



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 802**

51 Int. Cl.:
C12N 15/01 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12M 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04017942 .6**
96 Fecha de presentación : **19.11.1993**
97 Número de publicación de la solicitud: **1524316**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2005**

54 Título: **Procedimiento para determinar la propensión de bacterias a la inestabilidad de oxígeno disuelto.**

30 Prioridad: **23.11.1992 US 989844**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2009

73 Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Swartz, James R.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 326 802 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para determinar la propensión de bacterias a la inestabilidad de oxígeno disuelto.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un procedimiento mejorado para producir polipéptidos mediante fermentación bacteriana. Más específicamente, esta invención se aplica al problema recién hallado de la inestabilidad al oxígeno disuelto que se manifiesta particularmente en fermentaciones bacterianas a gran escala.

Descripción de productos relacionados

La producción de grandes cantidades de polipéptidos y proteínas biológicamente activos y relativamente puros es importante económicamente para la fabricación de formulaciones farmacéuticas, enzimas, y otras especialidades química para humanos y animales. Las técnicas del ADN recombinante han devenido el procedimiento de elección para la producción de muchas proteínas, porque pueden expresarse grandes cantidades de proteínas exógenas, en bacterias y en otras células huéspedes, libres de otras proteínas contaminantes. La expresión de proteínas mediante técnicas de ADN recombinante para la producción de células o partes de células que funcionan como biocatalizadores es también una aplicación importante.

Producir proteína recombinante implica transfectar células huéspedes con ADN que codifica la proteína y cultivar las células en condiciones que favorecen la expresión de la proteína recombinante. La procariota *E. coli* es favorita como huésped porque se le puede hacer producir proteínas recombinantes con rendimientos elevados. Existen numerosas patentes estadounidenses sobre la expresión bacteriana general de ADN que codifica proteínas, incluyendo la patente estadounidense nº 4.565.786 sobre una molécula de ADN recombinante que comprende un gen bacteriano para una proteína portadora extracelular o periplásmica y un gen no bacteriano; la patente estadounidense nº 4.673.641 sobre la coproducción de un polipéptido extraño con un polipéptido formador de agregados; la patente estadounidense nº 4.738.921 sobre un vector de expresión con un promotor/operador *trp* y una fusión *trp* LE con un polipéptido tal como el IGF-1; la patente estadounidense nº 4.795.706 sobre secuencias de control de la expresión para incluirlas con una proteína ajena; y la patente estadounidense nº 4.710.473 sobre plásmidos de ADN circular específicos tales como los que codifican el IGF-1.

La cadena de transferencia electrónica de los organismos bacterianos es capaz de transferir electrones desde sustratos hacia el oxígeno molecular. Los citocromos son un grupo de proteínas que contienen hierro y transfieren electrones en la cadena de transporte electrónico, que actúan de forma secuencial para transferir electrones desde las flavoproteínas hasta el oxígeno molecular. El citocromo terminal de la cadena de transporte electrónico se denomina oxidasa de citocromo.

Cuando una porción del fermentador bacteriano experimenta una concentración baja de oxígeno disuelto (DO_2), el organismo bacteriano es inducido a producir el complejo de la oxidasa del citocromo d. Fu *et al.*, *Mol. Gen. Genetics* 226:209-213 (1991). Este complejo tiene una mayor afinidad por el oxígeno que el complejo de la oxidasa del citocromo o normalmente usado. Anraku y Gennis, *TIBS* 12:262-266 (1987). Por tanto, cuando está presente, el complejo del citocromo d permite que el organismo continúe con la respiración aeróbica en condiciones de baja concentración de oxígeno.

La ubiquinona es el mediador de la cadena de transporte electrónico usado normalmente por las bacterias durante el crecimiento aeróbico vigoroso. Sin embargo, en condiciones definidas con poca exactitud, como la aproximación a la fase estacionaria (Poole y Ingledew, "Pathways of Electrons to Oxygen", en F.C. Neidhart *et al.* (eds.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Vol. 1 (American Society for Microbiology, Washington, DC, 1987), p. 180), se induce la producción de un mediador del transporte electrónico alternativo, la menaquinona. En la mayoría de las fermentaciones a elevada densidad celular, una gran parte del procedimiento se realiza con las células en una condición que se aproxima a la fase estacionaria o a la aproximación a la misma. Esto podría estar causado por la limitación de la fuente de carbono/energía para evitar el agotamiento del oxígeno, por las medidas usadas para inducir la formación del producto, o por la presencia del producto.

El complejo de la oxidasa de citocromo d tiene una mayor afinidad por la menaquinona que por la ubiquinona (Anraku y Gennis, ver más arriba), y presumiblemente usa la menaquinona como su principal mediador en el transporte electrónico cuando está presente la menaquinona. Desafortunadamente, los organismos que utilizan la menaquinona como su mediador del transporte electrónico crecen con una eficiencia mucho más reducida. El rendimiento del crecimiento aeróbico de los organismos que carecen de ubiquinona es aproximadamente del 30% del de un organismo del tipo salvaje. Wallace y Young, *Biochim. Biophys. Acta* 461:84-100 (1977). Se mencionan ejemplos de organismos microbianos con mediadores del transporte electrónico mutados, tales como la oxidasa del citocromo d u oxidasa del citocromo o, en Oden *et al.*, *Gene* 96: 29-36 (1990); Oden y 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.*, *FEBS 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 y Kaback, *Biochemistry* 25:2321-2327 (1986); Tamura-Lis y 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 y Gennis, *J. Bacteriol.* 154:1269-1275 (1983); Bryan y Kwan, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 19 (6):958-964 (1981); Willison *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 10:249-255 (1981); Willison y 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 y Schairer, *Eur. J. Biochem.*, 35:34-45 (1973); Haltia *et al.*, *EMBO J.*, 8(12):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.*, *Biochem.*, 30:3936-3942 (1991); Denis *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:18095-18097 (1990); Chepur *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1018:124-127 (1990); Andersson y Roth, *J. Bacteriol.*, 171:6734-6739 (1989); Puustinen *et al.*, *FEBS Lett.*, 249:163-167 (1989); Daldal, *J. Bacteriol.*, 170:2388-2391 (1988); Poole y Williams, *FEBS Lett.*, 231:243-246 (1988); Georgiou *et al.*, *J. Bacteriol.*, 169:2107-2112 (1987); O'Brian y 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, Nueva Orleans, LA, 26-30 de mayo de 1992, p. 272, Resumen del Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 92:272 (1992); Mogi *et al.*, *Biophys. J.*, 61:A284 (1992); Tron y Lemesle-Meunier, *Curr. Genet.*, 18:413-420 (1990); Shiot *et al.*, *J. Bacteriol.*, 170:5507-5511 (1988); Oden y Gennis, *J. Gen. Biol.*, 107:624A (1988); Webster y Georgiou, *Fed. Proc.*, 44: resumen 678 (1985); Terriere *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111:830-839 (1983); Green y Gennis, *Fed. Proc.*, 41: resumen 3652 (1982); Tamura-Lis y Webster, *Fed. Proc.*, 41: resumen 2799 (1982); Green *et al.*, *Fed. Proc.*, 40:1669 (1981); Willison y John, *J. Gen. Microbiol.*, 115:443-450 (1979); y Hashimoto y Hino, *J. Sci. of Hiroshima Univ. Ser. B, Div. 2 (Bot)*, 15:103-114 (1975).

Los fermentadores para cultivar bacterias normalmente se agitan para transferir oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida (es decir, el medio), y, en segundo lugar, para mantener concentraciones uniformes de los componentes del medio, incluyendo el DO₂ a lo largo del tanque del fermentador. La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que, mientras que durante el cultivo a pequeña escala para conseguir la expresión del ADN en las bacterias el medio de fermentación tiene una concentración de DO₂ relativamente estable, durante la fermentación bacteriana a gran escala se podrían experimentar cambios inesperados y dramáticos, esencialmente incontrolables, en la concentración de DO₂. Estos sucesos impiden la progresión exitosa y reproducible de las fermentaciones a gran escala, haciéndolas inapropiadas para la producción de proteínas u otros productos de elevada calidad. Cuando los cultivos se hacen crecer con limitación de glucosa u otra fuente de carbono/energía, puede programarse el control de la alimentación de la fuente de carbono/glucosa para proporcionar una concentración de DO₂ adecuada en la mayoría de las circunstancias; sin embargo, se ha encontrado en la presente invención que en los grandes reactores esta acción de control no es suficiente para contrarrestar los sucesos biológicos repentinos.

En consecuencia, es un objetivo de esta invención proporcionar un procedimiento efectivo y fiable para evitar el problema de las inestabilidades del DO₂ recientemente observadas en las fermentaciones bacterianas.

Es un objetivo particular conseguir una progresión exitosa y reproducible de las fermentaciones bacterianas, especialmente las fermentaciones a gran escala, para producir polipéptidos de elevada calidad en un proceso GMP mejorado para su aprobación por parte de la FDA, y/o producir los polipéptidos con mayor rendimiento.

Es todavía otro objetivo proporcionar un procedimiento para determinar la propensión de un cultivo a la inestabilidad del DO₂ durante el curso de una fermentación bacteriana.

Estos y otros objetivos serán evidentes a aquellos con una formación ordinaria en la técnica.

Resumen de la invención

Esta invención se basa en el hallazgo inesperado de que los cambios repentinos en el contenido de DO₂ tienen un origen biológico, y están relacionados con el cambio del organismo entre diferentes vías respiratorias. Una comprensión concienzuda de estos sucesos sugiere que pueden prevenirse mediante el diseño y operación cuidadosos del recipiente de fermentación y/o del proceso de fermentación.

Una solución es garantizar que la región de máximo suministro de oxígeno a la fase líquida, es decir, el fondo del recipiente, es también la región de máxima entrada de glucosa. Por tanto, el fermentador se diseña para que tenga la entrada de glucosa en el fondo del mismo.

En una configuración de fermentador alternativa, los puntos y proporciones de entrada de glucosa pueden distribuirse a lo largo del recipiente para igualar aproximadamente la proporción de disponibilidad de oxígeno en las diferentes regiones del recipiente.

Para las fermentaciones alimentadas en lotes, en las que el volumen creciente de caldo significa a menudo cambios significativos en la relación geométrica entre las palas del agitador y el volumen de líquido, y en los grandes fermentadores, es decir, aquellos que tienen al menos aproximadamente 1000 litros de capacidad, preferiblemente

aproximadamente de 1000 a 100.000 litros de capacidad, la solución preferida al problema tratado por esta invención para permitir el uso más eficiente del recipiente de fermentación, es mutar el organismo huésped para inactivar un elemento clave de las vías respiratorias (p. ej., complejo de la oxidasa del citocromo d, complejo de la oxidasa o del citocromo, menaquinona, o una de las deshidrogenasas NADH) de modo que el organismo ya no puede cambiar entre las dos vías de transporte del electrón.

Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la propensión de un cultivo de células bacterianas para la inestabilidad de DO₂ en un fermentador a gran escala que comprende (a) cultivar el cultivo celular en presencia de una fuente de carbono/energía introducida a una velocidad de alimentación establecida en un fermentador de pequeña escala configurado para que la concentración de DO₂ a través del cultivo celular no es homogénea durante la fermentación, (b) tras la producción de masa celular significativa, incrementa la velocidad de alimentación de la fuente de carbono/energía, y (c) determinar si se produce no-linealidad en la pendiente de la concentración de DO₂ respecto al tiempo o si oscilaciones en la concentración de DO₂ son inducidas tras el incremento de la velocidad de alimentación de la fuente de carbono/energía.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la configuración de un fermentador de 10 litros diseñado para imitar las inestabilidades a gran escala del DO₂.

La Figura 2 ilustra el linaje de la cepa huésped de *E. coli* W3110 denominada 27C7 con proteasa defectuosa.

Las Figuras 3A y 3B ilustran los esquemas para la mutación de los genes *tonA* y *phoA*, respectivamente, en la cepa W3110 de *E. coli*.

La Figura 4 ilustra en detalle la construcción para la eliminación del gen *tonA* de W3110.

La Figura 5 ilustra la construcción del plásmido pLS32, un plásmido intermediario, en la preparación del pLS32Tsc, el cual contiene un gen que codifica el IGF-1.

La Figura 6 ilustra la construcción de pAPlamB, otro plásmido intermediario en la preparación del pLS32Tsc y en la preparación de un plásmido intermediario adicional, pLamBIGF.

La Figura 7 ilustra la construcción del pLS32lamB, aún otro plásmido intermediario en la construcción del pLS32Tsc.

La Figura 8 ilustra la construcción del pLS33lamB, otro plásmido intermediario en la construcción del pLS32Tsc.

La Figura 9 ilustra la construcción del pLS32Tsc, otro intermediario en la preparación del pLS32Tsc y en la del pBKIGF-2, siendo éste último un plásmido intermediario en la preparación de otro vector de expresión usando en los ejemplos siguientes, a saber, el pBKIGF-2B.

La Figura 10 ilustra la construcción del pLS32Tsc a partir del pLS33Tsc y pLS32lamB.

La Figura 11 ilustra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia señal *lamB* y el gen del IGF-1 en el plásmido pLS32Tsc (SEC. N° ID. 11 y 12 respectivamente).

La Figura 13 ilustra la velocidad de la bomba de glucosa en g/min (Figura 13A) y el porcentaje de DO₂ (Figura 13B) respecto el tiempo durante una fermentación de 1000 litros de la cepa 27C7 transformada con pLS32Tsc.

La Figura 14 ilustra el porcentaje de DO₂ (rombos negros) y la velocidad de la bomba de glucosa (círculos vacíos) respecto el tiempo durante una fermentación de 1000 litros de la cepa 27C7 transformada con pLS32Tsc, en donde la velocidad de alimentación de glucosa está bajo control manual.

La Figura 15 es un diagrama básico del fermentador de 1000 litros modificado para investigar la inestabilidad del DO₂.

La Figura 16 ilustra un análisis de la inestabilidad del DO₂ respecto el tiempo, en el fermentador de 1000 litros, de la cepa 27C7 transformada con pLS32Tsc, en donde se utilizan la alimentación de glucosa superior e inferior. El % de DO₂ en el fondo del recipiente se representa mediante cuadrados, el % de DO₂ en la parte superior del recipiente se representa mediante círculos, y la velocidad de alimentación de glucosa (3 g/min) se representa mediante una línea sólida.

La Figura 17 muestra un mapa de restricción del plásmido p200, usado para producir el pLamBIGF, un plásmido intermediario en la producción del pLBIGFTsc, usado para preparar el pBKIGF-2.

La Figura 18 ilustra la secuencia de nucleótidos del fragmento *EcoRI-EcoRI* (entre las posiciones 1149 a 1633) del p200 que contienen las secuencias de los genes de MF alpha I prepro e IGF-1 (SEC. N° ID. 13).

La Figura 19 ilustra la construcción del pLamBIGF a partir de tres fragmentos de plásmidos y una pieza de ADN sintético (SEC. N° ID. 14 y 15). El pLamBIGF es un plásmido intermediario en la producción del pLBIGFTsc, usado para preparar el pBKIGF-2.

La Figura 20 ilustra la construcción del plásmido intermediario pLBIGFTsc a partir del pLamBIGF.

La Figura 21 ilustra la construcción del plásmido intermediario pRanTsc usado en la producción de pBKIGF-2.

La Figura 22 ilustra la construcción del pBKIGF-2 a partir del pLS32Tsc, pLBIGFTsc, pLS33Tsc, y pRanTsc.

La Figura 23 ilustra la construcción del pBKIGF-2A, usado para preparar el pBKIGF-2B, a partir del pLBIGFTsc, pBKIGF-2 y una pieza de ADN sintético (SEC. N° ID. 16 y 17).

La Figura 24 ilustra la construcción del pLamBRan, usado para preparar el pBKIGF-2B, a partir del pLS33LamB, pRANTES y una pieza de ADN sintético (SEC. N° ID. 18 y 19).

La Figura 25 ilustra la construcción del pBKIGF-2B a partir del pBKIGF-2, pBKIGF-2A, pLamBRan, y una pieza de ADN sintético (SEC. N° ID. 20 y 21).

La Figura 26 ilustra el % de DO₂ (Figura 26A) y la velocidad de la bomba de glucosa (ml/min) (Figura 27B) respecto el tiempo, en el fermentador de 10 litros modificado mostrado en la Figura 1, con un organismo derivado de la cepa 27C7, denominado 37D6, transformado con el vector de expresión pBKIGF-2B.

Descripción de las realizaciones preferidas

A. Definiciones

Tal como se usa en ésta, “IGF-I” se refiere al factor del crecimiento parecido a la insulina procedente de cualquier especie, incluyendo la bovina, la ovina, la porcina, la equina, y preferiblemente la humana, en su secuencia nativa o en una forma variante, y producido de forma recombinante. En un procedimiento preferido, se clona el IGF-I, y su ADN se expresa, por ejemplo, mediante el proceso descrito en la EP 128.733, publicada el 19 de Diciembre de 1984.

Tal como se usa en ésta, la frase “fuente de carbono/energía” se refiere a una fuente de carbono y energía para las células. Los ejemplos de una fuente tal incluyen el glicerol, el succinato, el lactato, y los azúcares tales como, por ejemplo, la glucosa, la lactosa, la sacarosa y la fructosa. La selección de la fuente de carbono/energía concreta a emplear dependerá principalmente de la bacteria que se esté utilizando. La fuente de carbono/energía preferida para la fermentación de *E. coli* es la glucosa.

Tal como se usa en ésta, la frase “cadena de transporte electrónico” o “cadena respiratoria” se refiere a la cadena consistente en una serie de “portadores de electrones” en bacterias, capaz de transferir electrones desde un moléculas sustrato al oxígeno molecular. Por tanto, están implicadas en la vía de respiración aeróbica de, y en la promoción de la transferencia de oxígeno dentro de, las bacterias. Estos portadores de electrones incluyen, pero no se limitan a, una deshidrogenasa de NADH, una quinona tal como la ubiquinona y la menaquinona, y un componente del complejo de la oxidasa del citocromo o o del complejo de la oxidasa del citocromo d.

Un organismo bacteriano con una cadena de transporte electrónico “deteriorada” o “desactivada” se refiere a bacterias que se han mutado con objeto de hacer inactivo o desactivar al menos uno de, pero no todos, los portadores de electrones que constituyen sus cadenas de transporte electrónico. Esta mutación podría hacerse mediante la supresión del componente genético que representa un portador de electrones, o, alternativamente, mediante alteraciones en los nucleótidos del componente genético, de tal forma que ya no funcione de la forma definida más arriba. Por tanto, por ejemplo, si el componente genético es la oxidasa del citocromo o o d, el organismo podría producir el producto del gen de la oxidasa del citocromo o pero no el producto del gen de la oxidasa del citocromo d, o el producto del gen de la oxidasa del citocromo d pero no el producto del gen de la oxidasa del citocromo o. El organismo bacteriano preferido tiene desactivado un gen de la oxidasa del citocromo d u o, más preferiblemente un gen de la oxidasa del citocromo o desactivado, y más preferiblemente carece de este último gen.

Tal como se usa en ésta, la fermentación a “gran escala” se refiere a la fermentación en un fermentador que al menos tiene aproximadamente 1000 litros de capacidad volumétrica, es decir, de volumen de trabajo, dejando el sitio adecuado para el espacio superior. La fermentación a “pequeña escala” se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, preferiblemente no más de aproximadamente 10 litros.

En esta invención, se usa un aparato de fermentación especialmente configurado para determinar la propensión de un determinado cultivo de células bacterianas a la inestabilidad del DO₂ durante el progreso de una fermentación bacteriana a gran escala. Este procedimiento de monitorización utiliza un fermentador a pequeña escala. El fermentador está configurado de tal forma que la concentración de DO₂ a lo largo del cultivo no es homogénea durante la fermentación. Esta no-homogeneidad puede conseguirse por diversos medios. Un medio preferido es equipar el fermentador con una entrada que está en su parte superior para introducir la fuente de carbono/energía. Otra configuración es equipar el fermentador sólo con dos palas impulsoras, en vez de con las tres normalmente usadas, de tal forma que

halla un mezclado pobre en la parte superior del fermentador. Preferiblemente, se implementan ambas, la entrada de la fuente de carbono/energía y las dos palas impulsoras, en el aparato fermentador. Otra característica preferida es que el fermentador no sólo tiene una sonda para el DO_2 , sino también una sonda redox para medir el potencial redox. Estas sondas se montan en el fermentador preferiblemente lo más cerca de la pala impulsora de más abajo.

La realización más preferida usada para este procedimiento es un fermentador de 10 litros, el diagrama del cual se muestra en la Figura 1. En esta figura, el recipiente (1) está equipada con dos palas impulsoras, una pala impulsora inferior (3) y una superior (5), preferiblemente palas impulsoras del tipo Rushton, montadas sobre un eje vertical (7) operado normalmente a 150-1000 r.p.m. Las dos palas impulsoras están ubicadas significativamente por debajo (es decir, por debajo al menos de un cuarto del volumen total) de la superficie (9) del medio de fermentación. Un medio (11) de entrada de aire, preferiblemente un difusor de aire con forma de anillo o un difusor de aire rotativo, se usa para introducir aire en el fondo del fermentador, preferiblemente a aproximadamente 10 litros estándares por minuto.

Una sonda de DO_2 (13), preferiblemente montada sobre la pared de el recipiente, cerca de la pala impulsora del fondo (3), mide la concentración de oxígeno disuelto en el medio de fermentación (y, por tanto, asequible al organismo) en el fondo de el recipiente. Esa señal se envía preferiblemente a un ordenador de monitorización y control, el cual regula la velocidad de alimentación de la fuente de carbono/energía para las bacterias (tal como la glucosa) al fermentador. El tanque está equipado también con una sonda redox (15) montada preferiblemente sobre la pared del tanque al mismo nivel que la sonda de DO_2 , cerca de la pala impulsora inferior (3). Esta sonda redox mide el potencial redox del medio a través de una señal para retransmitir la salida de un potencial redox. En esta configuración, la fuente de carbono/energía se suministra a través de un medio de entrada de líquido (17), tal como un tubo, hacia la parte superior del recipiente. No se muestra una línea de alimentación hacia la parte superior del recipiente que se usa para añadir NH_4OH bajo demanda para controlar el pH del caldo. Tampoco se muestra otra línea de alimentación hacia la parte superior del recipiente, la cual podría usarse para la alimentación lenta de nutrientes complejos.

El procedimiento para determinar la propensión de un cultivo de células bacterianas a la inestabilidad del DO_2 en fermentadores a gran escala implica el cultivo, en el recipiente descrito más arriba, de bacterias que contienen el ADN que se desea expresar en un medio de fermentación. Durante este paso de cultivo inicial se alimenta una fuente de carbono/energía para las bacterias, tal como la glucosa, con una velocidad predeterminada, hacia el medio de fermentación. En la Figura 1, esta alimentación ocurriría a través del medio de entrada superior (17) del fermentador. El aire se suministra al fondo del fermentador. En la Figura 1, el aire se suministra al medio de fermentación a través del medio de entrada inferior (11). El potencial redox y la concentración de DO_2 del medio de fermentación se monitoriza durante la fermentación por medio de las respectivas sondas para los mismos (13) y (15).

Cuando se ha acumulado una masa celular significativa, es decir, cuando el cultivo tiene una capacidad de captar de oxígeno suficiente para exceder la velocidad de transferencia de oxígeno del reactor, es decir, aproximadamente 10-50 gramos por litro de células, en peso seco, la velocidad de alimentación de la fuente de carbono/energía se incrementa para llevar el DO_2 desde su punto de ajuste de control hacia un valor inferior. Este incremento en la velocidad de alimentación preferiblemente es sólo un ligero incremento de tal forma que el DO_2 se disminuye ligeramente. Un declinar significativo del DO_2 (es decir, un cambio desde una pendiente gradual a una pendiente rápida en la gráfica de DO_2 respecto al tiempo), y/o la capacidad de inducir oscilaciones en el DO_2 a la velocidad de suministro de glucosa más elevada determinada experimentalmente, indican la propensión del cultivo a producir inestabilidades en el DO_2 .

Los ejemplos siguientes se proporcionan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

Introducción

Se ha hallado en ésta que, cuando el organismo se había inducido previamente en presencia de menaquinona y del complejo de la oxidasa del citocromo d, éste tenía la capacidad de capturar bajas concentraciones de oxígeno pero que lo hacía ineficientemente. Cuando hay suficiente oxígeno presente, parecería que a esta vía ineficiente no se la deja funcionar.

Un examen de la estequiometría del crecimiento celular revela las consecuencias de la utilización ineficiente del oxígeno facilitada por la menaquinona. La composición en C, H, O y N de *E. coli* es aproximadamente $\text{C}_{4,18}\text{H}_{7,36}\text{N}_1\text{O}_{2,03}$. La ecuación que describe el crecimiento aeróbico puede escribirse como: $a\text{C}_6\text{H}_{16}\text{O}_6 + b\text{O}_2 + c\text{NH}_3 = d\text{C}_{4,18}\text{H}_{7,36}\text{N}_1\text{O}_{2,03} + e\text{CO}_2 + f\text{H}_2\text{O}$.

Usando esta ecuación, pueden estimarse los moles de oxígeno usados por mol de glucosa como una función del rendimiento del crecimiento, tal como se muestra en la tabla siguiente:

Rendimiento del crecimiento (g célula/g glucosa)	moles O_2 /mol glucosa
0,4	3,1
0,7	5,3
0,0	6,0

Si un cultivo de *E. coli* que ha expresado el complejo de la oxidasa del citocromo d y la menaquinona encuentra una región de concentración baja de DO₂, el sistema de la oxidasa del citocromo o, con su menor afinidad por el oxígeno, ya no es capaz de sostener la respiración aeróbica. Por tanto, debe usarse la vía de respiración mediada por la oxidasa del citocromo d. Este cambio a la vía respiratoria ineficiente reduce el aporte de ATP y causa un rendimiento inferior del crecimiento. Como resultado, el oxígeno usado por mol de glucosa alimentado aumenta. Puesto que el recipiente ya está en un estado que permite regiones locales con baja concentración de DO₂, el consumo de oxígeno incrementado expandirá la región de concentración de DO₂ baja siempre y cuando el aporte de glucosa permanezca constante. Esto causa que más células cambien a la vía ineficiente y incrementa aún más la demanda local y global de oxígeno.

Por tanto, hay una tendencia hacia un desplazamiento rápido, auto-propagado, hacia velocidades de respiración más elevadas y concentraciones de DO₂ más bajas a lo largo de la totalidad del tanque. Esta progresión sólo cesará si hay (por medio de incrementar la fuerza que dirige el oxígeno puesto que la concentración de DO₂ está disminuida) bastante capacidad de transferencia de oxígeno para soportar la mayor velocidad de utilización de oxígeno que acompaña la respiración ineficiente. Puesto que es deseable utilizar completamente la máxima capacidad del fermentador para transferir oxígeno, cualquier exceso de capacidad disponible en la operación normal probablemente no será suficiente, y la concentración de DO₂ en todo el recipiente será llevada a cero.

Esta invención emplea los medios necesarios para superar la tendencia de la operación a perder eficiencia como resultado de este cambio auto-propagador.

Se obtuvieron datos reveladores modificando el gran fermentador para seguir el nivel de DO₂ en ambos, el fondo y la parte superior del recipiente. A continuación se usó un fermentador de 10 litros modificado para replicar las inestabilidades de DO₂ en el fermentador grande. Se usaron mutaciones en los complejos de oxidasas de citocromos para confirmar el cambio entre las vías de respiración como el origen de las inestabilidades en el DO₂. Los huéspedes mutados se evaluaron también por su conveniencia para producir proteínas recombinantes heterólogas. Sorprendentemente, el mutante de la oxidasa del citocromo o se mostró superior al mutante de la oxidasa del citocromo d, y produjo cantidades equivalentes del producto comparado con el huésped de comparación isogénico no mutado en un fermentador de 10 litros no modificado.

Ejemplo 1

Identificación del problema de inestabilidad del DO₂ en el fermentador de 1000 l

i. Construcción de la cepa 27C7 de la célula huésped

El huésped usado para producir el IGF-I humano recombinante en la fermentación descrita en este ejemplo fue un derivado de *E. coli* W3110 denominado 27C7. El genotipo completo de 27C7 es *tonAΔ prt3 phoAΔE15 Δ(argF-lac) 169 ompTΔ degP41kan^r*. La derivación de la cepa 27C7 se esquematiza en la Figura 2 y se describe más abajo. La cepa 27C7 se depositó el 30 de octubre de 1991 en la American Type Culture Collection como ATCC N° 55.244.

La cepa 27C7 se construyó en varios pasos usando técnicas que implican transducciones con el fago P1kc, derivado del P1 (J. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1972)), y la genética de transposones (Kleckner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 116:125-159 (1977)). El huésped de partida usado fue *E. coli* K12 W3110, el cual es una cepa K12 que es F⁻, λ⁻ (Bachmann, *Bact. Rev.* 36:525-557 (1972); Bachman, "Derivatives and Genotypes of Some Mutante Derivatives of *Escherichia Coli* K-12", pp. 1190-1219, en 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)).

Primero, se suprimió el gen *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 edición, pp. 807-876, en 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)) de W3110 mediante la inserción y subsiguiente excisión imprecisa de un transposón *Tn10* en el gen *tonA*. Esta construcción se esquematiza en las Figuras 3B y 4.

En el primer paso de esta procedimiento, *E. coli* W3110 se transdujo con λ::*Tn10* para generar un conjunto de salto *Tn10* de *E. coli* W3110 (Kleckner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, ver más arriba).

El conjunto de *E. coli* W3110::*Tn10* se cultivó en medio L a 37°C hasta una densidad de aproximadamente 1 × 10⁹/ml. Se centrifugaron un total de 5 ml del cultivo y el precipitado se resuspendió en 0,2 ml de un lisado de λphi80 que contenía 7,0 × 10⁹ pfu. Se dejó adsorber el fago durante 30 minutos a 37°C. A continuación se extendió la suspensión sobre placas EMB y se complementó con tetraciclina (15 µg/ml). Después de una incubación durante la noche a 37°C, se juntaron las colonias en 3 ml de medio L, se dejaron crecer durante la noche a 37°C, se lavaron dos veces, y se resuspendieron en medio L. Se preparó un lisado del bacteriófago P1kc sobre este cultivo (Miller, J.H., *Experiments in Molecular Biology*, ver más arriba, página 304).

Se transdujo *E. coli* AT982 (no° 4546, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haver, Conn.) a resistente a la tetraciclina mediante este lisado de P1kc. Los transductantes se seleccionaron sobre placas de medio L complementadas con

tetraciclina (15 µg/ml) y 40 µg/ml de ácido diaminopimélico (dap). Los transductantes resultantes se examinaron en busca de resistencia a la tetraciclina y la regeneración del gen *dap* (*dap*⁺, *tet*^R). Los transductantes con el genotipo *dap*⁺, *tet*^R se ensayaron a continuación por su resistencia a *λphi80*.

5 A continuación se prepararon lisados de P1kc de varias cepas *dap*⁺, *tet*^R, *λphi80*-resistentes. Los lisados se usaron para transducir *E. coli* W3110 a la resistencia a la tetraciclina. Los transductantes se examinaron y seleccionaron por su resistencia *λphi80*.

10 Se seleccionaron aislados sensibles a la tetraciclina a partir de transductantes *tonA::Tn10-λphi80*^R. (Maloy y Nunn, *J. Bacteriol.* 145:1110 (1981)). Estos aislados se comprobaron por su resistencia *λphi80* y sensibilidad a la tetraciclina después de la purificación de una colonia individual.

15 Se aisló el ADN procedente de varios mutantes *λphi80*-resistentes y se digirieron con *Sst*II. El ADN digerido con *Sst*II se caracterizó mediante el procedimiento de transferencia Southern usando como sonda DNA de *λ::Tn 10*, digerido con *Sst*II y marcado radiactivamente, para determinar si el *Tn 10* había sido extraído (Davis *et al.*, *Advanced Bacterial Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1980)). Se observó que uno de los aislados sensibles a la tetraciclina había perdido dos de las bandas de hibridación del *Tn 10* en comparación con la hibridación entre ADN procedente del *λ::Tn 10* y el W3110 *tonA::Tn10 λphi80R*. Una tercera banda de hibridación tenía una movilidad alterada, indicando que había ocurrido una supresión causada por el corte impreciso del *Tn 10*.

20 La electroforesis en gel-SDS de preparaciones de la membrana externa procedente de la cepa con una extracción de *Tn 10* imprecisa reveló que la banda que se asumía era la proteína codificada por *tonA* tenía una movilidad electroforética alterada en comparación con la proteína del tipo salvaje codificada por el gen *tonA*. La proteína resultante no fue funcional como un receptor del fago *λphi80*. Una segunda cepa independiente que también había experimentado una extracción imprecisa del *Tn10* no mostraba proteína alguna codificada por el *tonA* en el gel con SDS.

30 Ninguna de estas cepas presentó reversión de la resistencia a la tetraciclina o de la susceptibilidad respecto el *λphi80*, indicando que había un corte impreciso de la totalidad o parte del transposón *Tn10* junto con una supresión parcial o completa del gen *tonA*. Por tanto, la proteína codificada por el gen *tonA* (PM: 78.000) fue eliminada de la membrana exterior, haciendo la cepa *tonA* de W3110 resistente a varios bacteriófagos. La cepa resultante, denominada 1A2, es resistente a los bacteriófagos T1 y φ60.

35 El gen *ptr3* (Cheng *et al.*, *J. Bacteriol.* 140:125-130 (1979)) fue introducido en la 1A2 tal como sigue. Primero, se aisló la mutación *thyA8* en 1A2 mediante selección por resistencia a la trimetoprima para formar la cepa 9E1. Primero, se aisló la mutación *thyA8* en 1A2 seleccionando por la resistencia a la trimetoprima. A continuación, se transportó el locus *argA81::tn 10* desde 9D9 (obtenida de B. Bachman, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, Conn.) a 9E1 mediante transducción con el fago P1kc para formar 9E3. El locus *ptr3* se halla entre *thyA8* y *argA81*. La transducción con el fago P1 crecido sobre un mutante *ptr3* (9D7, *J. Bact.* 140:125 (1979)) resultó en la introducción de la mutación *ptr3* simultáneamente con la conversión de *thyA8* y *argA81::Tn10* al locus del tipo salvaje. Esta cepa, denominada 9E4, carece de la proteasa III periplásmica. La conclusión de que la mutación *ptr3* está incluida en 9E4 está apoyada por la acumulación intensamente mejorada de IGF-1 en la cepa resultante.

45 A continuación, se transfirieron simultáneamente dos mutaciones por supresión más, *phoAΔE15* (Sharthy *et al.*, *J. Bacteriol.* 145:288-292 (1981)) y *Δ(argF-lac)169* (Schweizer y Boos, *Mol. Gen. Genet.* 192:293-294 (1983)), a 9E4 mediante engarce genético con un transposón de resistencia a la kanamicina insertado en un gen biosintético de la prolina (*proC::Tn5*), contenido en 6D3, obtenida del Profesor Barry Wanner, Purdue University. Esta construcción se esquematiza en la Figura 3B.

50 El transposón se eliminó seleccionando en busca de un aislado prototrófico (*pro*⁺) sobre placas de agar mínimo con glucosa después de la transducción P1 con 1A2. La introducción de la mutación *phoA* elimina la expresión de la fosfatasa alcalina y se reconoció puesto que los transductantes forman colonias blancas sobre placas de agar mínimo con glucosa con fosfato 0,2 M y 20 mg/l de 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato. De igual forma, la mutación *Δ(argF-lac)169* causa la pérdida de la enzima beta-galactosidasa (un fenotipo *lac*⁻) y resulta en células que forman colonias blancas sobre placas de agar MacConkey con lactosa al 1%. La cepa resultante se denominó 27A7.

55 Se introdujo la supresión *ompT* (Earhart *et al.*, *FEBS Microbiol. Lett.* 6:277-280 (1979)) en 27A7 mediante co-transducción con P1. Debería destacarse que esta supresión *ompT* se extiende hacia el grupo de genes *ent* vecino que codifica las proteínas de anclaje para las colicinas B y D. Primero, se insertó una inserción *Tn10* unida en el gen *purE* junto a la supresión *ompT* usando técnicas de transducción convencionales (intermediarios 3E9 (cepa similar obtenible de la Dra. Carol Gros, University of Wisconsin), 16B2, 25C9 (*J. Bacter.* 153:1104-1106 (1983)), y 25D3). A continuación, se transdujo el *purE::Tn10* en 27A7. Finalmente, se transdujo esta cepa a prototrófica para la purina para suprimir el transposón. El mantenimiento del genotipo *ompT* se confirmó mediante resistencia a la colicina B en la cepa resultante, la cual se denominó 27C6. Esta cepa carece de la proteasa VII de la membrana externa.

65 Finalmente, la adición de la mutación de la proteasa periplásmica, *degP41kan*['] (Strauch *et al.*, *J. Bacteriol.* 171:2689-2696 (1989); Harvard Medical School) se transdujo en la cepa 27C6 mediante técnicas estándares. Esta mutación se construyó *in vitro* reemplazando una sección del gen *degP* con el gen de la kanamicina. Esto no es un transposón, pero permite la selección de la supresión usando la resistencia a la kanamicina.

Esta cepa final, 27C7, tiene las siguientes características: es resistente a los fagos, carece de tres proteasas, no consigue crecer sobre lactosa, y no consigue producir fosfatasa alcalina a partir del agotamiento del fosfato en el medio, las mismas condiciones que inducen la producción de rhIGF-1.

5 ii. Descripción/construcción del plásmido de expresión del IGF-1 pLS32Tsc

El plásmido de secreción pLS32Tsc usado para transformar la cepa 27C7 contiene el gen del IGF-1. Las secuencias de transcripción y traducción requeridas para la expresión del gen del IGF-1 en *E. coli* son proporcionadas por el promotor de la fosfatasa alcalina y la secuencia Shine-Dalgarno del *trp*. El terminador lambda t_0 de la transcripción está situado de forma adyacente al codón de terminación del IGF-1. La secreción de la proteína desde el citoplasma está dirigida por la secuencia señal del *lamB* o, alternativamente, por la secuencia señal de la STII. La mayoría del rhIGF-1 se halla en el espacio periplásmico de la célula. El plásmido pLS32Tsc confiere resistencia a la tetraciclina a partir del huésped transformado.

15 El plásmido pLS32Tsc se construyó en varios pasos usando como intermediarios los plásmidos pLS32, pAPlamB, pLS32lamB, pLS33LamB, y pLS33Tsc.

Paso 1: pLS32

20 El plásmido pLS32 resulta en la fusión de la secuencia codificante del IGF-1 con la de la secuencia señal de la enterotoxina II estable al calor (STII), y se preparó ligando juntos cuatro fragmentos de ADN, tal como se muestra en la Figura 5. El primero de estos fue el vector pTF2A12 (Paborsky *et al.*, *Biochemistry* 28:8072-8077 (1989)), del cual se había retirado el pequeño fragmento *NsiI*-*Bam*HI conteniendo el gen del factor del tejido. La secuencia señal de la STII está descrita por Picken *et al.*, *Infect. Immun.* 42:269-275 (1983).

25 El segundo fragmento fue un dúplex sintético de 55 p.b. que codificaba los primeros 18 aminoácidos del IGF-1 maduro. Este dúplex tiene la siguiente secuencia:

30 5'-GGTCCCGAAACTCTGTGCGGTGCTGAACTGGTTGACGCTCTGCAGTTTGTITGCG-3'
3'-ACGTCCAGGGCTTTGAGACACGCCACGACTTGACCAACTGCGAGACGTCAAACAAACGCCACTG-5'

(SEC. N° ID. 1 y 2, respectivamente)

35 La tercera pieza en la ligación fue un fragmento *Bst*EII-*Hind*III de 154 p.b. procedente de pK1ZZIGF-1 que codificaba el resto de los aminoácidos 19-70 del IGF-1. El pK1ZZIGF-1 es un plásmido resistente a la kanamicina que contiene un promotor *lac* unido a un promotor de la Proteína A unido a una señal de la Proteína A, unido a dos regiones Z consenso procedentes de la Proteína A que unen el IgGs y secretan proteínas, fusionado usando dos codones que codifican una interfaz Asn-Gly a un gen sintético de del IGF-1, y que también contienen una región F para proporcionar un elevado número de copias. Este plásmido es similar al pZZ-IGF-1 mostrado en la Figura 6 de, y descrito en la publicación de EP n° 230.869, publicada el 5 de agosto de 1987, en donde el gen de la ampicilina está remplazado por un gen de la kanamicina.

45 El último fragmento fue un fragmento *Hind*III-*Bam*HI de 291 p.b. procedente del plásmido pLS8. Este último fragmento es simplemente la secuencia codificante del inicio del gen de la tetraciclina del pBR322 (Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 43:77-90 (1978)) en el cual se diseñó un sitio de restricción *Hind*III inmediatamente cadena arriba respecto el codón de inicio de metionina.

50 El plásmido resultante, pLS32, expresa y secreta eficientemente el rhIGF-1 al medio. Los siguientes dos pasos de construcción se hicieron para remplazar la secuencia señal de la STII con la secuencia señal de *lamB*, mejorando el rendimiento del producto.

Paso 2: pAPlamB

55 El plásmido pAPlamB se construyó, tal como se muestra en la Figura 6, ligando juntos dos fragmentos de ADN, y resulta en la colocación de la secuencia codificante de la señal del *lamB* cadena abajo respecto el promotor de AP y de la secuencia Shine-Dalgarno del *trp*. En la ligación se incluyó el vector pRA1, en el cual se había suprimido el pequeño fragmento *Xba*I-*Bg*III. Este plásmido es un derivado del phGH1 (Chang *et al.*, *Gene* 55:189-196 (1987)), éste último plásmido contiene el promotor de la AP, la señal de la STII, y el ADN que codifica la hGH. El pHA1 difiere del phGH1 en que contiene el ADN que codifica la cadena A de la relaxina (la secuencia de la cual se describe en la patente estadounidense n° 4.758.516) en vez de la de la hGH, y en que contiene un práctico sitio de restricción *Bg*III cadena abajo respecto el promotor y el sitio de unión del ribosoma. La segunda pieza en la ligación fue un dúplex de ADN sintético de 80 p.b., el cual codifica la secuencia señal del *lamB*, la cual ha sido descrita por Clement y Hofnung, *Cell* 27:507-514 (1981):

65 5'-CTAGAATTATGATGATTACTCTGCGCAAACTTCTCTGGCGGTTGCCGTCGACGCGGCGTAATGTCTGCTCAGGCCATGGCCA 3'
3'-TTAATACTACTAATGAGACGCGTTTGAATGAGACCGCCAAACGGCAGCGTCGCCCGCATTACAGACGAGTCCGGTACCGGTCTAGS'

(SEC. N° ID. 3 y 4, respectivamente)

Paso 3: pLS32lamB

El plásmido pLS32lamB resulta de la fusión de la secuencia señal del *lamB* a la región codificante del IGF-1 y se construyó, tal como se muestra en la Figura 7, mediante la ligación de tres fragmentos de ADN. El primero de estos fue el vector pLS32 en el cual se había suprimido el pequeño fragmento *XbaI-BstEII*. El segundo fue un fragmento *XbaI-EaeI* de 75 p.b. procedente del pAPlamB que codifica la secuencia señal del *lamB*. El tercero fue un dúplex de ADN sintético de 55 p.b. que codifica los 18 primeros aminoácidos del IGF-1 madura y que tiene la siguiente secuencia.

5'-GGCCGGTCCCGAACTCTGTGCGGTGCTGAAGTGGTTGACGCTCTGCAGTTTGTGCG-3'
3'-CCAGGGCTTTGAGACACGCCACGACTTGACCAACTGCGAGACGTCAAACAAACGCCACTG-5'

(SEC. N° ID. 5 y 6, respectivamente)

Los pasos siguientes introduce en el plásmido el terminador de la transcripción. Estos cambios en el plásmido resultaron en un rendimiento de producto mejorado.

Paso 4: pLS33lamB

El plásmido pLS33lamB es un intermediario en la preparación del pLS32Tsc y se construyó, tal como se muestra en la Figura 8, ligando juntos tres fragmentos de ADN. El primero de estos fue el vector pLS32 en el cual se había suprimido el pequeño fragmento *XbaI-BstEII*. El segundo fue un fragmento *XbaI-EaeI* de 75 p.b. procedente del pAPlamB que codifica la secuencia señal del *lamB*. El tercero fue un dúplex de ADN sintético que codifica los 18 primeros aminoácidos del IGF-1 madura y que tiene la siguiente secuencia:

5'-GGCCACTCTGTGCGGTGCTGAAGTGGTTGACGCTCTGCAGTTTGTGCG-3'
3'-TGAGACACGCCACGACTTGACCAACTGCGAGACGTCAAACAAACGCCACTG-5'

(SEC. N° ID. 7 y 8, respectivamente)

Las secuencias anteriores codifican los aminoácidos 4-18 del IGF-1 maduro.

Paso 5: pLS33Tsc

El plásmido pLS33Tsc resulta en la colocación del terminador de la transcripción lambda t_0 inmediatamente cadena abajo de la secuencia codificante del IGF-1. Se ligaron juntos tres fragmentos de ADN, tal como se muestra en la Figura 9, para construir este plásmido. La primera pieza fue el vector pLS18 en el que se había suprimido el pequeño fragmento *XbaI-BamHI*. El pLS18 es un derivado del pHGH1 (Chang *et al.*, ver más arriba) que contiene el ADN que codifica la ADNasa humana (tal como se descubre en WO 90/07.572, publicada el 12 de julio de 1990) en vez de la hGH. El pHGH1 podría usarse para generar el mismo fragmento. La segunda parte de la ligación fue un fragmento *XbaI-HindIII* de 288 p.b. procedente de pLS33lamB, en el cual se había embotado el sitio de restricción *HindIII* mediante tratamiento con la polimerasa I del ADN (Klenow). La tercera parte de la ligación fue un fragmento *StuI-BamHI* de 412 p.b. procedente del plásmido pdH108-4. Este fragmento contiene el terminador de la transcripción lambda t_0 (Scholtissek y Grosse, Nuc. Acids Res. 15:3185 (1987)) y los pares de bases 2-375 del pBR322 (Sutcliffe, ver más arriba), en donde los pares de bases 2-375 se hallan cadena abajo o 3' respecto al terminador de la transcripción. La secuencia de la región del terminador de este fragmento es como sigue:

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

(SEC. N° ID. 9 y 10, respectivamente)

Paso 6: pLS32Tsc

El plásmido final pLS32Tsc se construyó, tal como se muestra en la Figura 10, ligando juntos dos fragmentos de ADN. El primero de estos era el vector pLS33Tsc, del cual se había suprimido el pequeño fragmento *EcoRI-BstEII*. El segundo fue un fragmento *EcoRI-BstEII* de 550 p.b., procedente del pLS32lamB, que contenía el promotor de AP, la Shine-Dalgarno del *trp*, y la secuencia codificante de la secuencia señal del *lamB* fusionada con los primeros 18 aminoácidos del IGF-1. El plásmido resultante se analizó mediante digestión con endonucleasas de restricción. El promotor entero y la secuencia codificante se verificaron mediante secuenciación del ADN, proporcionándose en la Figura 11 la secuencia de nucleótidos (SEC. N° ID. 10) y la secuencia de aminoácidos de la fusión de *lamB* y proteína IGF-1 (SEC. N° ID. 12).

ES 2 326 802 T3

iii. Fermentación y procedimiento de recuperación

A. Transformación

- 5 Se transformaron células *E. coli* 27C7 competentes con el pLS32Tsc mediante técnicas de transformación estándares. Los transformantes se seleccionaron y purificaron sobre placas LB que contenían 20 mg/l de tetraciclina. Este medio tenía la composición siguiente: 10 g/l de Bacto-Tryptona, 5 g/l de extracto de levadura; 10 g/l de cloruro sódico; y 20 mg/l de tetraciclina-HCl.
- 10 Se usó una colonia transformada para inocular medio LB estéril que contenía 20 mg/l de tetraciclina. El frasco de cultivo se incubó a 35-39°C hasta que la densidad óptica a 500 nm alcanzó aproximadamente 1,0. Se añadió DMSO estéril al cultivo para obtener una concentración final de DMSO del 10% (v/v). Se dispensaron alícuotas de 1-2 ml en viales estériles y se almacenaron a -60°C o menos.

15 B. Inóculo de fermentación

- Se preparó un inóculo de fermentador de 10 litros inoculando primero un frasco de agitación de dos litros, que contenía aproximadamente 500 ml de medio LB estéril conteniendo tetraciclina, con el vial de cultivo de 1-2 ml recién descongelado descrito más arriba. Este frasco se incubó a 35-39°C durante 8 horas y se transfirió a un fermentador de 20 10 litros que contenía el medio de producción descrito en la SECCIÓN D de este Ejemplo. El inóculo del fermentador de 10 litros se incubó a 35-39°C a 50-200 r.p.m. durante aproximadamente 5-8 horas, es decir, crecimiento hasta 25 OD. A continuación, el inóculo se transfirió asépticamente al recipiente de fermentación de 1000 litros de la Figura 12.

C. Aparato de fermentación

- 25 La Figura 12 representa un diagrama del sistema de fermentación usado para la producción de productos recombinantes derivados de forma bacteriana a la escala de 1000 litros. El recipiente tiene aproximadamente 1500 litros de volumen total, con un volumen de trabajo nominal (con espacio en cabeza) de 1000 litros. El recipiente está equipado con tres palas impulsoras del tipo Rushton montadas sobre un eje vertical, con tracción superior normalmente operada a 150-300 r.p.m. Se usa un dispersor de aire en forma de anillo para introducir aire en el fondo del fermentador a 30 aproximadamente 1000 litros estándares por minuto. Una sonda de DO₂ montada sobre la pared del recipiente cerca de la pala impulsora inferior mide la concentración de oxígeno disuelta en el líquido (y, por tanto, accesible al organismo). Esa señal se envía a un ordenador de monitorización y control, el cual regula a continuación la velocidad de alimentación de glucosa al fermentador.

- 35 En esta configuración, la glucosa se suministra hacia la parte superior del fermentador para simplificar la esterilización de la línea de alimentación de la glucosa. No se muestra una línea de alimentación hacia la parte superior del recipiente que se usa para añadir NH₄OH bajo demanda para controlar el pH del medio. Tampoco se muestra otra línea de alimentación hacia la parte superior del recipiente, la cual podría usarse para una alimentación lenta de nutrientes complejos.

D. Procedimiento de fermentación

El recipiente de 1000 litros contenía inicialmente 600-800 litros de medio de fermentación compuesto como sigue:

Ingrediente	Cantidad/litro
glucosa*	250-350 g
sulfato amónico	2-6 g
hidróxido amónico	según se requiera para controlar el pH de 7,1 a 7,5
fosfato sódico, monobásico dihidrato	1-2 g
fosfato potásico, dibásico	2-3 g
65 citrato sódico, dihidrato	0,5-1,5 g

ES 2 326 802 T3

Ingrediente	Cantidad/litro
cloruro potásico	1-2 g
25% de Pluronic Polyol L61	inicialmente 0,2 ml y según se requiera para controlar la formación de espuma
sulfato magnésico, heptahidrato	1-3 g
tetraciclina HCl	5-20 mg
extracto de levadura**	5-15 g
NZ amina AS**	5-20 g
isoleucina	0-10 g
cloruro férrico, heptahidrato	10-30 mg
sulfato de zinc, heptahidrato	2-5 mg
cloruro de cobalto, heptahidrato	2-5 mg
molibdato de sodio, dihidrato	2-5 mg
sulfato cúprico, pentahidrato	2-5 mg
ácido bórico	0,5-2 mg
sulfato de manganeso, monohidrato	1-3 mg

*Inicialmente se añadieron 1-5 g/l de glucosa al cultivo. El resto se suministró al cultivo durante el curso de la fermentación.

**El extracto de levadura y la NZ amina AS pueden añadirse inicialmente y/o alimentarse durante la fermentación.

El proceso de fermentación se realizó a 35-39°C a pH 7,1-7,5. La velocidad de agitación se ajustó a 150-300 r.p.m. y la velocidad de aireación a 0,7-1,5 volúmenes de aire por volumen de cultivo por minuto. La producción de IGF-1 ocurrió después de que se hubiera agotado el fosfato del medio.

Un algoritmo de ordenador usaba un incremento en la lectura de la sonda de DO₂ para percibir cuando la carga inicial de glucosa se había agotado, y añadir entonces una solución de glucosa al 50% para mantener el organismo a una velocidad de crecimiento cercana a su velocidad máxima hasta que la lectura de DO₂ había caído hasta el 30% de saturación de aire. A continuación, el ordenador regulaba el suministro de glucosa para mantener la lectura de DO₂ al 30% usando un algoritmo de control proporcional, integral (PI) estándar.

Después de aproximadamente 12 horas de incubación, la carga inicial de fosfato se había agotado. La velocidad de suministro de glucosa fue disminuida por el ordenador puesto que se estaba usando menos glucosa para la síntesis celular y, por tanto, una velocidad de suministro de glucosa inferior producía la velocidad de consumo de oxígeno que igualaba la velocidad de transferencia de oxígeno y mantenía el DO₂ al 30%.

IV. Resultados

La Figura 13 presenta la velocidad de la bomba de glucosa (Figura 13A) y la lectura de DO₂ (Figura 13B) en función del tiempo para la fermentación de 1000 litro de este ejemplo que produce IGF-1. A las 12 horas, el ordenador estaba controlando al 30% de DO₂, pero poco después, se agotó el fosfato y la velocidad de suministro de glucosa empezó a disminuir por la acción del algoritmo de control. No obstante, tal como puede observarse, esta transición disparó violentas fluctuaciones en la concentración de DO₂ que el ordenador no fue capaz de controlar. Incluso después de que la velocidad de alimentación de glucosa hubiera disminuido, las inestabilidades continuaron. A aproximadamente las 16 horas, la velocidad de suministro de glucosa se colocó bajo control manual para mantener una velocidad de suministro constante. La concentración de DO₂ permaneció aproximadamente constante, disminuyendo muy lentamente hasta que alcanzó aproximadamente el 28%. En este punto, hubo una disminución precipitada en la concentración de DO₂.

A partir del examen del período de tiempo global, parecía existir un patrón común en el registro de DO₂. Este se muestra con más detalle en la Figura 14, la cual presenta las lecturas de DO₂ y las velocidades de suministro de glucosa registradas a intervalos de una minuto. Incluso con una velocidad de suministro de glucosa constante, las concentraciones de DO₂ cayeron dramáticamente después de disminuir lentamente hasta aproximadamente el 25%. En dos minutos o menos, la concentración de DO₂ cayó del 25% a cero.

El fermentador y el equipo de apoyo se examinaron en busca de funcionamientos defectuosos que pudieran causar tales observaciones. No se halló ninguno.

Ejemplo II

Uso de dos sondas de DO₂ y una ubicación de suministro alternativa para estudiar las inestabilidades del DO₂

La Figura 15 presenta un diagrama del fermentador de 1000 litros tal como se modificó para estudiar aún más las inestabilidades del DO₂. Se montó una sonda de DO₂ cerca de la parte superior del recipiente de forma que estuviera sumergida justo en el mismo momento en que se agotara el fosfato. La línea de suministro de glucosa se modificó de forma que el punto de entrada de la glucosa pudiera cambiarse durante la fermentación de la parte superior al fondo del fermentador.

La fermentación se realizó tal y como se describió en el Ejemplo I, excepto que el DO₂ se controló al 40% para prevenir las caídas precipitadas del DO₂. La glucosa se suministró a la parte superior del recipiente. Después del agotamiento del fosfato, se dejó que la velocidad de suministro de glucosa llegara a su nuevo valor de pseudo-estado estacionario, y la velocidad de suministro de glucosa se colocó de nuevo bajo control manual. Para ensayar la inducibilidad reproducible de la inestabilidad del DO₂, la velocidad de suministro de glucosa se incrementó a continuación lentamente en pequeños incrementos hasta que la lectura de la sonda de DO₂ disminuyó hasta cero. A continuación, se disminuyó la velocidad de suministro de la glucosa hasta recuperar un nivel positivo, controlable, de DO₂.

Para determinar si el punto de adición de la glucosa influenciaba en la respuesta del DO₂ a los incrementos en el suministro de glucosa, se llevó a cabo una segunda fase del experimento. El punto de suministro de la glucosa se cambió al fondo del tanque y el control del DO₂ se restableció al 40%. La velocidad de suministro de glucosa se incrementó de nuevo lentamente en incrementos hasta que el DO₂ alcanzó el cero. La velocidad de suministro de glucosa se disminuyó de nuevo de forma que el nivel de DO₂ se recuperara. Esta secuencia completa se repitió a continuación.

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos a partir del conjunto de ciclos repetido. Los resultados del primer conjunto de ciclos fueron similares, sugiriendo una inducibilidad reproducible de la inestabilidad del DO₂. Primero, el DO₂ se llevó bajo control hasta un punto de ajuste del 40% (de acuerdo con la sonda de DO₂ inferior) con el suministro de glucosa hacia la parte superior del fermentador. A continuación, la velocidad de suministro de glucosa se colocó bajo control manual y la velocidad de suministro se incrementó en un 8%.

En un reactor homogéneo, esta secuencia de sucesos provocaría un incremento del 8% en la velocidad de captación del oxígeno, la cual, a su vez, requeriría un incremento del 8% en la presión de oxígeno para transferir el oxígeno requerido desde la fase gas hacia la fase líquida. Puesto que se aplicaba una sobrepresión de 1 bar al fermentador, y puesto que la cabeza de líquido hidrostático ejerce una presión adicional estimada de 0,2 bares, un sencillo cálculo sugiere que se obtendría un incremento del 8%, en la fuerza que impulsa la concentración de oxígeno, mediante una disminución en la concentración de DO₂ desde el 40% hasta aproximadamente el 26%.

De hecho, la lectura inferior de DO₂ disminuye desde el 40% hasta aproximadamente el 25%, donde se esperaría un nuevo equilibrio. Sin embargo, en este punto, la lectura inferior de DO₂ cayó hasta cero. Esto reprodujo la observación realizada en el proceso descrito en el Ejemplo I. De forma importante, a lo largo de la mayor parte de esta secuencia, la lectura de la sonda de DO₂ superior más del 20% inferior a la lectura de la sonda inferior. Esto indica una heterogeneidad significativa en las concentraciones de DO₂ a lo largo del volumen de medio de fermentación. Durante aproximadamente 15 minutos después del incremento en la velocidad de suministro de glucosa, la lectura de la sonda superior disminuyó con aproximadamente la misma velocidad que la lectura de la sonda inferior. Fue cuando la lectura de la sonda superior alcanzó el cero que se disparó la disminución precipitada de la lectura de la sonda inferior.

Cuando se suministró la glucosa al fondo del recipiente, la coincidencia entre las lecturas de las sonda superior e inferior sugirió una heterogeneidad del DO₂ mucho menor. De nuevo, el control se estableció al 40% de DO₂ de acuerdo con la sonda de DO₂ inferior y la velocidad de suministro de glucosa se incrementó en el 8%. Esta vez, se alcanzó un nuevo estado estacionario a aproximadamente la lectura de DO₂ predicha. Cuando la velocidad de suministro de glucosa se incrementó en otro 8%, las lecturas de DO₂ disminuyeron de nuevo y se estabilizaron a aproximadamente el valor predicho. Aparentemente, la operación estable se estableció a aproximadamente el 10% de DO₂. Finalmente, un incremento adicional del 5% en la velocidad de suministro de glucosa desplazó las lecturas de DO₂ a cero, tal como sería predicho a partir de los cálculos de utilización de oxígeno y de la fuerza impulsora de oxígeno.

Estos resultados sugieren que las inestabilidades del DO₂ ilustradas en la Figura 13 pueden prevenirse proporcionando concentraciones de oxígeno disuelto homogéneas a lo largo del recipiente. En este fermentador concreto, el suministro de glucosa al fondo del fermentador mejoró significativamente la homogeneidad del DO₂. En fermentadores mayores y/o más complejos (por ejemplo, fermentadores con unidades de enfriamiento), será mucho más difícil conseguir la homogeneidad del DO₂.

Los resultados sugieren también que los sucesos de inestabilidad del DO₂ (observados mientras se monitoriza el DO₂ en el fondo del fermentador) coinciden con el agotamiento de la concentración de DO₂ medible en la parte superior del medio de fermentación. Estos resultados sugieren, bien un fenómeno hidrodinámico complejo y muy rápido, o un suceso biológico repentino, motivado por concentraciones de DO₂ muy bajas, que incrementa la velocidad global de utilización del oxígeno.

Ejemplo III

Reproduciendo las inestabilidades del DO₂ en un fermentador de 10 litros modificado

Aunque los resultados del Ejemplo II fueron bastante informativos, los experimentos a escala de 1000 litros son difíciles y caros. Por tanto, era deseable desarrollar procedimientos que produjeran el fenómeno de la inestabilidad del DO₂ a escala de laboratorio, en un fermentador con un volumen de trabajo de 10 litros.

i. Fermentador

La Figura 1 muestra un diagrama del fermentador de 10 litros modificado usado en ésta. Normalmente, el fermentador utilizaría tres palas impulsoras del tipo Rushton. En esta configuración modificada, se suprime la pala impulsora superior y el fermentador se opera con un volumen de líquido relativamente elevado. Esto produce una gran región pobremente mezclada en la parte superior del medio de cultivo. La glucosa se suministra en la parte superior del fermentador (17) para imitar la configuración de gran escala y para contribuir aún más a la heterogeneidad del DO₂. Finalmente, se instala una sonda redox (15) además de la sonda de DO₂ polarográfica normal (13). Como se verá, esta proporciona información sobre el cultivo cuando la lectura del DO₂ está a cero o cerca de cero.

ii. Organismo huésped

El organismo huésped usado fue el mismo que se usó en el Ejemplo I (27C7) excepto por tener una supresión *rbs7* (utilización de la ribosa, menos) y tener un locus *ilvG* restaurado. Ambos marcadores se introdujeron mediante una transducción P1. El organismo se denomina 37D6.

iii. Descripción/construcción del plásmido de expresión del IGF-1 pBKIGF2B

En el plásmido que pBKIGF-2B expresa el IGF-1, la secuencias de transcripción y traducción requeridas para la expresión del gen del IGF-1 en *E. coli* son proporcionadas por el promotor de la fosfatasa alcalina y la secuencia Shine-Dalgarno del *trp*. El terminador de la transcripción lambda t₀ está situado de forma adyacente al codón de terminación del IGF-1. La secreción de la proteína desde el citoplasma está dirigida por la secuencia señal *lamB* o, alternativamente, por la secuencia señal de la STII. La mayoría del rhlGF-1 se halla en el espacio periplásmico de la célula. El plásmido pBKIGF-2B confiere resistencia a la tetraciclina a partir del huésped transformado.

El plásmido pBKIGF-2B se construyó en varios pasos usando como plásmidos intermedios el pLS32Tsc, el pLBIGFTsc, el pLS33Tsc, y el pRanTsc.

Paso 1: pLS32Tsc

Este plásmido se construyó como se describe en el Ejemplo I.

Paso 2: pLBIGFTscPaso a: pLamBIGF

Para la primera parte de la ligación, se aisló el fragmento *EcoRI-PstI* del pBR322. Para la segunda parte de la ligación, se aisló un fragmento *PstI-NcoI* de 1244 p.b. del pAPLamB. Para la tercera parte de la ligación, se aisló el fragmento *HaeII-EcoRI* de 196 p.b. que contenía el gen del IGF-1, excepto el extremo 5' inicial, a partir del plásmido p200. El p200 es un plásmido derivado del pBR322 que tiene, en el orden 5' a 3', el promotor de la quelatina, la secuencia de señal de la MF alfa 1 prepro, el ADN que codifica el IGF-1 maduro, y el terminador de 2 micrómetros. Contiene el origen de replicación del *ColE1* para bacterias y el origen de 2 micrómetros para levadura. En la Figura 17 se proporciona un diagrama de enzimas de restricción del plásmido p200. En la Figura 18 se proporciona la secuencia de nucleótidos (SEC. N° ID. 13) del fragmento desde *EcoRI* (empezando en la posición 1149) hasta *EcoRI* (empezando en la posición 1628) del p200 que contiene la MF alfa 1 prepro y el gen del IGF-1. Los sitios de restricción *HaeII*, *PstI*, *BamHI*, y *SalI* que también se hallan en el diagrama de la Figura 17 se indican en la secuencia mediante subrayado. Se preparó una pieza de ADN sintético que conectaba la secuencia señal al gen del IGF-1 (*NcoI* a *HaeII*) con la siguiente secuencia:

5' -CATG GCC GGT CCG GAA ACT CTG TGC GGC GC

(SEC. N° ID. 14)

3' -CGG CCA GGC CTT TGA GAC ACG C'

(SEC. N° ID. 15)

Los tres fragmentos de plásmido y el ADN sintético se ligaron juntos para formar el pLamBIGF, tal como se muestra en la Figura 19.

Paso b: pLBIGFTsc

Se aisló el fragmento *XbaI-BamHI* del vector a partir del pLS18 como el primer fragmento de ligación. La segunda parte de la ligación fue un fragmento *StuI-BamHI* procedente del plásmido pDH108-4 descrito más arriba. La tercera parte de la ligación se preparó mediante digestión con *EcoRI* del pLamBIGF, seguida por tratamiento con el fragmento Klenow de la polimerasa del ADN, seguida por una digestión con *XbaI*. Se aisló el fragmento de 302 p.b. resultante. Estos tres fragmentos se ligaron para rendir el pLBIGFTsc, tal como se muestra en la Figura 20.

Paso 3: pRanTsc

Se aisló el fragmento de vector *XbaI-BamHI* del pLS18 como el primer fragmento de ligación. La segunda parte de la ligación fue un fragmento *StuI-BamHI* procedente del plásmido pDH108-4 descrito más arriba. La tercera parte de la ligación se preparó a partir del pRANTES. El pRANTES es un plásmido basado en el pBR322 que contiene un fragmento de un conector *XbaI* seguido por la señal de la STII, seguido por el cADN que codifica RANTES (tal como fue publicado por Schall *et al.*, *J. Immunol.* 141:1018 (1988)), seguido por el conector *BamHI*. El tercer fragmento se preparó mediante digestión del pRANTES con *BamHI*, seguida por tratamiento con el fragmento Klenow de la polimerasa del ADN, seguido por una digestión con *XbaI*. Se aisló el fragmento de 303 p.b. resultante. Estos tres fragmentos se ligaron para obtener el pRanTsc, tal como se muestra en la Figura 21.

Paso 4: pBKIGF-2

Tal como se muestra en la Figura 22, se cortaron del pLS32Tsc el fragmento *EcoRI-PstI* de 540 p.b. que contiene el promotor de la fosfatasa alcalina, la secuencia señal del *lamB*, y el ADN que codifica los primeros 15 aminoácidos del IGF-1. Se cortó del pLBIGFTsc el fragmento *PstI-Bsp12861* (~70 p.b.) que contiene el ADN que codifica los aminoácidos 16-38 del IGF-1. Del pLS33Tsc se cortó el fragmento *Bsp12861-HindIII* (~179 p.b.) que contiene el ADN que codifica los aminoácidos 39-70 del IGF-1, el terminador *lambda*, y el promotor Tc. Finalmente, el fragmento de vector *EcoRI-HindIII* de ~4331 p.b. (basado en pBR322) se cortó del pRanTsc. Estos cuatro fragmentos se ligaron para obtener el pBKIGF-2, el cual contiene el promotor de la AP, la secuencia señal del *lamB*, el ADN que codifica la proteína IGF-1 entera, el terminador de la transcripción, el promotor Tc, y los marcadores de la resistencia a la tetraciclina y ampicilina.

Paso 5: pBKIGF-2A

Se digirió el pBKIGF-2 con *Pst*I y *Cla*I y se aisló el fragmento de ~245 p.b.. Éste contiene los aminoácidos 16-70 del IGF-1 y el terminador lambda T_o. Se digirió el pLBIGFTsc con *Nco*I y *Cla*I y se aisló el fragmento del vector. Este fragmento del vector contiene el promotor de la AP, la señal *lamB*, y el gen Tet'. Estos dos fragmentos se ligaron con una pieza de ADN sintético que reemplaza, como sigue, el extremo 5' del ADN del IGF-1, desde *Nco*I hasta *Pst*I, con codones derivados sintéticamente:

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'

(SEC. N° ID. 16 y 17, respectivamente).

El plásmido resultante se denominó pBKIGF-2A. La construcción se muestra en la Figura 23.

Paso 6: pLamBRan

Este plásmido se preparó digiriendo pLS33LamB con *Nco*I y *Bam*HI, y se aisló el fragmento de vector. El pLS33LamB es un plásmido construido a partir del pBR322, en el cual se han insertado el promotor de la AP, la señal del *lamB*, y el gen del IGF-1. *Bam*HI corta la porción Tc del plásmido y *Nco*I corta en el extremo 5' del gen del IGF-1. El segundo fragmento se generó digiriendo el pRANTES con *Bsa*II y *Bam*HI y aislando el fragmento de ~200 p.b. resultante. El tercer fragmento fue una pieza de ADN sintético para conectar el gen RANTES con la secuencia señal desde *Nco*I hasta *Bsa*II. Este ADN sintético tiene la secuencia:

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

(SEC. N° ID. 18 y 19, respectivamente).

El vector resultante se denominó pLamBRan, y su construcción se muestra en la Figura 24.

Paso 7: pBKIGF-2B

La construcción de este plásmido se muestra en la Figura 25. Se digirió el pLamBRan con *Nco*I y *Sph*I, y el fragmento de vector se aisló conteniendo el promotor y la secuencia señal. Se digirió el pBKIGF-2 con *Dde*I y *Sph*I, y se aisló el fragmento de ~600 p.b. que contenía el terminador de la transcripción lambda y el extremo 5' del gen Tet^R. el pBKIGF-2A se digirió con *Nco*I y *Bsp*12861 y se aisló el fragmento de ~110 p.b. conteniendo el ADN que codificaba los aminoácidos 1-38 del IGF-1. Estos tres fragmentos se ligaron juntos con el ADN sintético que codifica los aminoácidos 39-70 del IGF-1 para proporcionar el pBKIGF-2B. Este conector sintético tiene la secuencia:

5' - _TCGTCCTGCTCCC CAG ACT GGT ATT GTT GAC GAA TGC TGC
 TTT CGT TCT TGC GAC CTG CGT CGT CTG-3' (SEQ. N°. ID 20)

3' - _AGA ACG CTG GAC GCA GCA GAC CTT TAC ATA ACG CGA GGG
 GAC TTT GGG CGATTTAGACGAATCTTCGAGG- 5' (SEQ. N°. ID. 21)

iv. *Transformación y Fermentación*

La cepa 37D6 descrita más arriba se transformó con el pBKIGF-2B usando técnicas de transformación estándares. A continuación se hizo crecer de la misma manera descrita en el Ejemplo I, excepto que los 500 ml de medio de cultivo LB se usaron después para inocular el fermentador de 10 l, la fermentación se realizó tal como se describió para el fermentador de 1000 l. Además, las sales minerales se redujeron al 60% de la concentración usada en la fermentación de 1000 l. Esto resultó en que el fosfato se agotaba aproximadamente dos horas antes en el fermentador de 10 l modificado en comparación con el fermentador de 1000 l.

Finalmente, el suministro de un nitrógeno complejo se inició a 40 OD (A550) para proporcionar una fuente lentamente suministrada de aminoácidos y fosfato después del agotamiento de los aminoácidos y fosfato inicialmente cargados en el fermentador. Este suministro consistió en 290 ml de NZ Amina AS al 20% con 140 ml de extracto de

levadura al 20%, y se suministró a una velocidad de 0,4 ml/min. El volumen de partida inicial después de la adición del inóculo fue de aproximadamente 8 l.

v. Resultados

La Figura 26 presenta los resultados de un experimento realizado en el fermentador de 10 l modificado. Tal como puede observarse a partir de esta figura, entre las 10 y 11 horas, la velocidad de suministro de glucosa (Figura 26B) se disminuyó bajo control del ordenador para mantener el punto de ajuste del DO₂ al 30%. Esto sugiere que el fosfato estaba siendo agotado y que se estaba usando menos glucosa por producción de masa celular. A aproximadamente las 11,5 horas, la velocidad de suministro de la glucosa se colocó bajo control manual. La velocidad de suministro de la glucosa se incrementó entonces en incrementos hasta que se llevó el DO₂ a cero.

En este experimento particular, la sonda de DO₂ produjo una lectura de aproximadamente el 5% cuando la concentración de DO₂ real era cero. Aunque el perfil de la curva inicial de disminución del DO₂ (Figura 26A) sugería una inestabilidad en el DO₂, el resultado no era concluyente. Por tanto, la velocidad de la bomba de glucosa (GPR) se redujo para permitir la recuperación del DO₂ y entonces se incremento en pequeños incrementos. Cuando sucedió otra caída en el DO₂ a aproximadamente las 13 horas, la GPR se disminuyó de nuevo para permitir la recuperación. En este punto, un incremento en la GPR de menos del 4% causaba el característico perfil de una disminución lenta del DO₂ seguida por una disminución precipitada y mucho mayor de la predicha en la concentración de DO₂.

Cuando se disminuyó de nuevo la GPR para permitir la recuperación, sobrevinieron una sorprendente serie de sucesos. La concentración de DO₂ en el fermentador empezó a repetirse de forma reproducible sin estímulos externos. La irregularidad observada en el patrón de los ciclos de DO₂ a las 14,2 horas fue causada por una breve interrupción en el aporte de glucosa. Aparte de este único suceso, no se hizo nada para cambiar los parámetros operacionales de la fermentación. Como puede observarse, los ciclos fueron bastante consistentes en amplitud y sólo variaron en frecuencia, pasando a estar más separados hasta que se detuvieron a las 17,3 horas. Se estimularon dos series adicionales de ciclos prácticamente idénticos disminuyendo la velocidad de suministro de glucosa a las 20,25 y 22,2 horas.

Estos resultados demuestran una dramática inestabilidad en la concentración de DO₂ en este fermentador de 10 litros modificado. La forma general de la parte de disminución del DO₂ del ciclo es similar a la observada en el fermentador de 1000 l. Esto sugiere que el reactor de 10 l está duplicando de forma apropiada los fenómenos observados primero en el fermentador grande. La velocidad y la regularidad de los ciclos observados en el fermentador pequeño sugieren un origen biológico.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4565785 A [0003]
- US 4673641 A [0003]
- US 4738921 A [0003]
- US 4795706 A [0003]
- US 4710473 A [0003]
- EP 128733 A [0019]
- EP 230869 A [0058]
- US 4758516 A [0061]
- WO 9007572 A [0065]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- Fu *et al.* *Mol. Gen. Genetics*, 1991, vol. 226, 209-213 [0005]
- Anraku; Gennis. *TIBS*, 1987, vol. 12, 262-266 [0005]

ES 2 326 802 T3

- Pathways of Electrons to Oxygen. **IPoole; Ingledew** *et al. Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. *American Society for Microbiology*, 1987, vol. 1, 1801 [0006]
- **Wallace**; *Young. Biochim. Biophys. Acta*, 1977, vol. 461, 84-100 [0007]
- **Oden** *et al. Gene*, 1990, vol. 96, 29-36 [0007]
- **Oden; Gennis**. *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, 6174-6183 [0007]
- **Kelly** *et al. J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, 6010-6019 [0007]
- **luchi** *et al. J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, 6020-6025 [0007]
- **Soberon** *et al. J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, 1676-1680 [0007]
- **Poole** *et al. J. Gen. Microbiol.*, 1989, vol. 135, 1865-1874 [0007]
- **Fang** *et al. J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 8026-8032 [0007]
- **James** *et al. FEMS Microbiol. Lett.*, 1989, vol. 58, 277-281 [0007]
- **Green** *et al. J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 13138-13143 [0007]
- **Soberon** *et al. J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171, 466-472 [0007]
- **Sharma** *et al. Indian J. Microbiol.*, 1987, vol. 27, 26-31 [0007]
- **Yang**. *Arch. Microbiol.*, 1986, vol. 144, 228-232 [0007]
- **Matsushita; Kaback**. *Biochemistry*, 1986, vol. 25, 2321-2327 [0007]
- **Tamura-Lis; Webster**. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, vol. 244, 285-291 [0007]
- **Au** *et al. J. Bacteriol.*, 1985, vol. 161, 123-127 [0007]
- **McInerney** *et al. Eur. J. Biochem.*, 1984, vol. 141, 447-452 [0007]
- **Lorence** *et al. J. Bacteriol.*, 1984, vol. 157, 115-121 [0007]
- **Kranz**. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 156, 115-121 [0007]
- **Green; Gennis**. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154, 1269-1275 [0007]
- **Bryan; Kwan**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1981, vol. 19, 958-964 [0007]
- **Willison** *et al. FEMS Microbiol. Lett.*, 1981, vol. 10, 249-255 [0007]
- **Willison; Haddock**. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1981, vol. 10, 53-57 [0007]
- **Hoffman**. *Eur. J. Biochem.*, 1980, vol. 105, 177-185 [0007]
- **Hoffman** *et al. Eur. J. Biochem.*, 1979, vol. 100, 19-27 [0007]
- **Haddock; Schairer**. *Eur. J. Biochem.*, 1973, vol. 35, 34-45 [0007]
- **Haltia** *et al. EMBO J.*, 1989, vol. 8, 3571-3579 [0007]
- **Dikshit**. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, vol. 293, 241-245 [0007]
- **Lemieux** *et al. J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 2105-2113 [0007]
- **Minagawa** *et al. J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 2096-2104 [0007]
- **Dassa** *et al. Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 229, 341-352 [0007]
- **Williams** *et al. Biochem. J.*, 1991, vol. 276, 555-557 [0007]
- **Puustinen** *et al. Biochemistry*, 1991, vol. 30, 3936-3942 [0007]

- **Denis et al.** *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 18095-18097 [0007]
- **Chepuri et al.** *Biochim. Biohys. Acta*, 1990, vol. 1018, 124-127 [0007]
- 5 • **Andersson; Roth.** *J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171, 6734-6739 [0007]
- **Puustinen et al.** *FEBS Lett.*, 1989, vol. 249, 163-167 [0007]
- **Daldal.** *J. Bacteriol.*, 1988, vol. 170, 2388-2391 [0007]
- 10 • **Poole; Williams.** *FEBS Lett.*, 1988, vol. 231, 243-246 [0007]
- **Georgiou.** *J. Bacteriol.*, 1987, vol. 169, 2107-2112 [0007]
- 15 • **O'Brian; Maier.** *J. Bacteriol.*, 1985, vol. 161, 507-514 [0007]
- **Green et al.** *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, 7994-7997 [0007]
- **Au et al.** *J. Bacteriol.*, 1984, vol. 157, 122-125 [0007]
- 20 • **Matsushita et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 4889-4993 [0007]
- **Sasarman.** *Rev. Can. Biol.*, 1972, vol. 31, 317-319 [0007]
- 25 • **Van der Oost et al.** *EMBO J.*, 1992, vol. 11, 3209-3217 [0007]
- **Deutch.** 92nd General Meeting of the American Society for Microbiology, 30 May 1992 [0007]
- **Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol., 1992, vol. 92, 272 [0007]**
- 30 • **Mogi et al.** *Biophys. J.*, 1992, vol. 61, A284 [0007]
- **Tron; Lemesle-Meunier.** *Curr. Genet.*, 1990, vol. 18, 413-420 [0007]
- 35 • **Shioi et al.** *J. Bacteriol.*, 1988, vol. 170, 5507-5511 [0007]
- **Oden; Gennis.** *J. Cell. Biol.*, 1988, vol. 107, 624A [0007]
- **Webster; Georgiou.** *Fed. Proc.*, 1985, vol. 44, 678 [0007]
- 40 • **Terriere et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 111, 830-839 [0007]
- **Green; Gennis.** *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, 3652 [0007]
- 45 • **Tamura-Lis; Webster.** *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, 2799 [0007]
- **Green et al.** *Fed. Proc.*, 1981, vol. 40, 1669 [0007]
- **Willison; John.** *J. Gen. Microbiol.*, 1979, vol. 115, 443-450 [0007]
- 50 • **Hashimoto; Hino.** *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B Div. 2 (Bot)*, 1975, vol. 15, 103-114 [0007]
- **J. Miller.** Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1972 [0038]
- 55 • **Kleckner et al.** *J. Mol. Biol.*, 1977, vol. 116, 125-159 [0038]
- **Bachmann.** *Bact. Rev.*, 1972, vol. 36, 525-557 [0038]
- **Derivatives and Genotypes of Some Mutant Derivatives of Escherichia coli K-12. Bachman et al.** *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology*, 1987, vol. 2, 1190-1219 [0038]
- 60 • **Kadner et al.** *J. Bact.*, 1980, vol. 143, 256-264 [0039]
- 65 • **Bachmann.** *Microbiol. Rev.*, 1983, vol. 47, 180-230 [0039]
- **Linkage Map of Escherichia coli K-12. Bachman.** *Escherichia coli and Salmonella tryphimurium: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology*, 1987, vol. 2, 807-876 [0039]

ES 2 326 802 T3

- **Maloy; Nunn.** *J. Bacteriol.*, 1981, vol. 145, 1110 [0044]
- **Davis et al.** *Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1980 [0045]
- 5 • **Cheng.** *J. Bacteriol.*, 1979, vol. 140, 125-130 [0048]
- *J. Bat.*, 1979, vol. 140, 125 [0048]
- **Sarthy et al.** *J. Bacteriol.*, 1981, vol. 145, 288-292 [0049]
- 10 • **Schweizer; Boos.** *Mol. Gen. Genet.*, 1983, vol. 192, 293-294 [0049]
- **Earhart et al.** *FEBS Microbiol. Lett.*, 1979, vol. 6, 277-280 [0051]
- 15 • *J. Bacter.*, 1983, vol. 153, 1104-1106 [0051]
- **Strauch et al.** *J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171, 2689-2696 [0052]
- **Paborsky.** *Biochemistry*, 1989, vol. 28, 8072-8077 [0056]
- 20 • **Picken et al.** *Infect. Immun.*, 1983, vol. 42, 269-275 [0056]
- **Sutcliffe.** *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 1978, vol. 43, 77-90 [0059]
- 25 • **Chang et al.** *Gene*, 1987, vol. 55, 189-196 [0061]
- **Clement; Hofnung.** *Cell*, 1981, vol. 27, 507-514 [0061]
- **IScholtissek; Grosse.** *Nuc. Acids Res.*, 1987, vol. 15, 3185 [0065]
- 30 • **Schall et al.** *J. Immunol.*, 1988, vol. 141, 1018 [0096]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la propensión de un cultivo de células bacterianas a la inestabilidad del oxígeno disuelto en un fermentador a gran escala con al menos 1000 litros de capacidad volumétrica que comprende (a) cultivar el cultivo celular en presencia de una fuente de carbono/energía introducida a una velocidad de alimentación establecida en un fermentador a pequeña escala que no tiene más de 100 litros de capacidad volumétrica configurado para que la concentración de oxígeno disuelta a través del cultivo celular no sea homogénea durante la fermentación, (b) cuando el cultivo tiene una capacidad de captar de oxígeno suficiente para exceder la velocidad de transferencia de oxígeno del reactor, incrementar la velocidad de alimentación de la fuente de carbono/energía, y (c) determinar si se produce no-linealidad en la pendiente de la concentración de oxígeno disuelto respecto al tiempo o si oscilaciones en la concentración de oxígeno disuelto son inducidas tras el incremento de la velocidad de alimentación de la fuente de carbono/energía.

2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fermentador tiene una capacidad de 10 litros.

3. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fermentador tiene una entrada en la parte superior del mismo para introducir la fuente de carbono/energía.

4. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fermentador tiene dos palas impulsoras.

5. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fermentador tiene una sonda para oxígeno disuelto y una sonda redox.

6. Procedimiento de la reivindicación 5, en el que las sondas están montadas en el fermentador preferiblemente lo más cerca de la pala impulsora de más abajo.

7. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fermentador tiene un eje vertical dispuesto en su centro al que se conectan dos palas impulsoras, una encima de la otra, palas impulsoras 3 que están localizadas significativamente por debajo de la superficie del cultivo bacteriano, fermentador que también tiene un medio para la entrada de gas en la parte de abajo del mismo, una sonda para oxígeno disuelto y una sonda redox ambas conectadas al fermentador lo más cerca de la pala impulsora de más abajo, sondas que se utilizan para medir la concentración de oxígeno disuelto y el potencial redox, respectivamente, del cultivo celular, y un medio para la entrada de líquido dispuesto en la parte superior del fermentador.

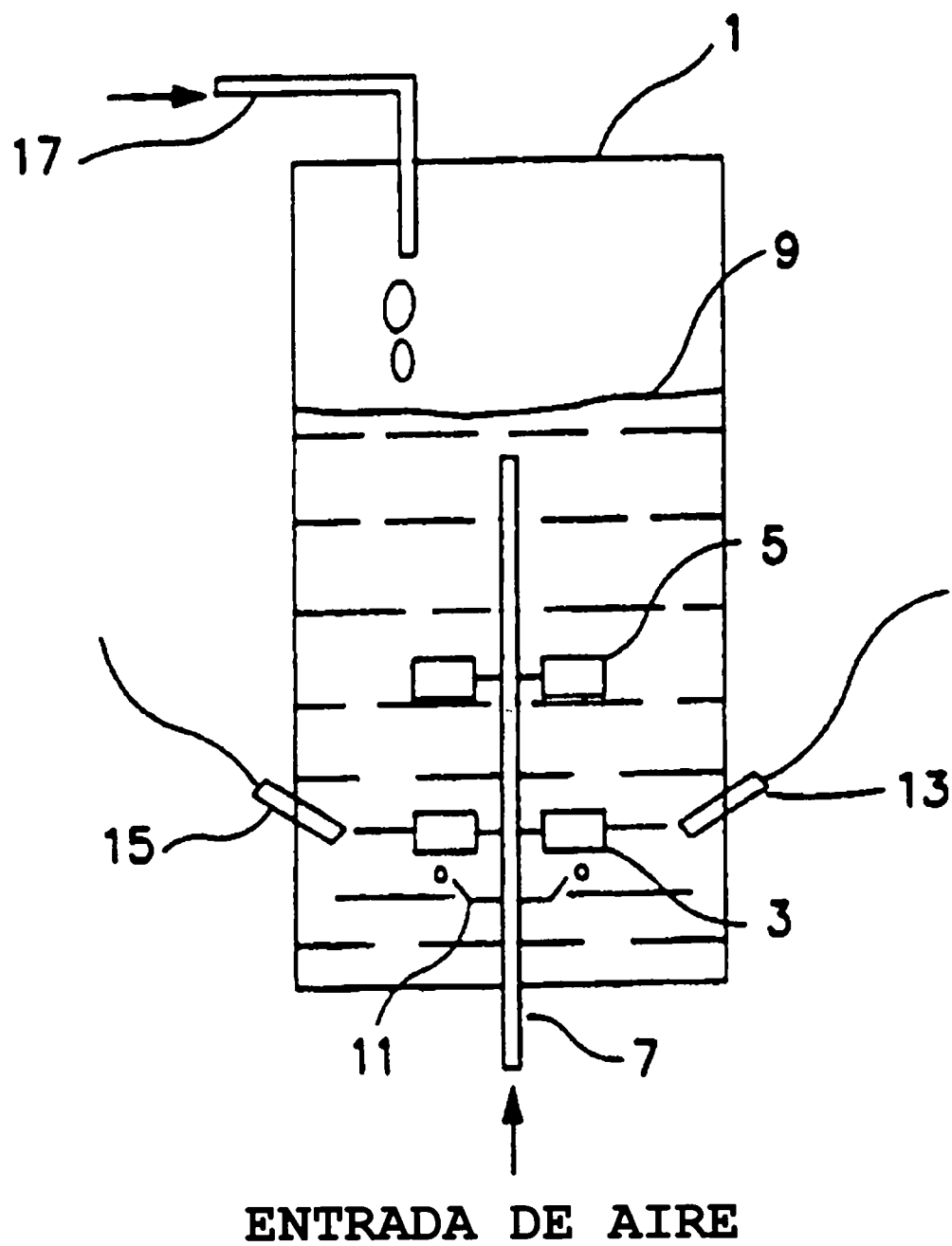
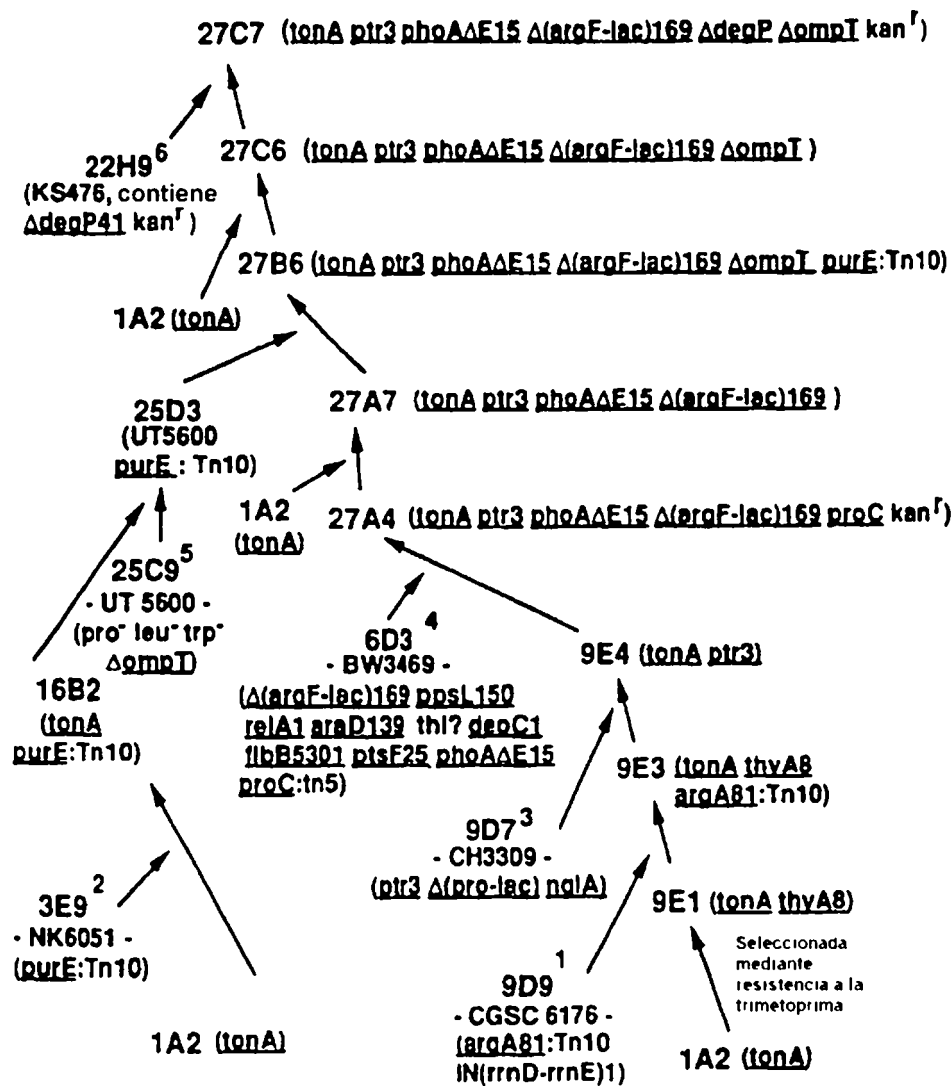


FIG. 1

FIG.2

Linaje de la cepa 27C7 de E. coli W3110



1. Obtenida de B. Bachman, E. coli Genetic Stock Center
2. Procedente del laboratorio de la Dra. Nanacy Kleckner, cepa similar disponible de la Dra. Carol Gros, University of Wisconsin
3. J. Bact. 140, 1979, pág. 125
4. Obtenida del Prof. Barry Wanner, Purdue University
5. J. Bact 153, 1983, pág. 11041105
6. Obtenida de la Harvard Medical School, Oficina para Licencia de Tecnología e Investigación Patrocinada por la Industria

FIG.3A

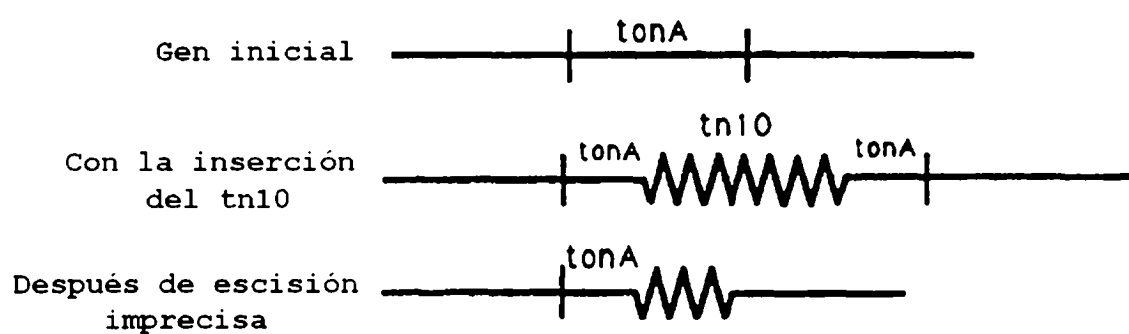
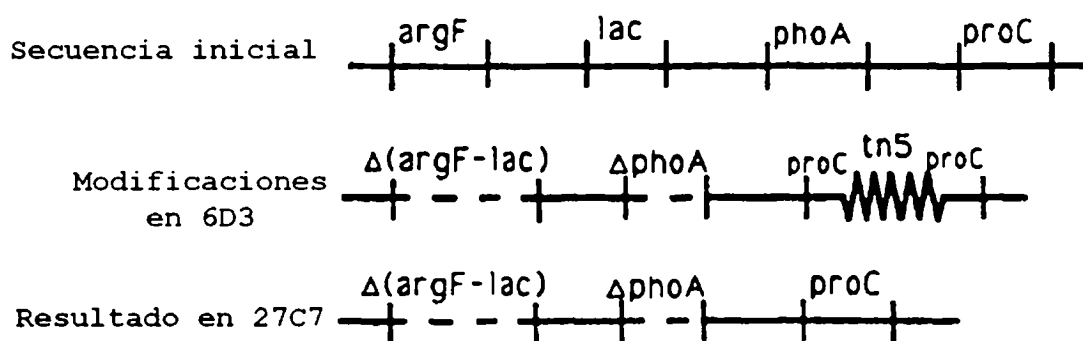
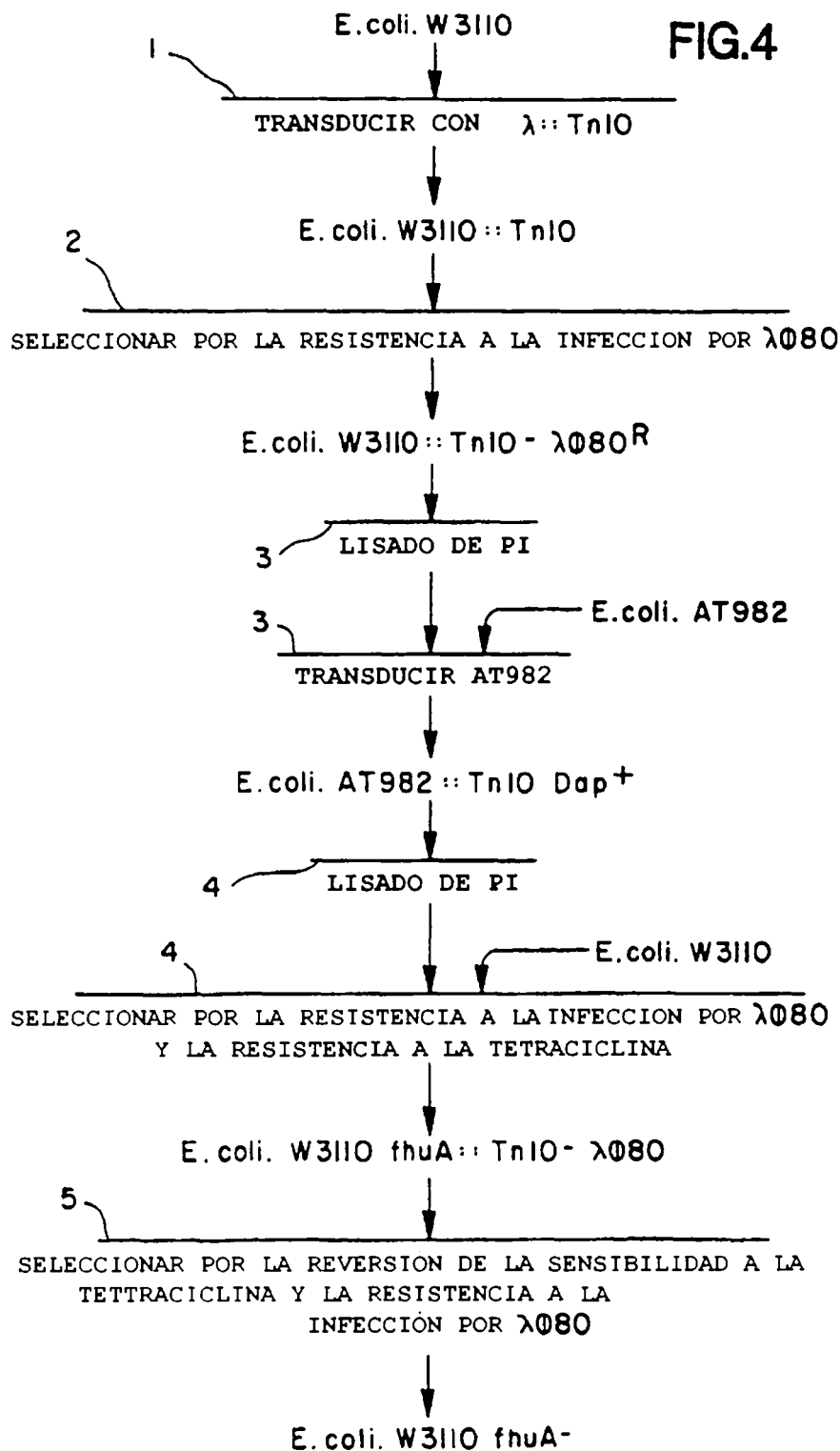


FIG.3B





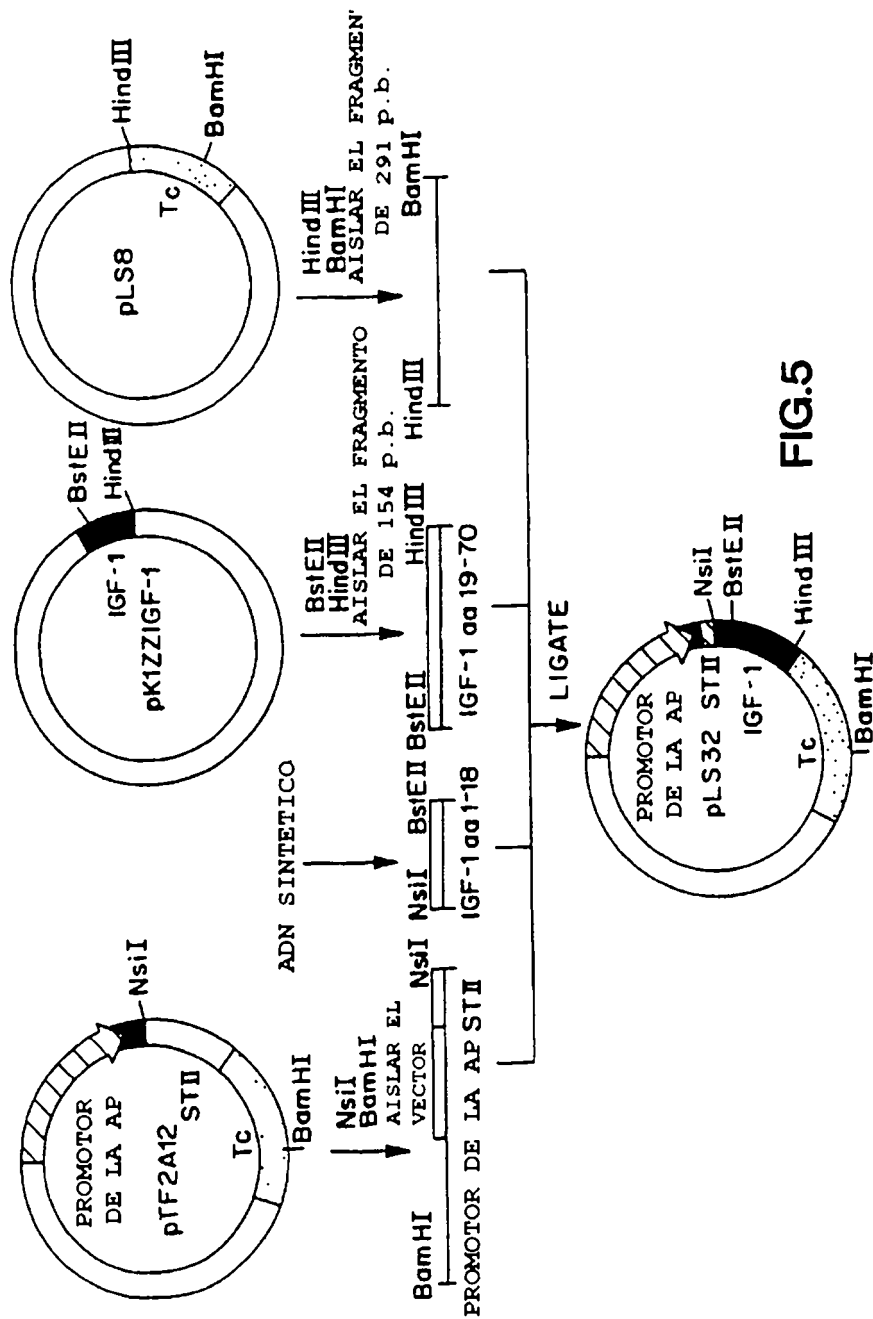
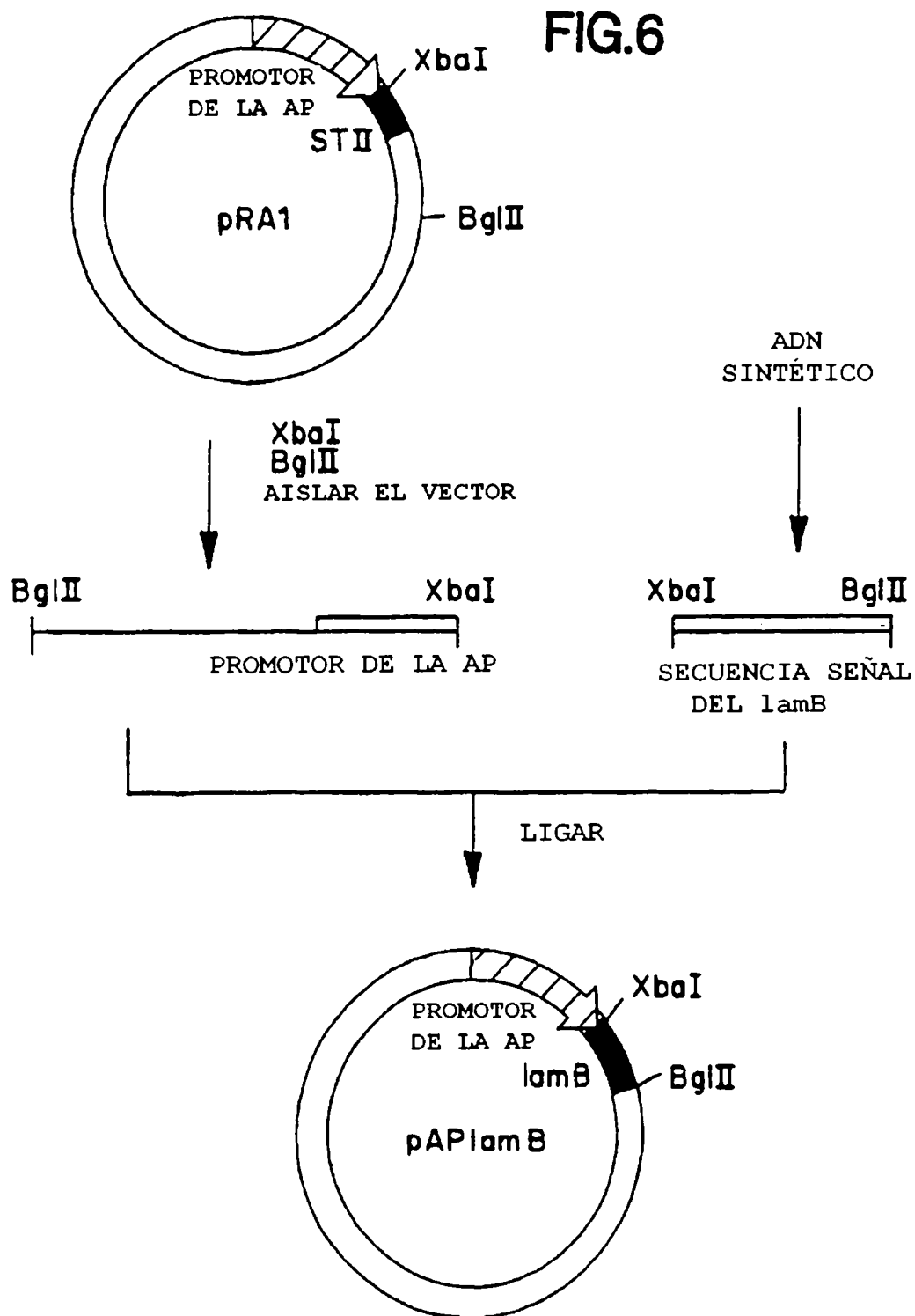
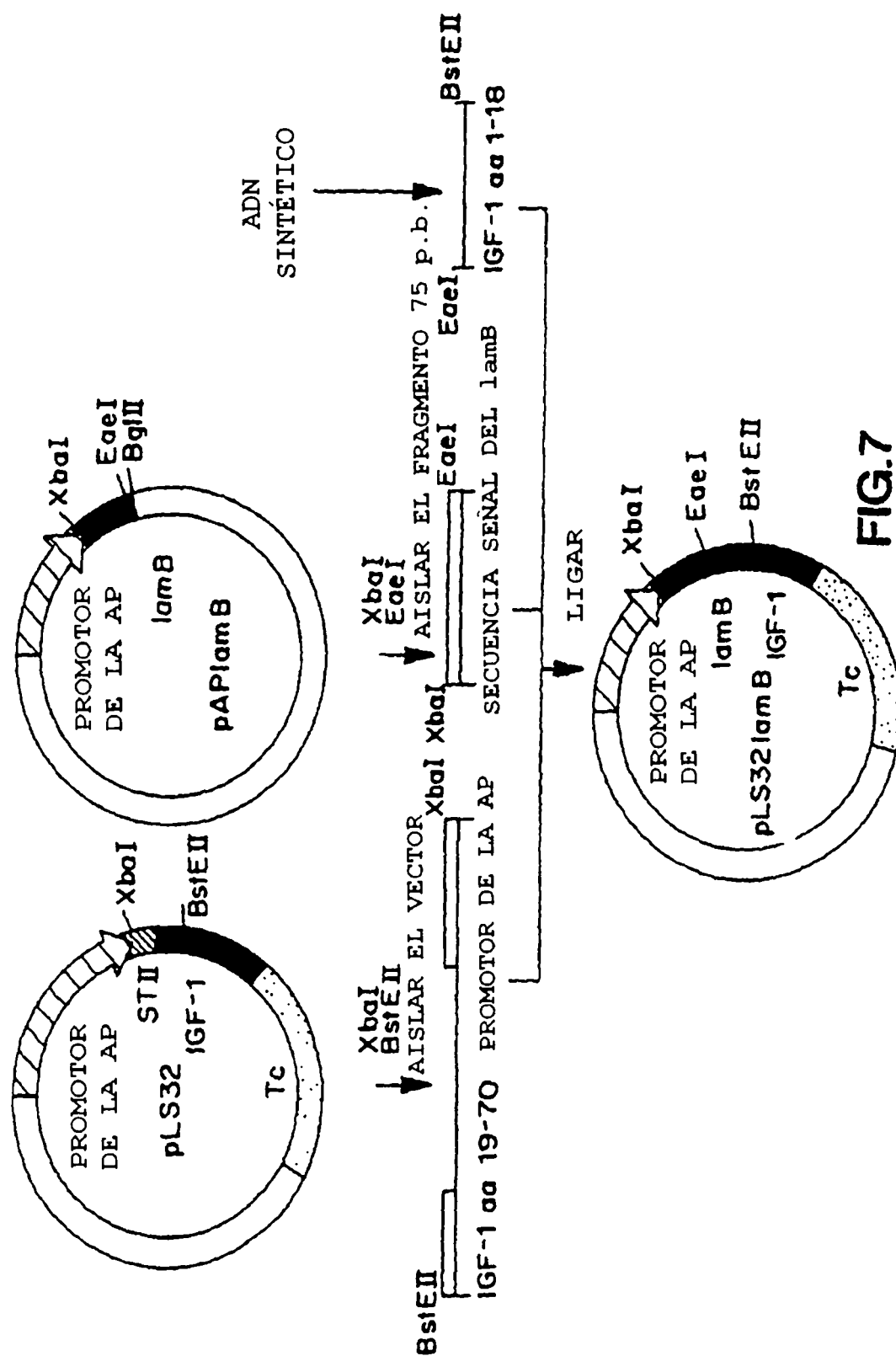
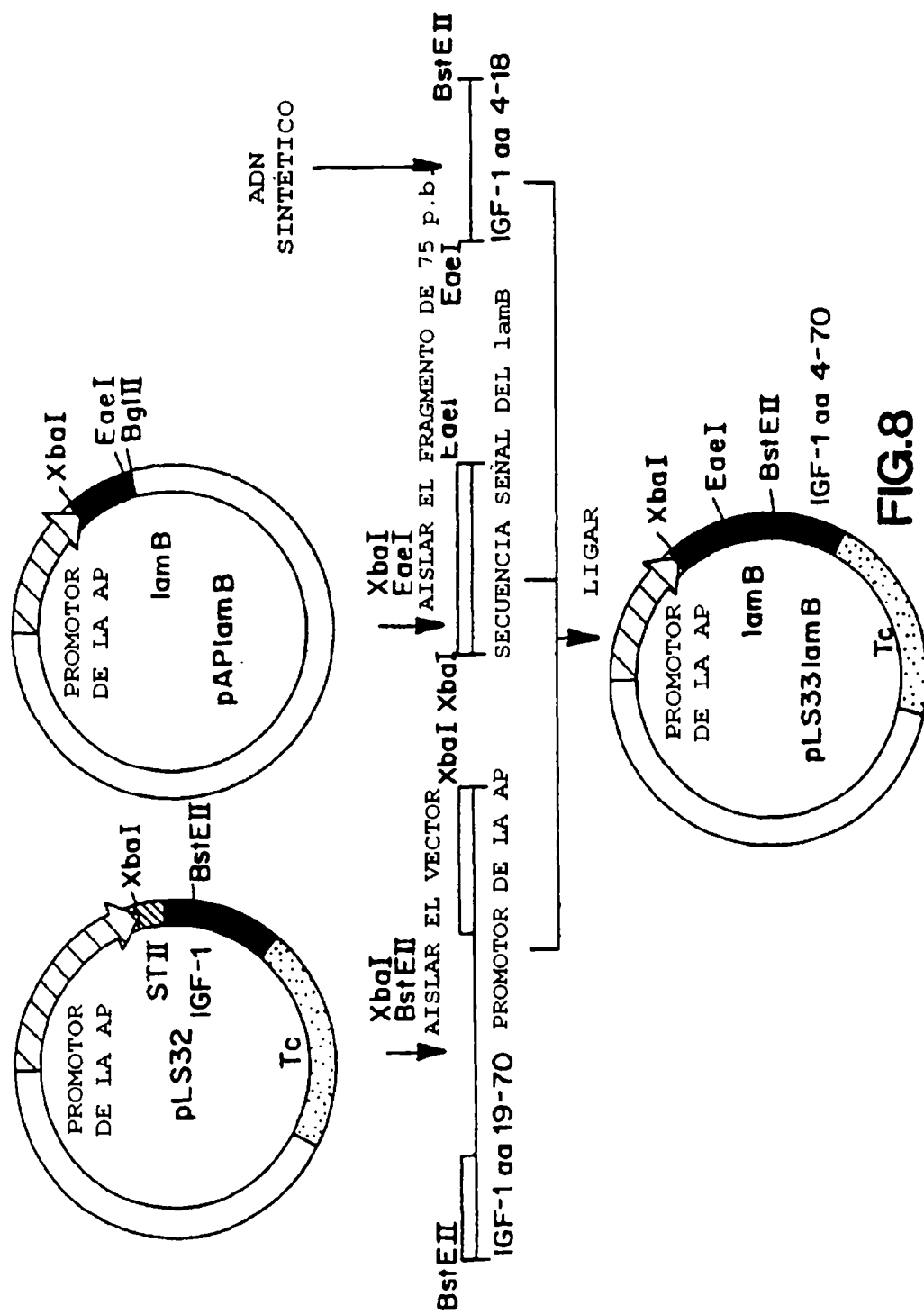


FIG.6







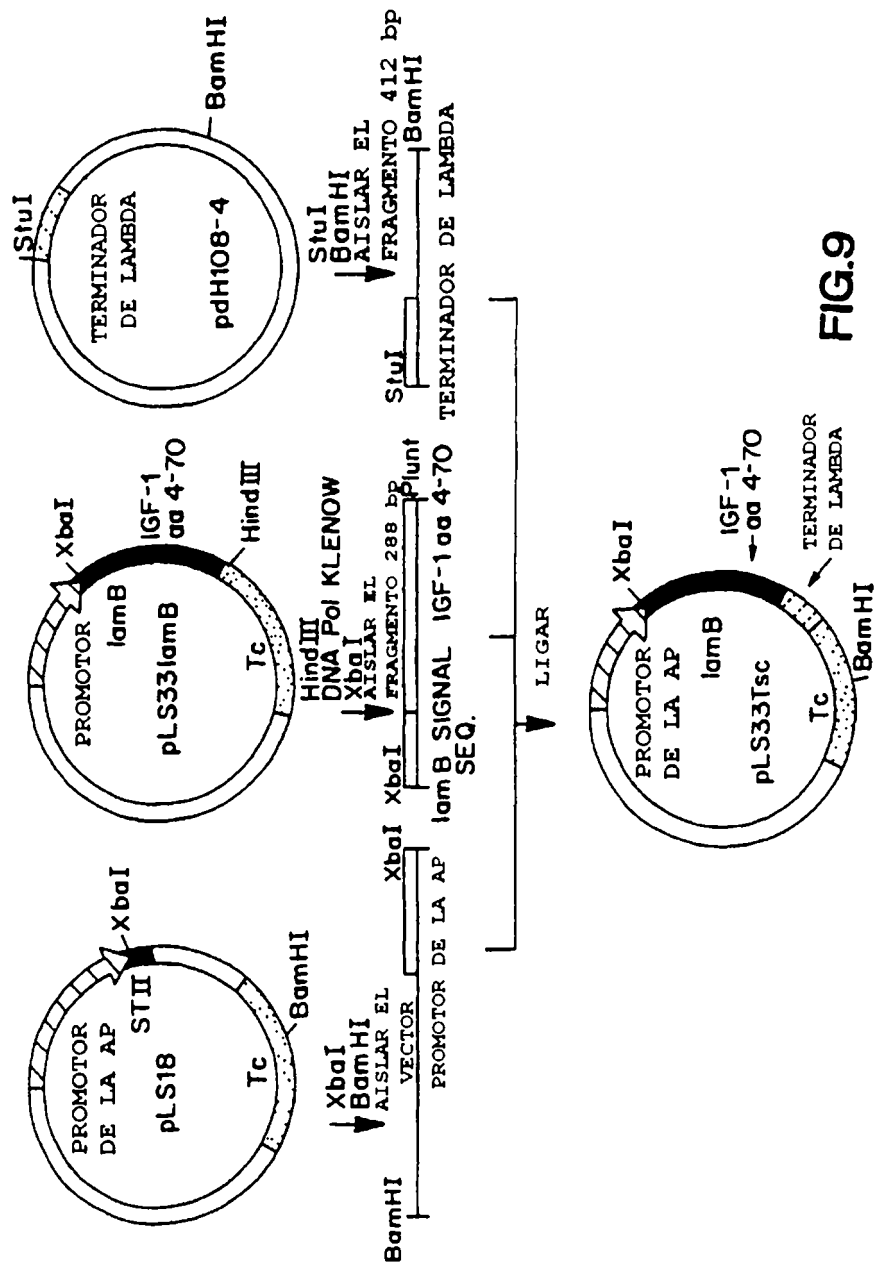


FIG.9

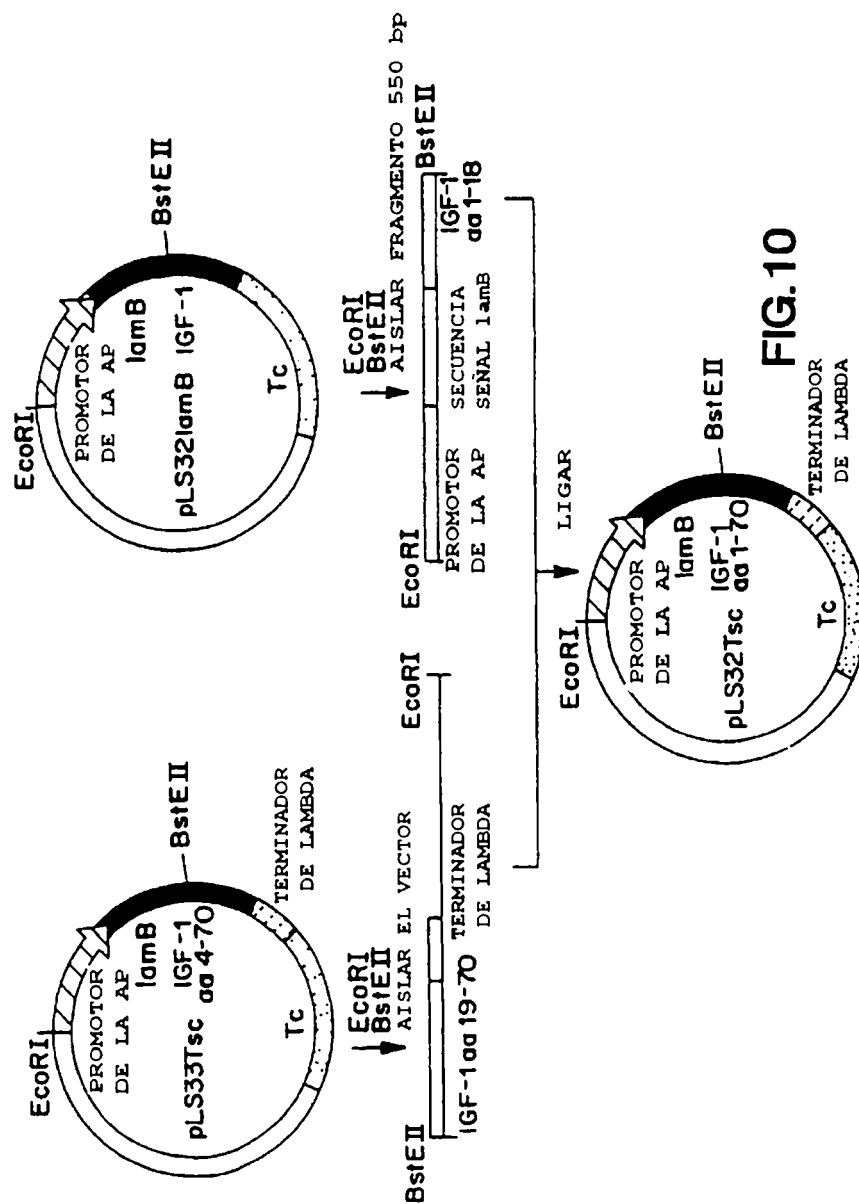


FIG.10

GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC 50
TCATTGCTGA GTTGTTATTT AAGCTTGCCC AAAAAGAAGA AGAGTCGAAT 100
GAACTGTGTG CGCAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT 150
TCGCAATATG GCGCAAAATG ACCAACAGCG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG 200
GGCGGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCTCTGA CGACGATACG 250
GAGCTGCTGC GCGATTACGT AAAGAAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTCAGTA 300
AAAAGTTAAT CTTTTCACA GCTGTCATAA AGTTGTCACG GCCGAGACTT 350
ATAGTCGCTT TGTTTTTATT TTTTAAATGA TTTGTAAC TA CTACGCAAGT 400

FIG.11A

TCACGTA	AAA	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
Lys	Leu	Pro	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Ala	Ala
								-10	
								GTA	ATG
								Val	Met
TCT	GCT	CAG	GCC	ATG	GCC	GGT	CCC	GAA	ACT
Ser	Ala	Gln	Ala	Met	Ala	Gly	Pro	Glu	Thr
									1
								CTG	Leu
								TGC	Cys
								GGT	Gly
GCT	GAA	CTG	GTT	GAC	GCT	CTG	CAG	TTT	GTT
Ala	Glu	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Gln	Phe	Val
									20
								Cys	Gly
								GAC	Asp
									560
CGT	GGT	TTT	TAT	TTT	AAC	AAA	CCC	ACT	GGT
Arg	Gly	Phe	Tyr	Phe	Asn	Lys	Pro	Thr	Gly
									30
								TAT	Tyr
								GGT	Gly
								TCT	Ser
									599

FIG.11B

TCT TCT CGT CGT GCT 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 TTGCCGCCCGG GCGTTTTTTA TTGTTAA 757

La posición número 24 significa el inicio de la secuencia señal del λ anB

La posición número 1 significa el inicio de la proteína IGF-I

FIG.11C

FIG.12

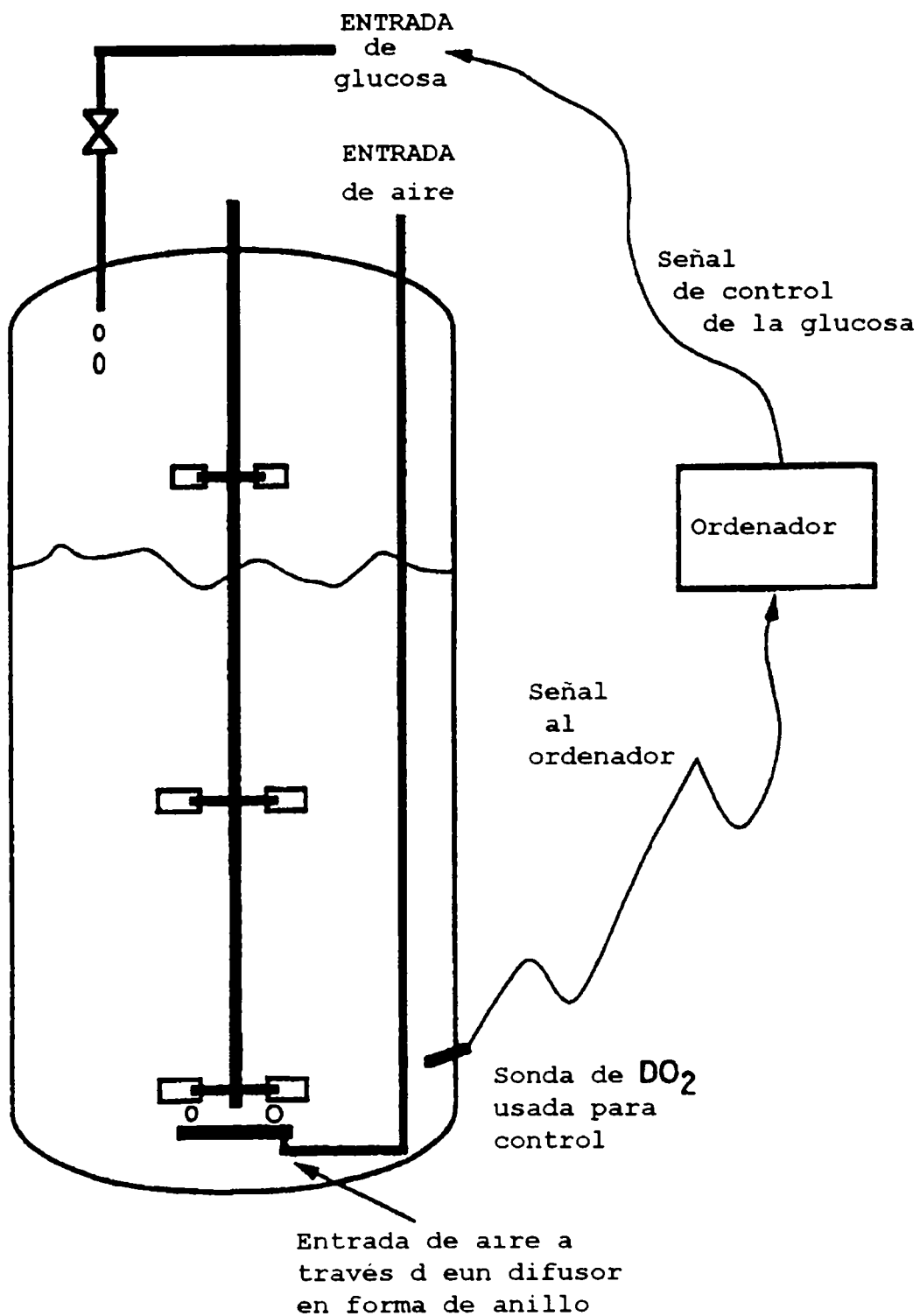


FIG.13A

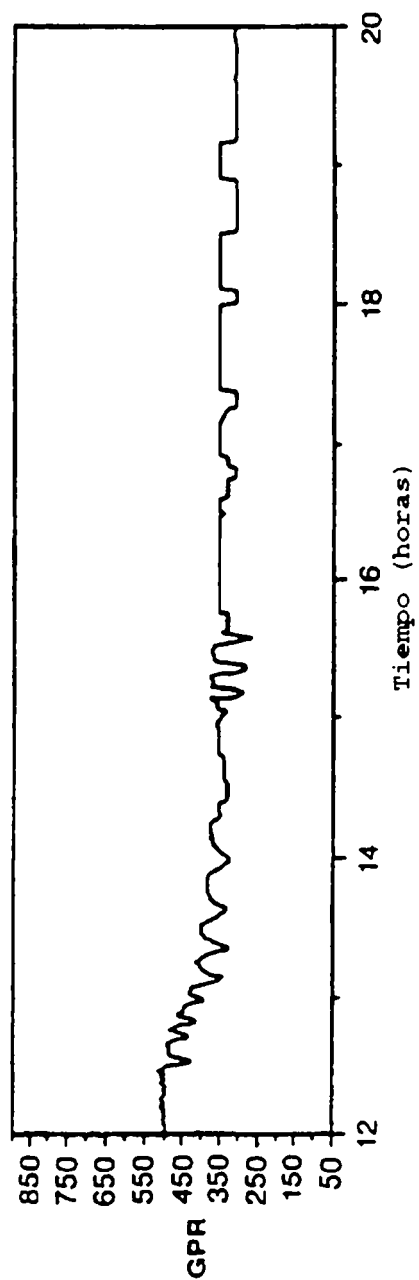
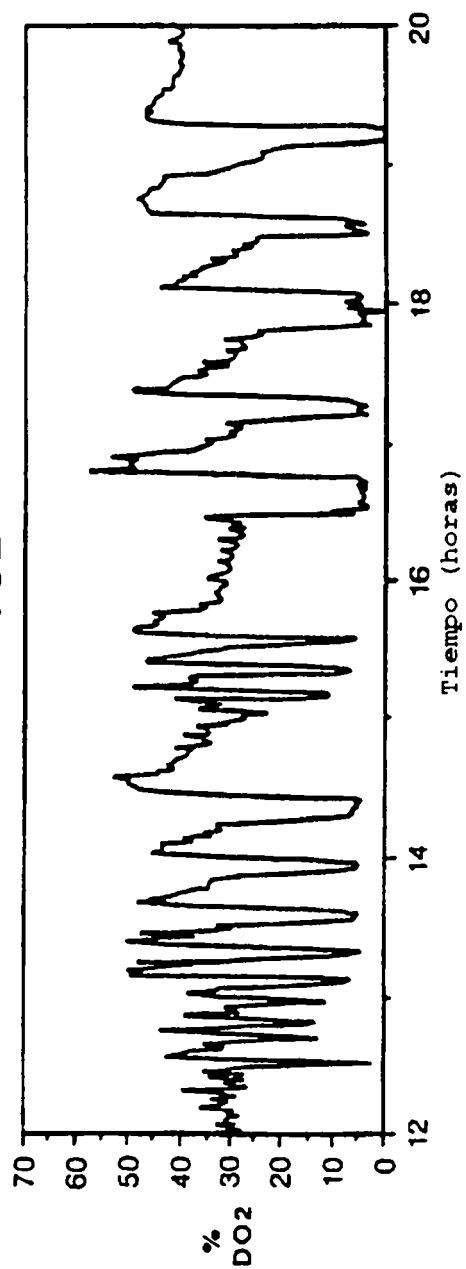


FIG.13B



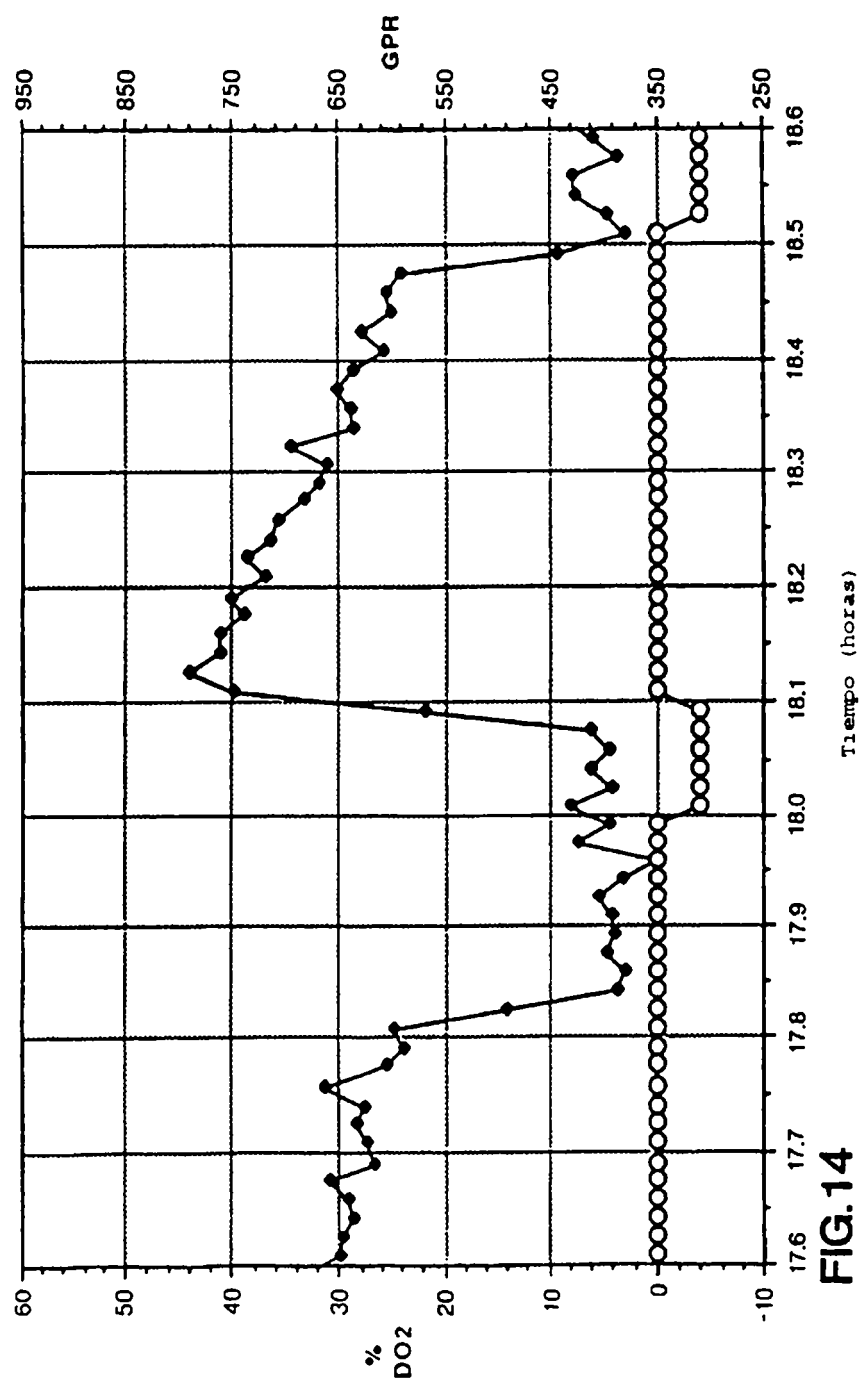


FIG.14

FIG.15

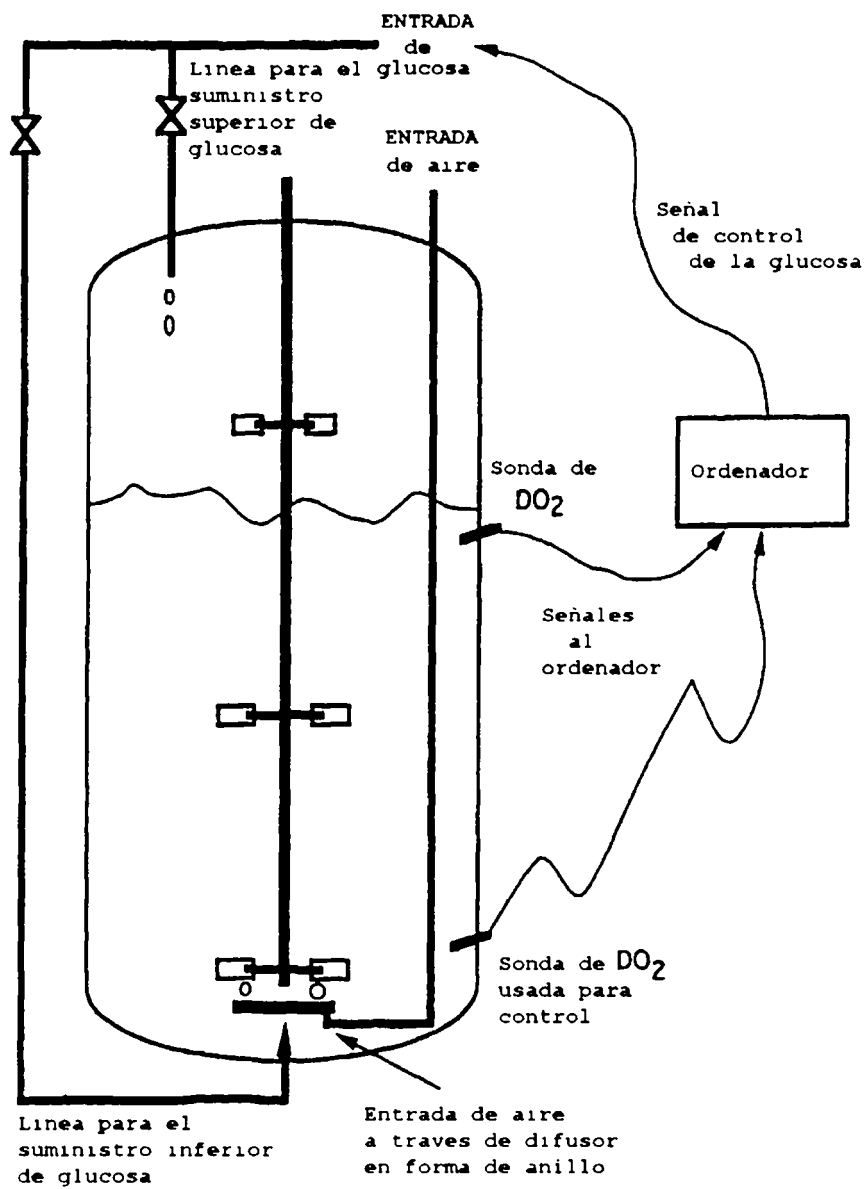
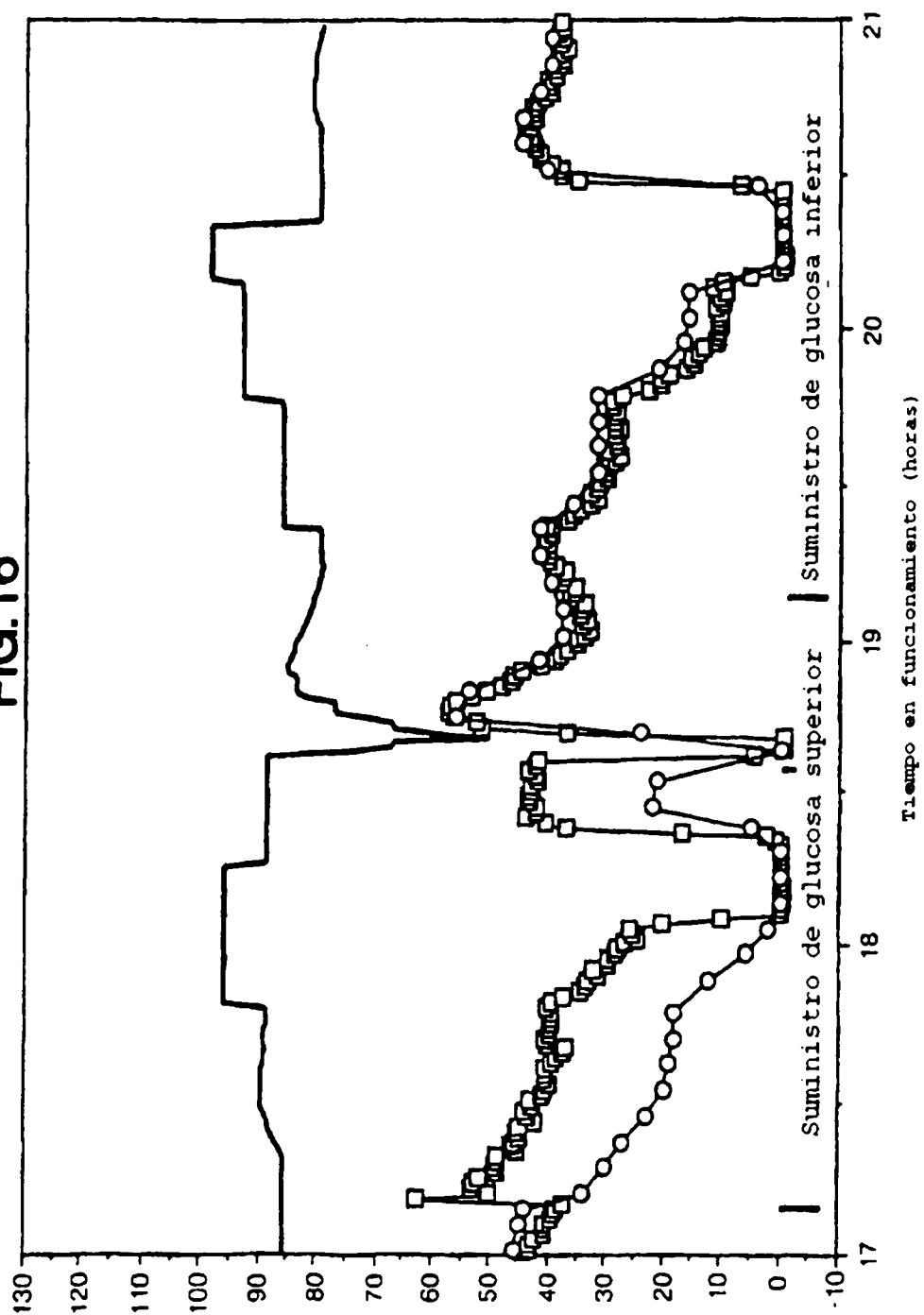


FIG.16



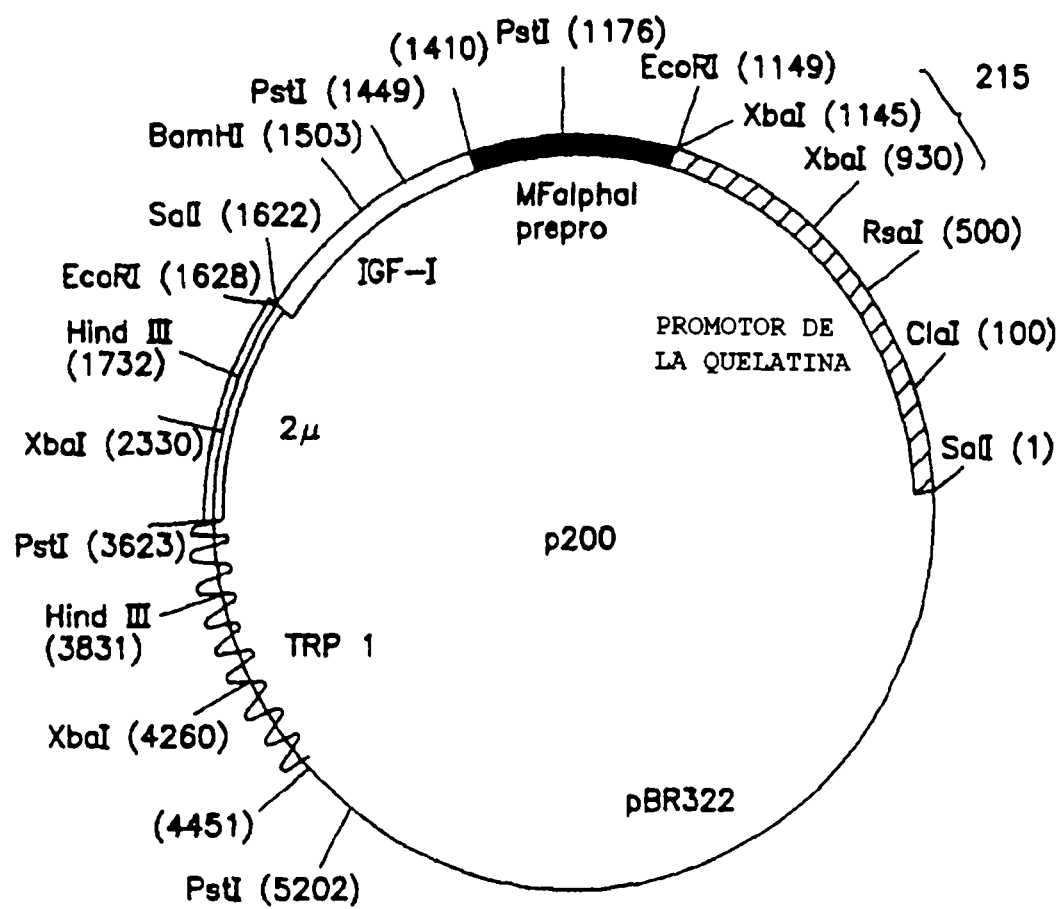


FIG. 17

FIG.18

ECORI (1149)
 5' - GAATTCATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCAGTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGC
 TGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAAGATGAACCGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCTCATCGGTT
 ACTTAGATTTAGAAAGGGATTTCGATGTTGCTGTGTTTGGCCATTTTCCACAGCACAAATAACGGG
 TTATTGTTTATAATACTACTATTGCCAGCATTTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTTTGGATAA
 AAGAGGCCGGAAACTCTGTGCGGGCTGAGCTGCTGTTGACGCTCTGCAAGTTCGTATGTGTGATC
 GAGGCTTCTACTTCAACAAACCGACTGGGTACGGATCTCTCTCGTCTCGTCCGCAACCGGC
 ATCGTTGATGAATGCTGTTTTCGGTCCCTGTGACCTTCGCCGTCGGAATGTACTGCGCTCCGCT
 GAAACCGGCTAAGTCTGCATAGTCGACGAATTC - 3'
 Sall EcorI (1633)

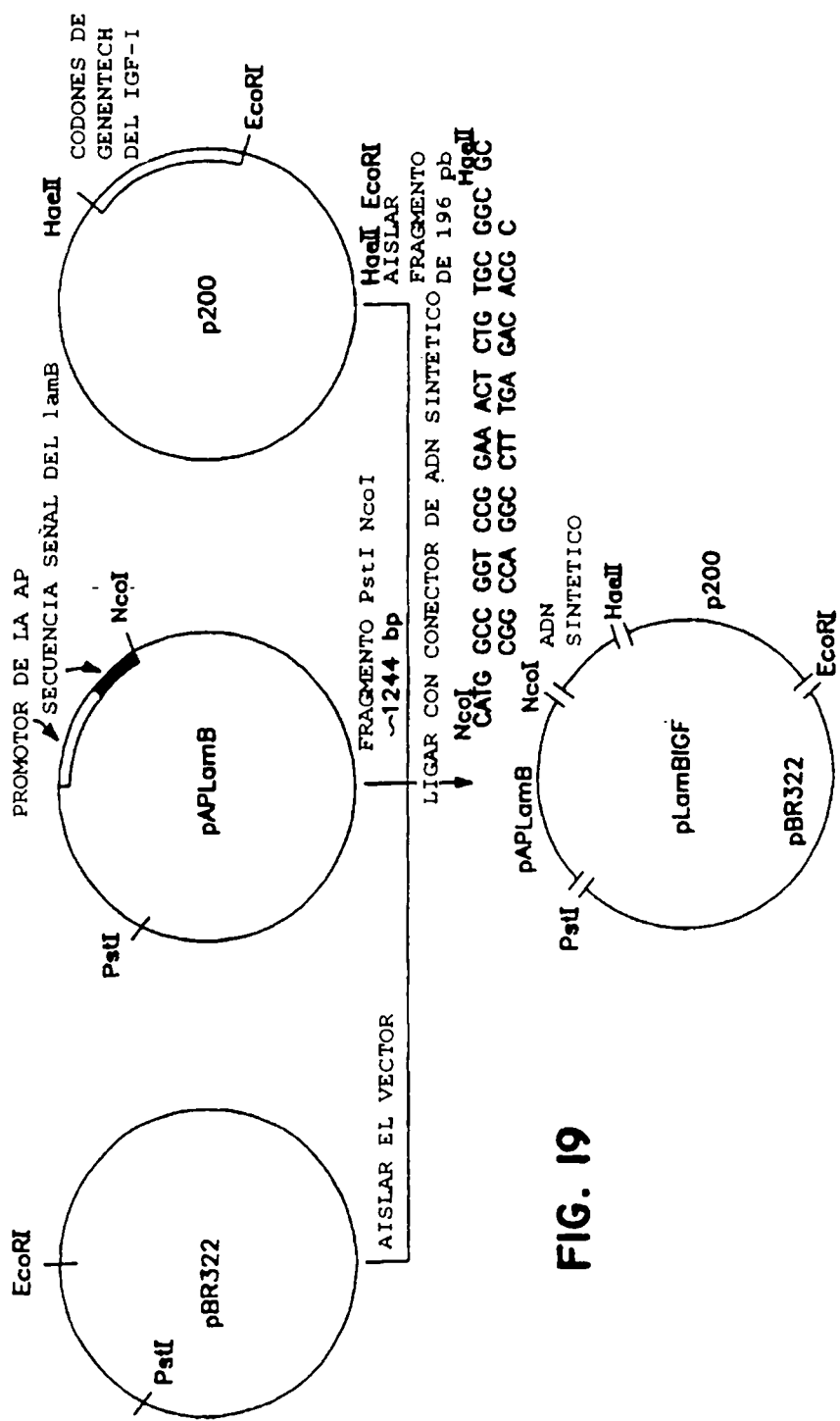


FIG. 19

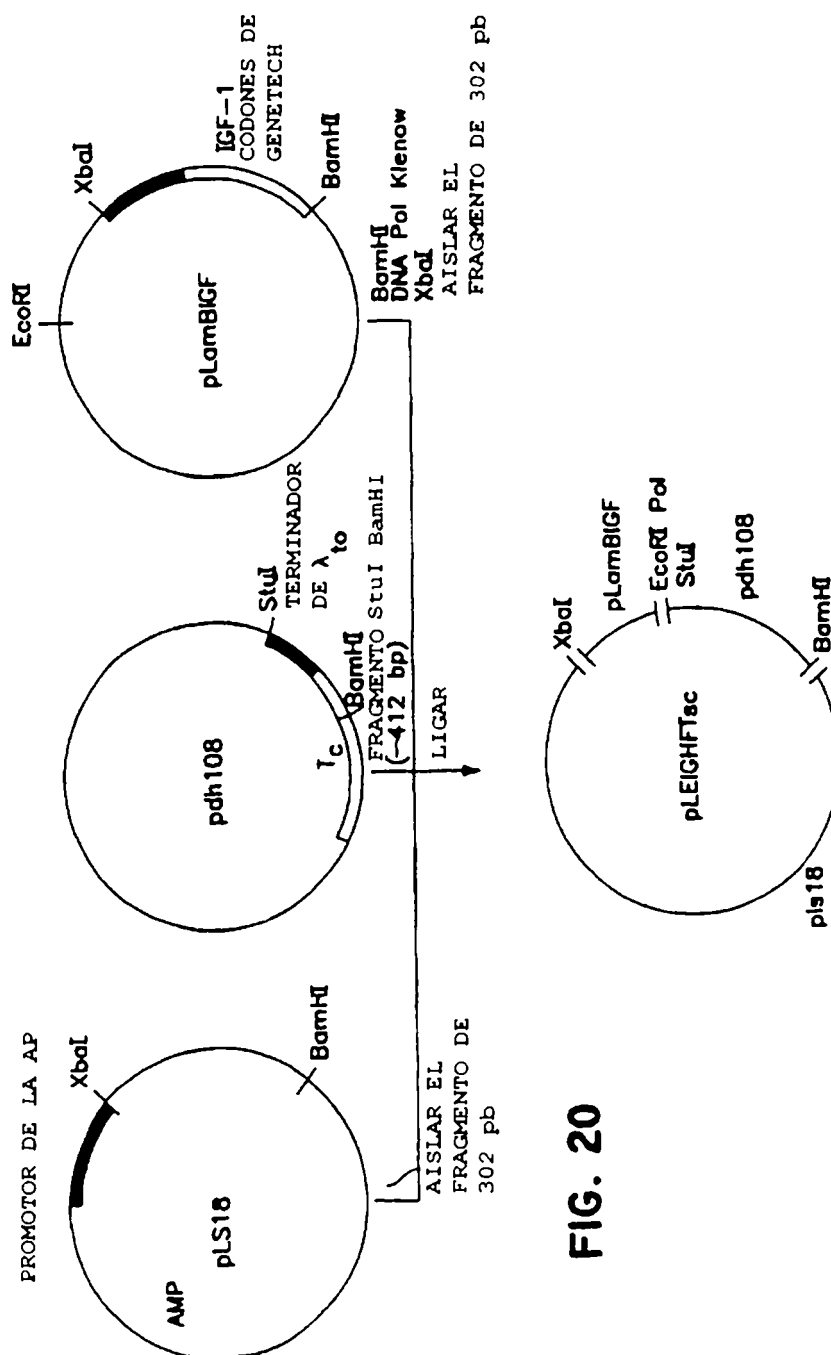


FIG. 20

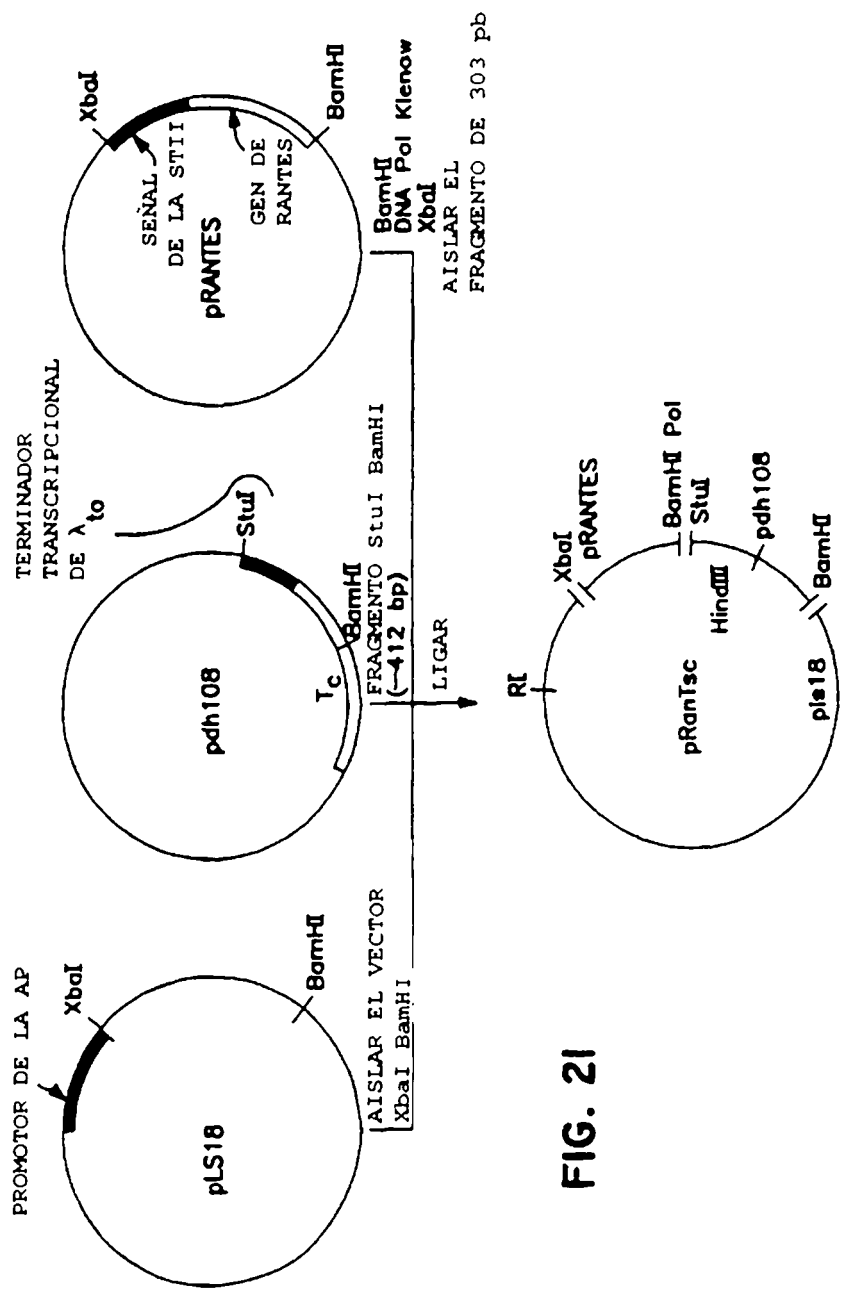


FIG. 21

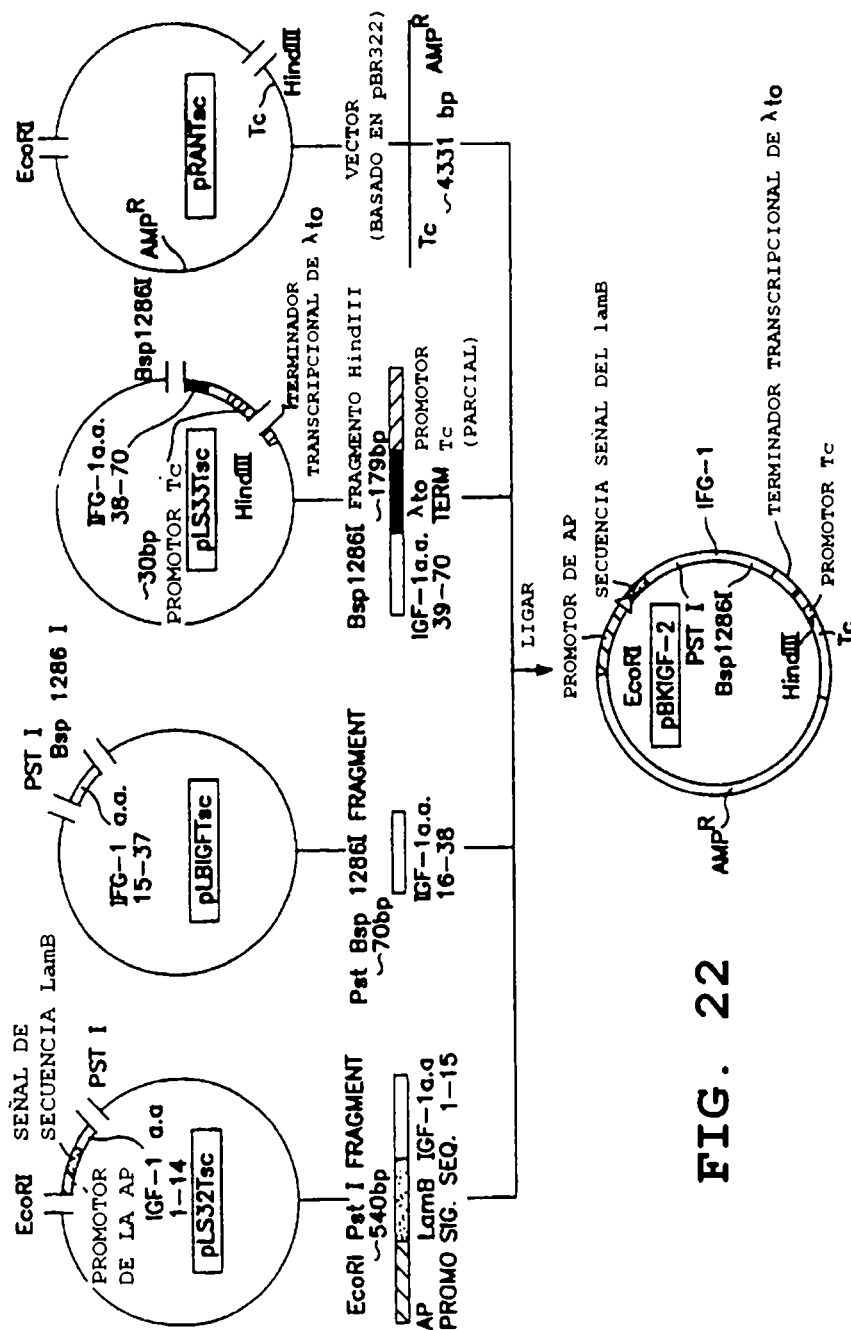


FIG. 22

IGF25 A & B

NcoI CATG GCC GGT CCC GAA ACT CTG TGC GGT GCT GAA CTG GTT GAC GCT CTG CA	PstI CGG CCA GGG CTT TGA GAC ACG CCA CGA CTT GAC CAA CTG CGA G
51mer	43mer

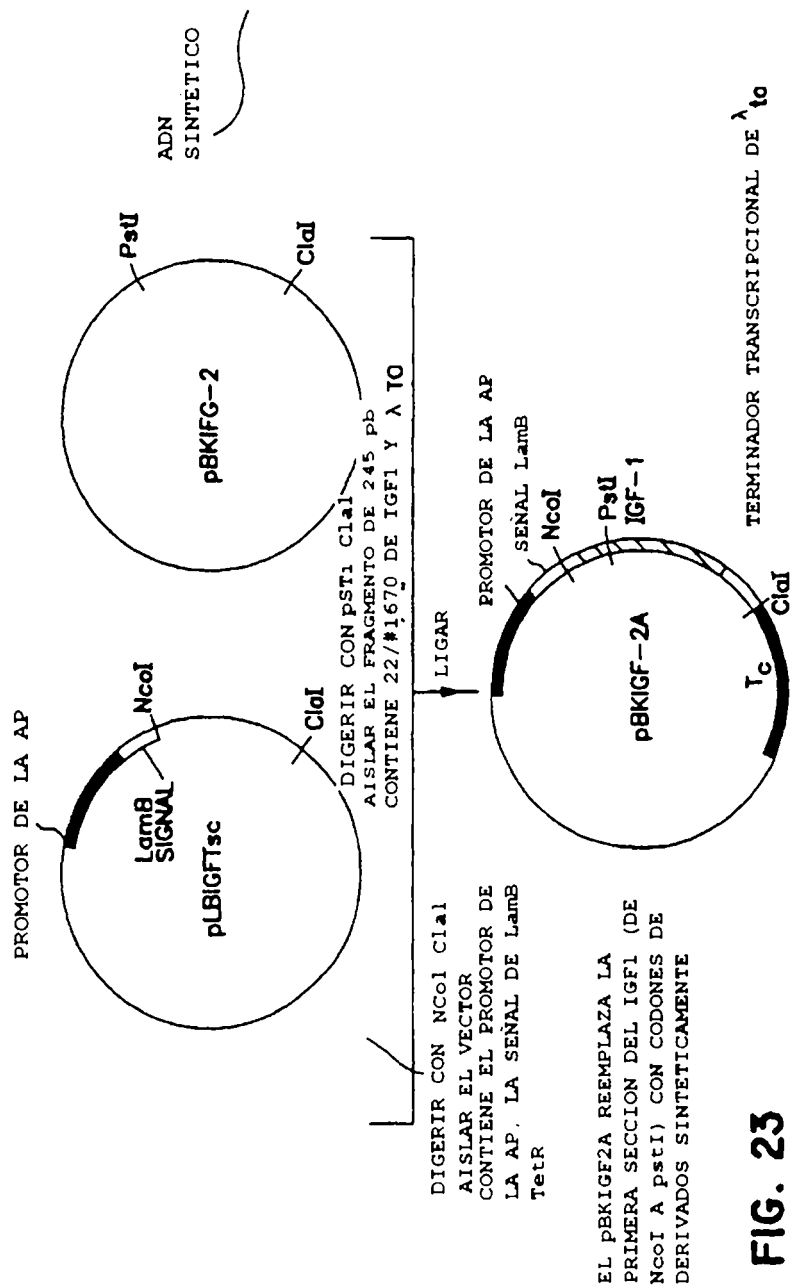


FIG. 23

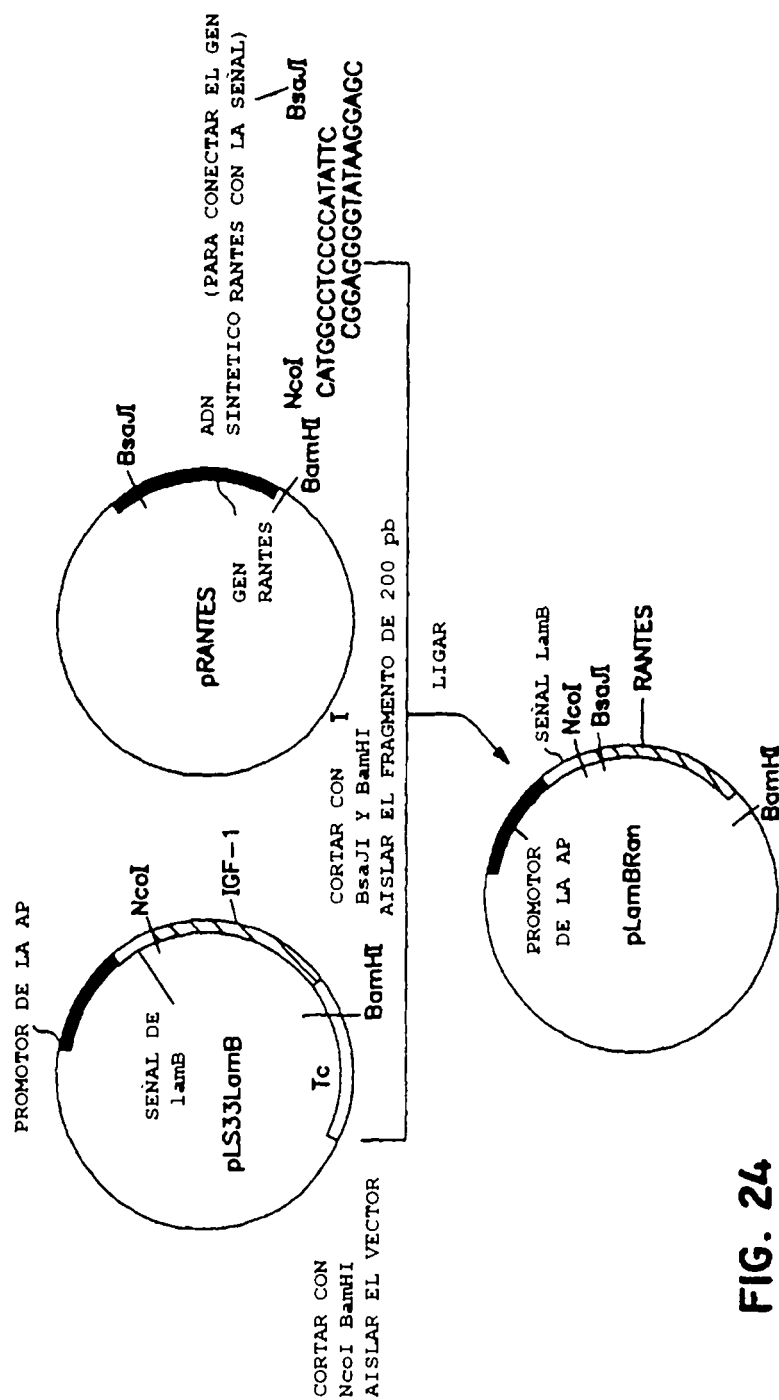


FIG. 24

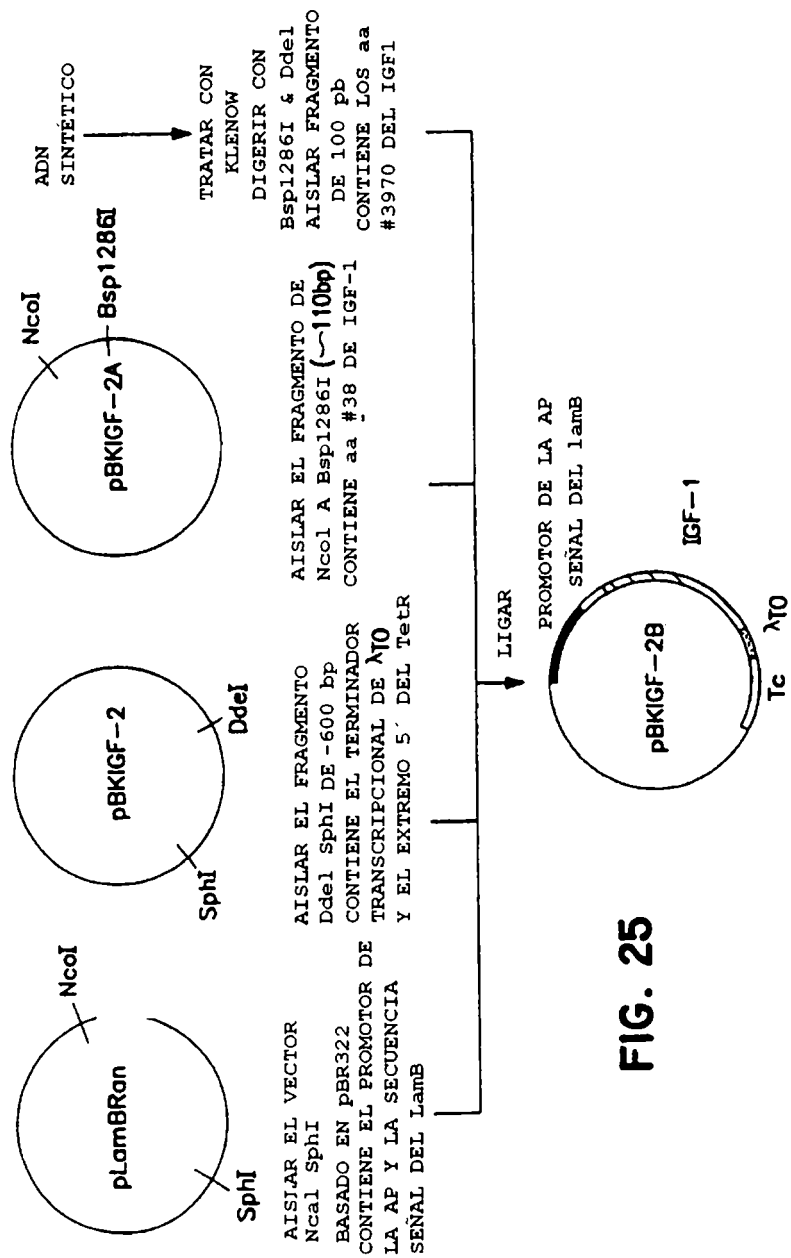


FIG. 25

