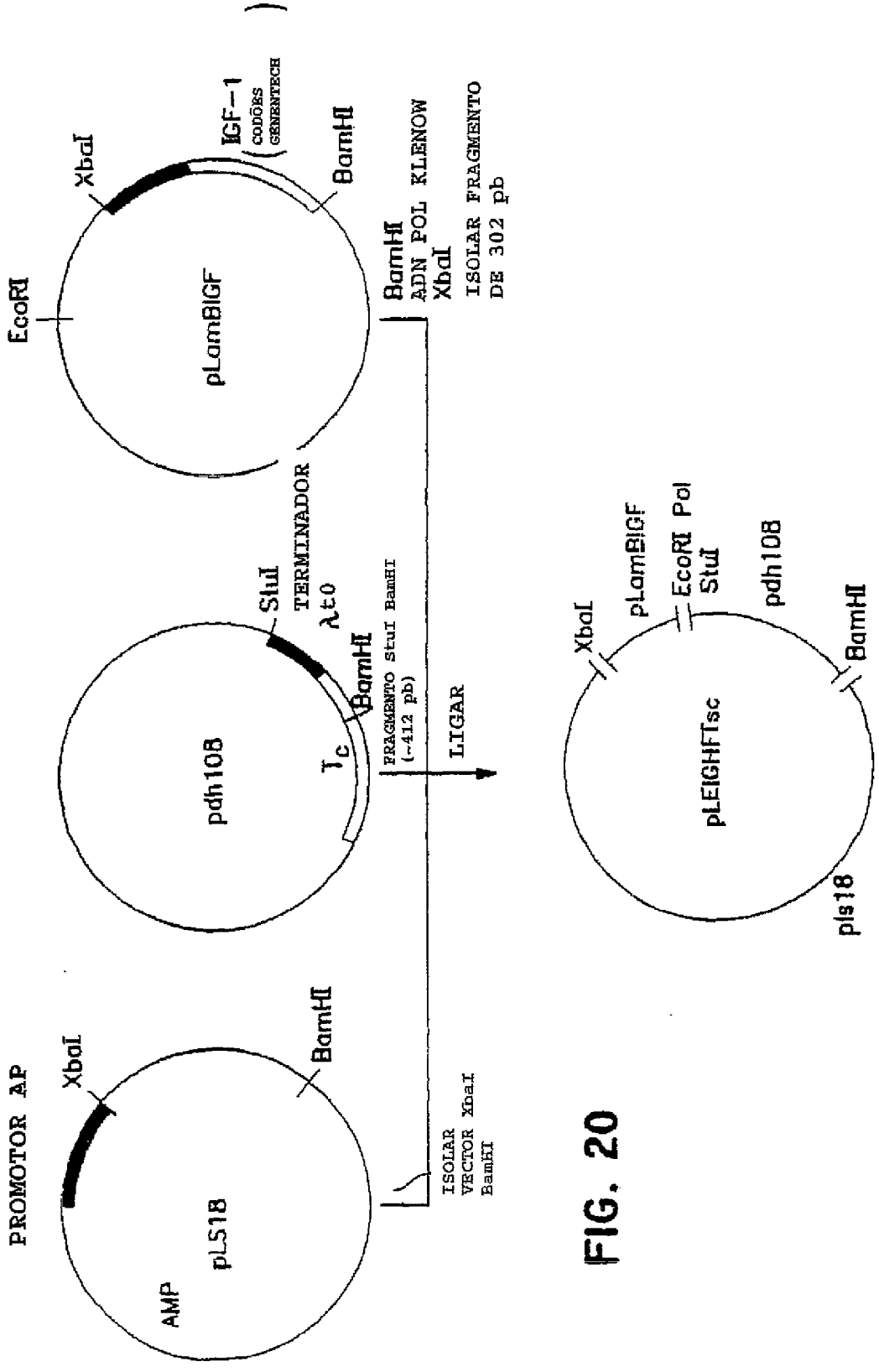

PROMOTOR AP
XbaI
BamHI
AMP
pLS18
ISOLAR VECTOR XbaI BamHI
pdh108
StuI
TERMINADOR λt0
BamHI
Tc
FRAGMENTO StuI BamHI (~412 pb)
LIGAR
EcoRI
pLamBIGF
XbaI
IGF-1 CODÕES GENENTECH
BamHI
BamHI ADN POL KLENOW
XbaI
ISOLAR FRAGMENTO DE 302 pb
XbaI
pLamBIGF
EcoRI Pol
StuI
pdh108
pLEIGHFTsc
BamHI
pls18

FIG. 20

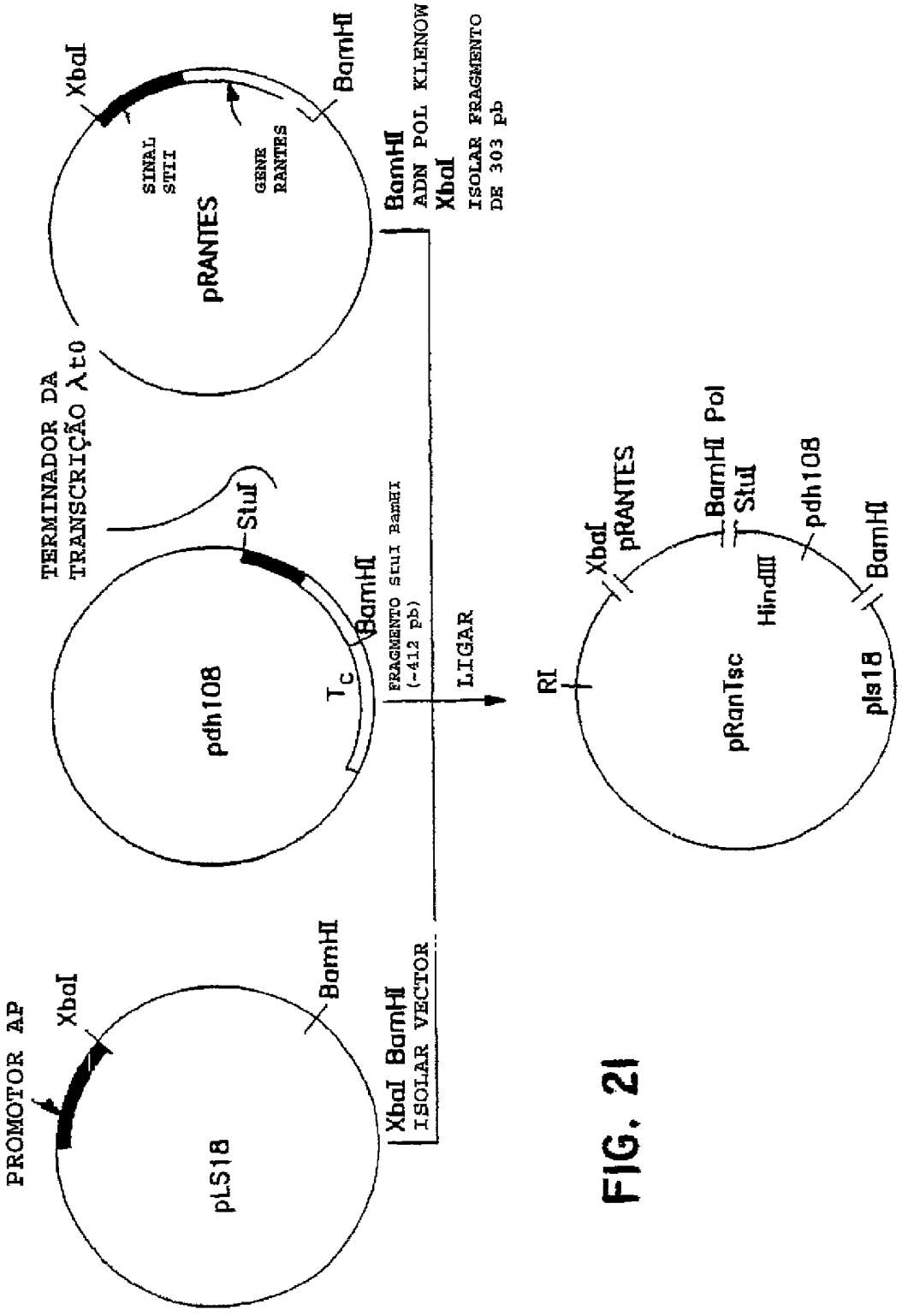

PROMOTOR AP
XbaI
BamHI
pLS18
XbaI BamHI
ISOLAR VECTOR
TERMINADOR DA
TRANSCRIÇÃO λt0
StuI
BamHI
pdh108
Tc
FRAGMENTO StuI BamHI
(~412 pb)
LIGAR
XbaI
BamHI
pRANTES
SINAL
STII
GENE
RANTES
BamHI
ADN POL KLENOW
XbaI
ISOLAR FRAGMENTO
DE 303 pb
RI
XbaI
pRANTES
BamHI Pol
StuI
HindIII
pRanTsc
pdh108
pls18
BamHI

FIG. 21

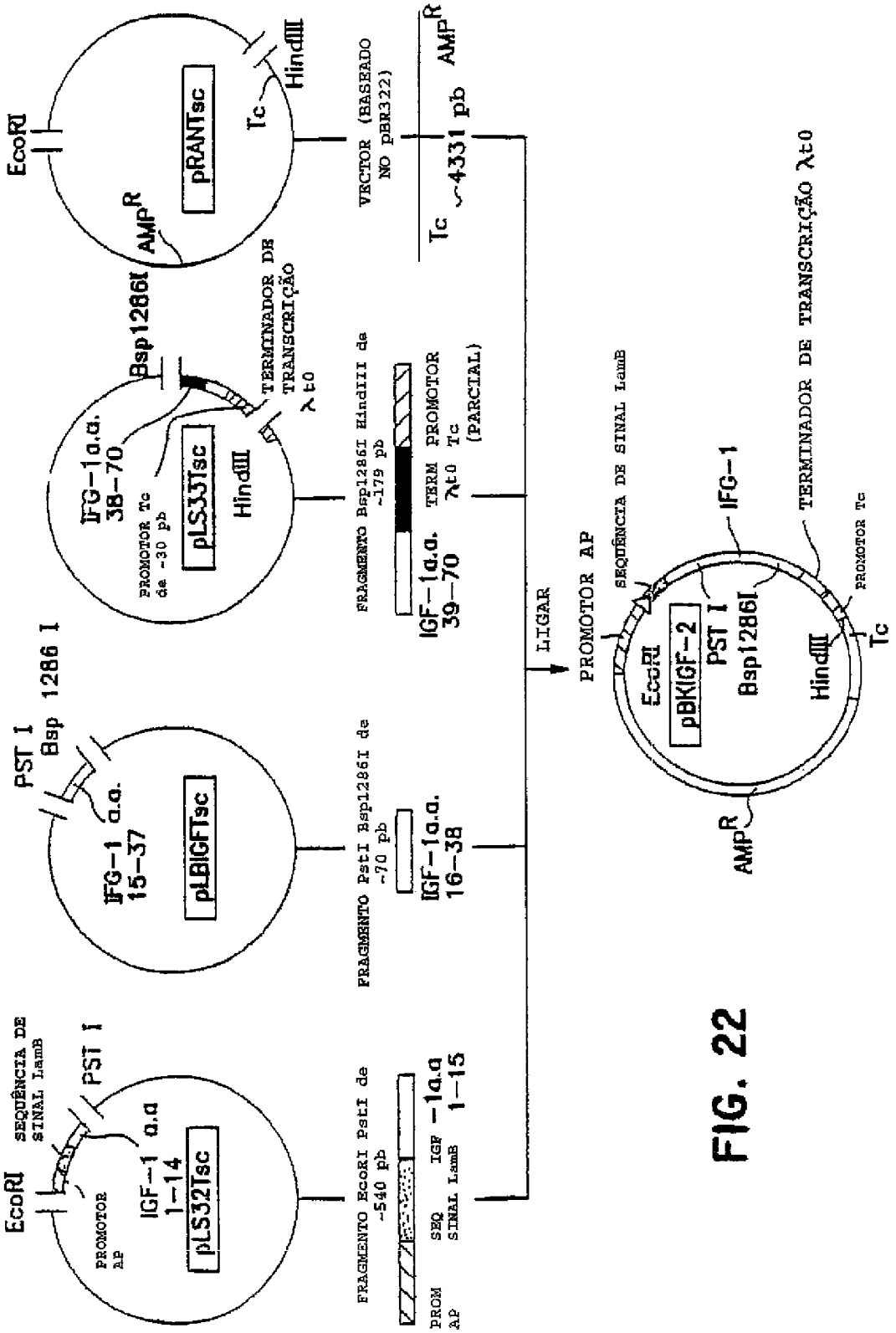

EcoRI
SEQUÊNCIA DE SINAL LamB
PST I
PROMOTOR AP
IGF-1 a.a 1-14
pLS32Tsc
FRAGMENTO EcoRI PstI de -540 pb
PROM AP
SEQ SINAL LamB
IGF -1a.a 1-15
PST I
Bsp 1286 I
IFG-1 a.a. 15-37
pLBIGFTsc
FRAGMENTO PstI Bsp1286I de -70 pb
IGF-1a.a. 16-38
IFG-1a.a. 38-70
PROMOTOR Tc de -30 pb
pLS33Tsc
HindIII
TERMINADOR DE TRANSCRIÇÃO λt0
Bsp1286I
AMPR
pRANTsc
Tc
HindIII
FRAGMENTO Bsp1286I HindIII de -179 pb
IGF-1a.a. 39-70
TERM λt0
PROMOTOR Tc (PARCIAL)
VECTOR (BASEADO NO pBR322)
Tc
~4331 pb
AMPR
LIGAR
PROMOTOR AP
SEQUÊNCIA DE SINAL LamB
EcoRI
pBKIGF-2
PST I
Bsp1286I
HindIII
IFG-1
TERMINADOR DE TRANSCRIÇÃO λt0
PROMOTOR Tc
Tc
AMPR

FIG. 22

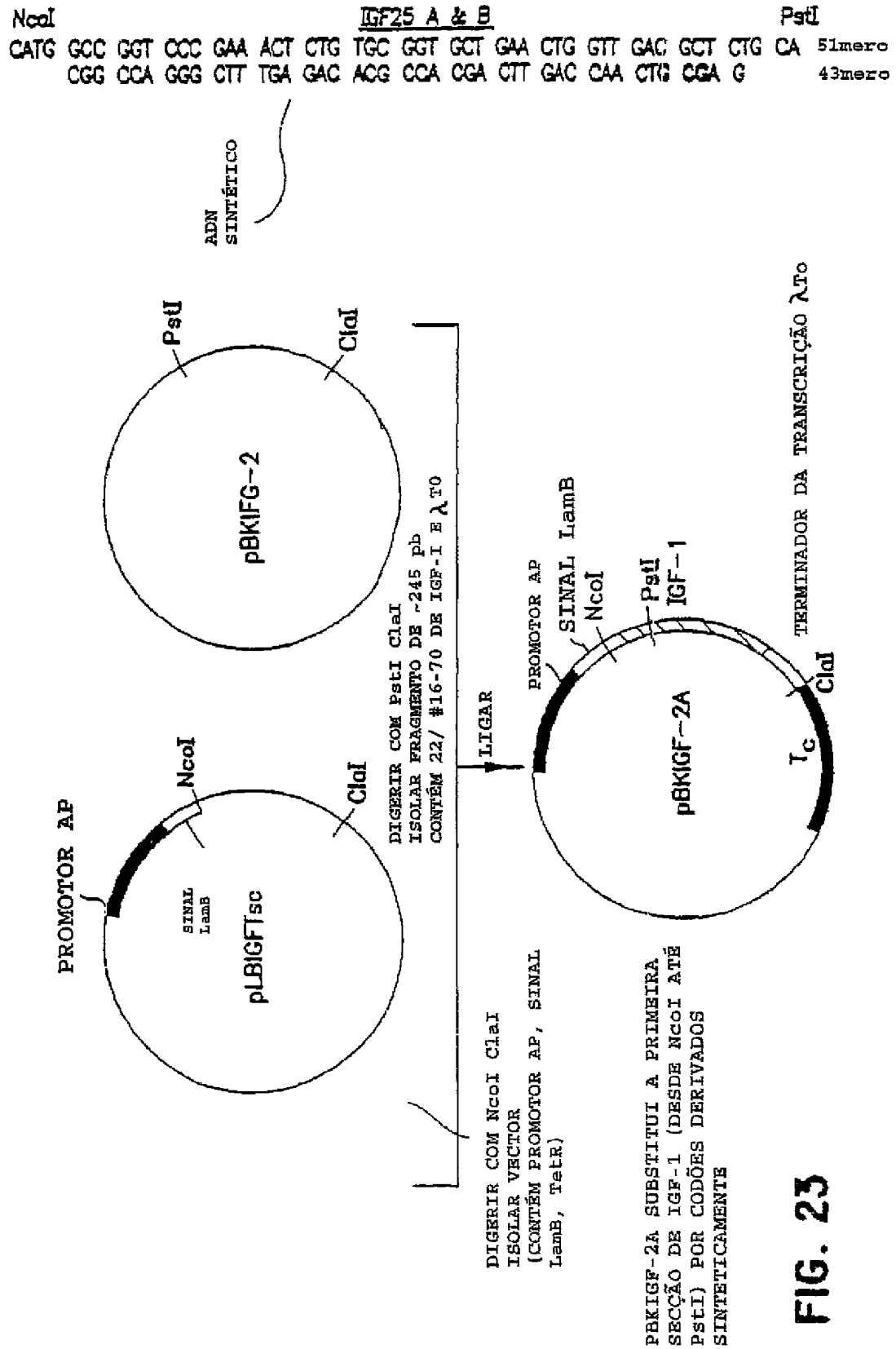

NcoI
IGF25 A & B
PstI
CATG GCC GGT CCC GAA ACT CTG TGC GGT GCT GAA CTG GTT GAC GCT CTG CA 51mero
CGG CCA GGG CTT TGA GAC ACG CCA CGA CTT GAC CAA CTG CGA G 43mero
ADN SINTÉTICO
PstI
ClaI
pBKIFG-2
DIGERIR COM PstI ClaI
ISOLAR FRAGMENTO DE ~245 pb
CONTÉM 22/ #16-70 DE IGF-I E λTO
LIGAR
PROMOTOR AP
NcoI
ClaI
SINAL LamB
pLBIGFTsc
PROMOTOR AP
SINAL LamB
NcoI
PstI
IGF-1
pBKIGF-2A
I_c
ClaI
TERMINADOR DA TRANSCRIÇÃO λTo
DIGERIR COM NcoI ClaI
ISOLAR VECTOR
(CONTÉM PROMOTOR AP, SINAL LamB, TetR)
PBKIGF-2A SUBSTITUI A PRIMEIRA SECÇÃO DE IGF-1 (DESDE NcoI ATÉ PstI) POR CODÕES DERIVADOS SINTETICAMENTE

FIG. 23

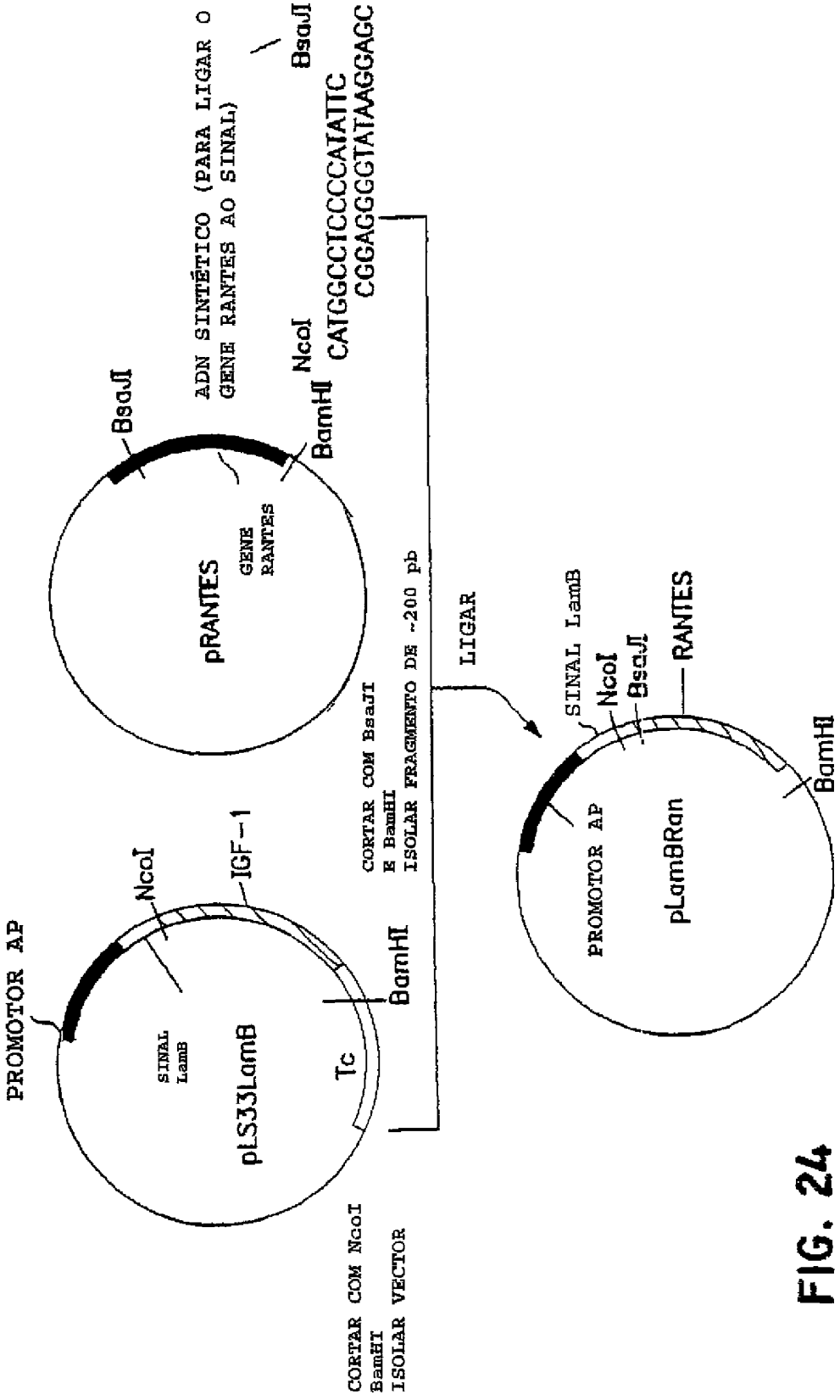

PROMOTOR AP
NcoI
IGF-1
SINAL LamB
pLS33LamB
Tc
BamHI
CORTAR COM NcoI
BamHI
ISOLAR VECTOR
BsaJI
ADN SINTÉTICO (PARA LIGAR O GENE RANTES AO SINAL)
NcoI
BamHI
pRANTES
GENE RANTES
CORTAR COM BsaJI
E BamHI
ISOLAR FRAGMENTO DE ~200 pb
BsaJI
CATGGCCTCCCCATATTC
CGGAGGGGTATAAGGAGC
LIGAR
SINAL LamB
NcoI
BsaJI
RANTES
PROMOTOR AP
pLamBRan
BamHI

FIG. 24

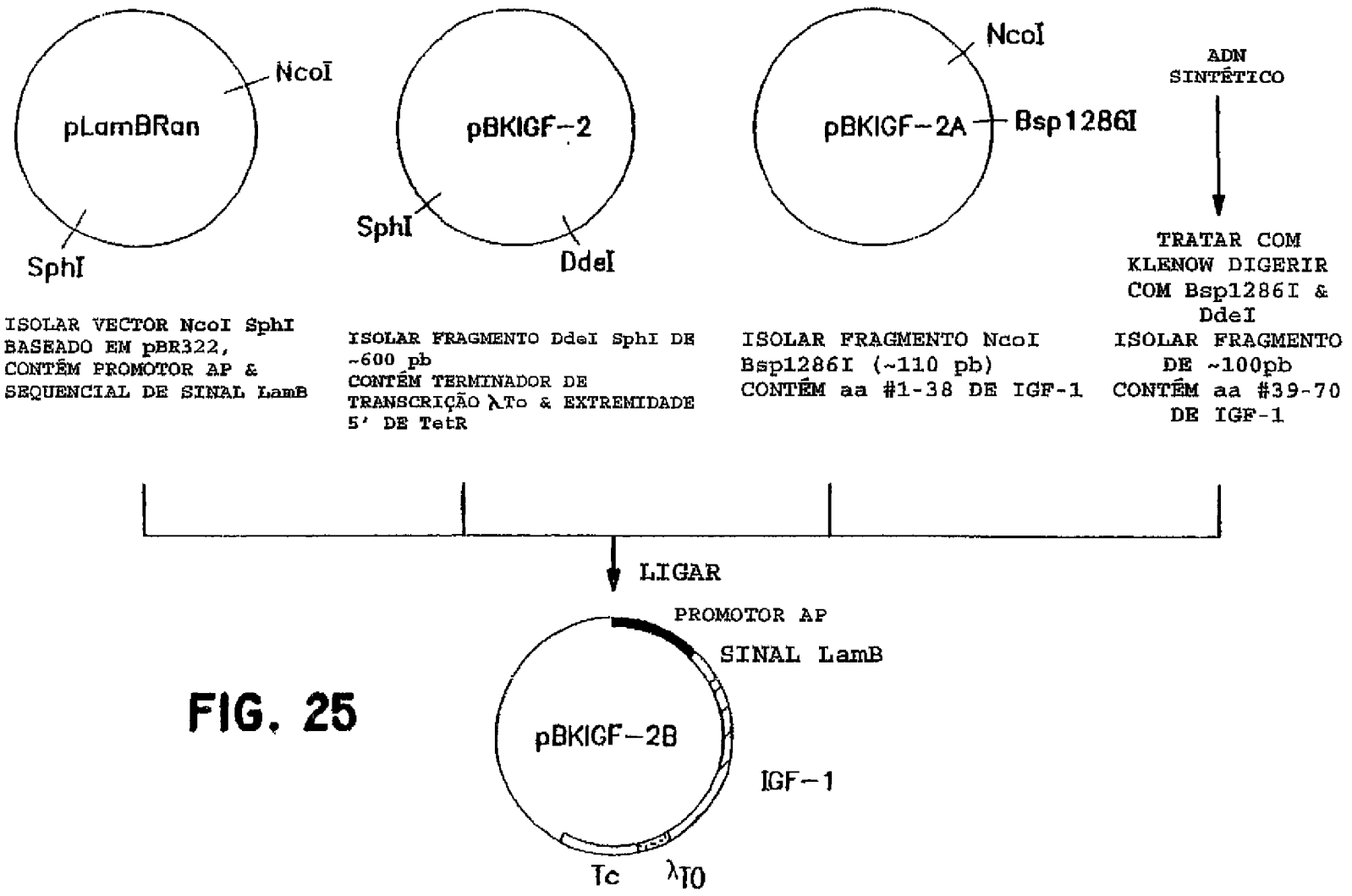
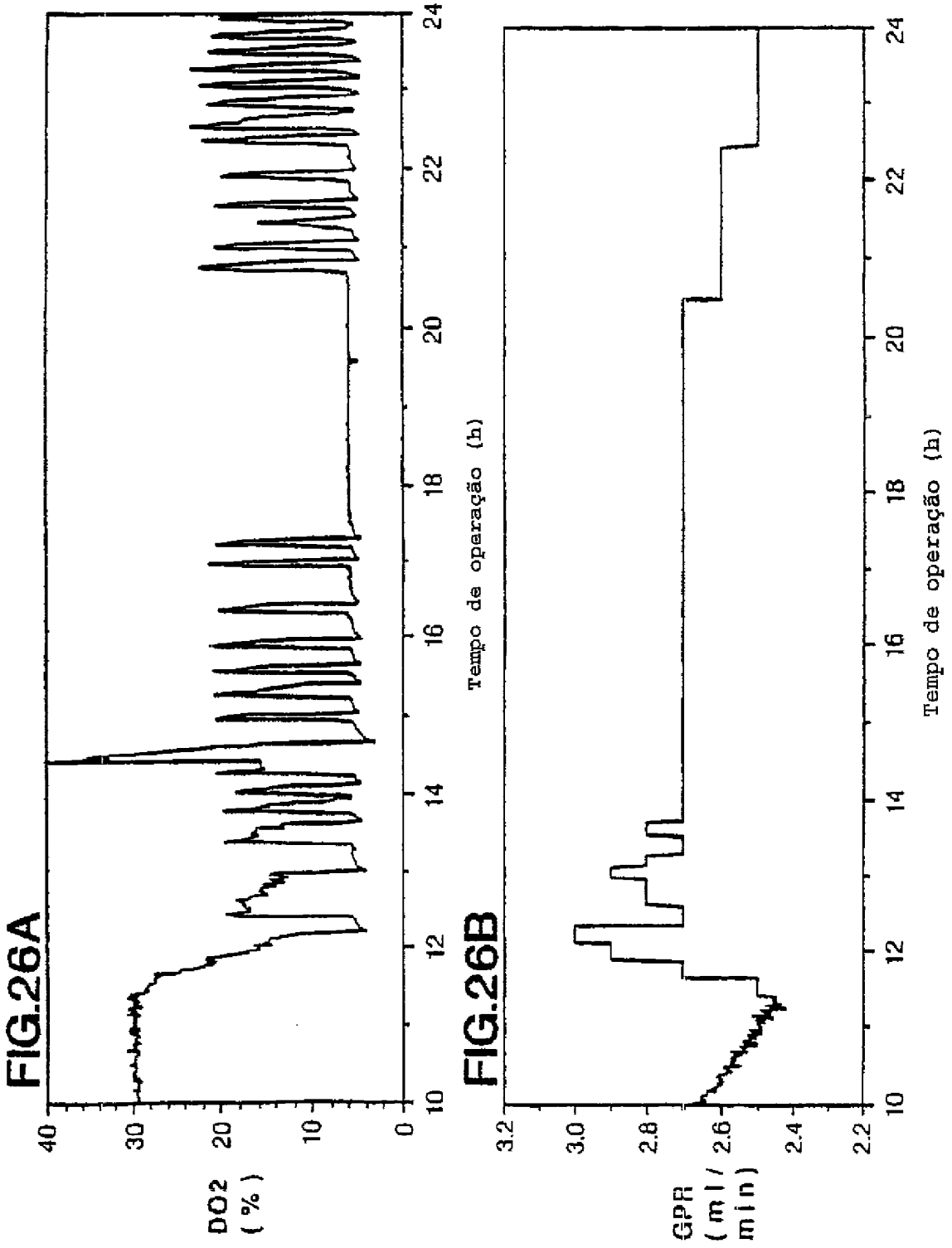

pLamBRan
NcoI
SphI
ISOLAR VECTOR NcoI SphI BASEADO EM pBR322, CONTÉM PROMOTOR AP & SEQUENCIAL DE SINAL LamB
pBKIGF-2
SphI
DdeI
ISOLAR FRAGMENTO DdeI SphI DE ~600 pb CONTÉM TERMINADOR DE TRANSCRIÇÃO λTo & EXTREMIDADE 5' DE TetR
pBKIGF-2A
NcoI
Bsp1286I
ISOLAR FRAGMENTO NcoI Bsp1286I (~110 pb) CONTÉM aa #1-38 DE IGF-1
ADN SINTÉTICO
TRATAR COM KLENOW DIGERIR COM Bsp1286I & DdeI
ISOLAR FRAGMENTO DE ~100pb CONTÉM aa #39-70 DE IGF-1
LIGAR
PROMOTOR AP
SINAL LamB
pBKIGF-2B
IGF-1
Tc
λTO

FIG. 25


FIG.26A
DO2 (%)
40
30
20
10
0
10
12
14
16
18
20
22
24
Tempo de operação (h)
FIG.26B
GPR (ml/min)
3.2
3.0
2.8
2.6
2.4
2.2
10
12
14
16
18
20
22
24
Tempo de operação (h)