

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial

19	ES	11	NÚMERO	10	AI
		21	470.254		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			26-5-78		

AH



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31				
	801.343		27-5-77		ESTADOS UNIDOS
	805.023		9-6-77		" "
	897.709		19-4-78		" "
	897.710		19-4-78		" "
	898.887		21-4-78		" "
	899.002		26-4-78		" "
	899.003		26-4-78		" "

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C07G; C12K		

64 TITULO DE LA INVENCION

UN METODO DE PREPARACION DE UN VECTOR DE TRANSFERENCIA.

71 SOLICITANTE (S)

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

2200 University Avenue, Berkeley, California 94720 ESTADOS UNIDOS

73 INVENTOR (ES)

William J. Rutter; Howard Michael Goodman y Hohn Mitchell Chirgwin, de nacionalidad estadounidense. Axel Ullrich y Peter Horst Seeburg, ambos de nacionalidad alemana. John Shine, de nacionalidad australiana y Raymond Louis Pictet, de nacionalidad suiza.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1

G - guanina

C - citosina

Tris - 2-amino-2-hidroxietyl-1,3-propanodiol

AEDT - ácido etilendiaminotetraacético

5

ATP - adenosina trifosfato

TTP - timidina trifosfato.

10

La importancia biológica de la secuencia de bases del ADN es como reponedor de la información genética. Es sabido que la secuencia de bases en el ADN se utiliza como código que especifica la secuencia de aminoácidos de todas las proteínas producidas por la célula. Además, se utilizan fragmentos de la secuencia con fines reguladores, para controlar el tiempo y la cantidad de la proteína producida. La naturaleza de estos elementos de control solo se conoce parcialmente. Finalmente, la secuencia de bases en cada cadena se utiliza como modelo para la replicación del ADN que acompaña a la división celular.

15

20

La forma en la que la información de la secuencia de bases en el ADN se utiliza para determinar la secuencia de aminoácidos de las proteínas es un proceso fundamental que, en sus líneas generales, es universal para todos los organismos vivos. Se ha demostrado que cada aminoácido normalmente encontrado en las proteínas está determinado por una o más secuencias de trinucleótidos o triplete. Por lo tanto, para cada proteína, existe el correspondiente segmento de ADN que contiene una secuencia de tripletes correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la proteína. El código genético está indicado en la tabla que acompaña a esta memoria.

25

30

En el procedimiento biológico de conversión de la información de la secuencia de nucleótidos en una estructura

1 secuenciada de aminoácidos, se realiza una primera etapa de-
nominada transcripción. En esta etapa, un segmento local de
ADN con una secuencia que especifica la proteína a producir
es primero copiado con ARN. El ARN es un polinucleótido si-
5 milar al ADN a excepción de que contiene ribosa en lugar de
desoxirribosa y uracilo en lugar de timina. Las bases del
ARN son capaces de entrar en el mismo tipo de relaciones de
apareamiento de bases que existe en el ADN. Por consiguiente
la transcripción por el ARN de una secuencia de nucleótidos
10 del ADN será complementaria a la secuencia copiada. Este
ARN es denominado ARN mensajero (ARN^m) debido a su estado
como intermediario entre el aparato genético y el aparato
sintetizador de proteínas de la célula.

15 Dentro de la célula, el ARN^m se utiliza como modelo en
un proceso complejo que implica una multiplicidad de enzimas
y orgánulos dentro de la célula, que da lugar a la síntesis
de una secuencia específica de aminoácidos. Este proceso se
denomina traducción del ARN^m.

20 Frecuentemente hay otras etapas adicionales, denomina-
das procesados, que se realizan para convertir la secuencia
de aminoácidos sintetizada por el proceso traduccional en
una proteína funcional. Un ejemplo es el caso de la insulina.

CODIGO GENETICO

25	Fenilalanina (Phe)	TTK	Histidina (His)	CAK
	Leucina (Leu)	XTY	Glutamina (Gln)	CAJ
	Isoleucina (Ile)	ATM	Asparagina (Asn)	AAK
	Metionina (Met)	ATG	Lisina (Lis)	AAJ
	Valina (Val)	GTL	Acido aspártico (Asp)	GAK
	Serina (Ser)	ORS	Acido glutámico (Glu)	CAJ
30	Prolina (Pro)	CCL	Cisteína (Cis)	TGK

1	Treonina (Thr)	ACL	Triptófano (Tri)	TGG
	Alanina (Ala)	GCL	Arginina (Arg)	WGZ
	Tirosina (Tir)	TAK	Glicina (Gli)	GGL
	Señal de terminación	TAJ		
5	Señal de terminación	TGA		

Clave: Cada triplete de tres letras representa un trinucleótido de ADN, con un extremo 5' a la izquierda y un extremo 3' a la derecha. Las letras representan las bases de purina o pirimidina que forman la secuencia de nucleótidos.

- A = adenina
- G = guanina
- C = citosina
- T = timina
- 15 X = T o C si Y es A o G
- X = C si Y es C o T
- Y = A, G, C o T si X es C
- Y = A o G si X es T
- 20 W = C o A si Z es A o G
- W = C si Z es C o T
- Z = A, G, C o T si W es C
- Z = A o G si W es A
- QR = TC si S es A, G, C o T
- QR = AG si S es T o C
- 25 S = A, G, C o T si QR es TC
- S = T o C si QR es AG
- J = A o G
- K = T o C
- L = A, T, C o G
- 30 M = A, C o T.

1 El precursor inmediato de la insulina es un polipé-
tido sencillo, denominado proinsulina, que contiene las dos
cadenas insulínicas A y B conectadas por otro péptido, C.
Véase Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L. y Aten,
5 B., Science 157, 697 (1967). Recientemente se ha informado
que el producto de la traducción inicial del ARNm de la insulina
no es la propia proinsulina sino una preproinsulina que con-
tiene más de 20 aminoácidos adicionales sobre el extremo ami-
no de la proinsulina. Véase Cahn, S.J., Keim, P. y Steiner
10 D.F., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 73, 1964 (1976) y Lomedico,
P.T. y Saunders, G.F., Nucl.Acids Res. 3, 382 (1976). La
estructura de la molécula de preproinsulina puede ser repre-
sentada esquemáticamente como NH₂-(pre-péptido)-cadena B-
(péptido C)-cadena A-COOH.

15 Muchas proteínas de importancia en medicina o inves-
tigación se encuentran en o son preparadas por las células
de organismos superiores como los vertebrados. Entre estos
se encuentran, por ejemplo, la hormona insulina, otras hor-
monas peptídicas como la hormona de crecimiento, proteínas
20 implicadas en la regulación de la presión sanguínea y una va-
riedad de enzimas con importancia industrial, médica o inves-
tigadora. Frecuentemente es difícil obtener estas proteínas
en cantidades utilizables por extracción del organismo y es-
te problema es especialmente agudo en el caso de las proteí-
25 nas de origen humano. Por lo tanto, existe la necesidad de
técnicas mediante las cuales estas proteínas puedan ser pro-
ducidas por células situadas fuera del organismo, en canti-
dades razonables. En ciertos casos, es posible obtener líneas
de células apropiadas que pueden ser mantenidas por técnicas
30 de cultivo de tejidos. Sin embargo, el crecimiento de las cé-

1 lulas en el cultivo de tejidos es lento, el medio es caro,
las condiciones deben ser controladas con precisión y los
rendimientos son bajos. Además, frecuentemente es difícil
5 mantener una línea de células cultivadas con las caracterís-
ticas diferenciadas deseadas.

En contraste, los microorganismos como las bacterias
son relativamente fáciles de cultivar en medios químicamente
definidos. La tecnología de la fermentación está muy avanza-
da y puede ser controlada bien. El crecimiento de los orga-
10 nismos es rápido y son posibles grandes rendimientos. Ade-
más, estos microorganismos han sido caracterizados genética-
mente por completo y de hecho se encuentran entre los orga-
nismos mejor caracterizados y mejor conocidos.

Por lo tanto, es muy conveniente conseguir la trans-
15 ferencia de un código genético para una proteína de impor-
tancia médica desde un organismo que normalmente produce la
proteína a un microorganismo apropiado. De esta forma, la
proteína puede ser producida por el microorganismo, bajo con-
diciones controladas de crecimiento, y obtenida en las canti-
20 dades deseadas. También es posible conseguir mediante este
procedimiento una reducción sustancial de los costes globa-
les de producción de la proteína deseada. Además, la posibi-
lidad de aislar y transferir la secuencia genética que deter-
mina la producción de una proteína particular a un microorga-
25 nismo con unos antecedentes genéticos bien definidos propor-
ciona una herramienta de investigación de gran valor para el
estudio de cómo es controlada la síntesis de dicha proteína
y cómo la proteína es procesada después de su síntesis. Ade-
30 más, las secuencias genéticas aisladas pueden ser alteradas
para codificar proteínas variantes con propiedades terapéuti-

1 cas o funcionales alteradas.

5 Esta invención proporciona un medio de conseguir los objetivos descritos. Se describe un procedimiento que implica una compleja serie de etapas en las que intervienen reacciones catalizadas por enzimas. La naturaleza de estas reacciones enzimáticas tal como se conoce en la técnica anterior es descrita a continuación.

10 La transcriptasa de inversión cataliza la síntesis de ADN complementario a una cadena del modelo de ARN, en presencia del modelo de ARN, un original olidodesoxinucleótido y los cuatro desoxinucleósidos trifosfatos, dATP, dGTP, dCTP y TTP. La reacción es iniciada por la unión no covalente del original olido-desoxinucleótido al extremo 3' del ARNm seguido de la adición por etapas de los desoxinucleótidos apropiados, determinada por las relaciones de apareamiento de bases con la secuencia de nucleótidos del ARNm, al extremo 3' de la cadena en crecimiento. La molécula producida puede ser descrita con una estructura en horquilla que contiene el ARN original junto con una cadena complementaria de ADN unida a aquél por un bucle de una sola cadena de ADN. La transcriptasa de inversión también es capaz de realizar una reacción similar empleando un modelo de ADN de doble hélice, en cuyo caso el producto resultante es una horquilla de ADN de doble hélice con un bucle de ADN de una cadena que une una serie de extremos. Véase Aviv, H. y Leder, P., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69, 1408 (1972) y Efstratiadis, A., Kafatos, F.C., Maxam, A.F. y Maniatis, T., Cell 7, 279 (1976).

25 Las endonucleasas de restricción son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces fosfodiéster en el ADN de doble hélice, creando con ello una ruptura en la continuidad de la

30

1 cadena de ADN. Si el ADN se encuentra en forma de bucle ce-
rrado, el bucle se convierte en una estructura lineal. La
característica principal de una enzima de este tipo es que
su acción hidrolítica es ejercida solamente en un punto
5 donde ocurre una secuencia específica de nucleótidos. Esta
secuencia es denominada el punto de reconocimiento para la
endonucleasa de restricción. Han sido aisladas endonucleasas
de restricción de diversas fuentes y caracterizadas en fun-
ción de la secuencia de nucleótidos de sus puntos de reco-
10 nocimiento. Algunas endonucleasas de restricción hidrolizan
a los enlaces fosfodiéster sobre ambas cadenas en el
mismo punto, produciendo extremos truncados. Otras catalizan la
hidrólisis de las uniones separadas por unos pocos nucleóti-
dos entre sí, produciendo regiones de una cadena libre en
15 cada extremo de la molécula escindida. Estos extremos de
una cadena son auto-complementarios, por lo tanto cohesivos,
y pueden ser utilizados para reunir el ADN hidrolizado. Como
cualquier ADN susceptible de escisión por dicha enzima debe
contener el mismo punto de reconocimiento, se producirán los
20 mismos extremos cohesivos, de manera que es posible unir se-
cuencias heterólogas de ADN que han sido tratadas con endo-
nucleasa de restricción a otras secuencias análogamente tra-
tadas. Véase Roberts, R.J., Crit.Rev.Biochem. 4, 123 (1976).
Los puntos de restricción son relativamente raros; sin embar-
25 go, la utilidad general de las endonucleasas de restricción
ha sido considerablemente amplificada por la síntesis quí-
mica de oligonucleótidos de doble hélice que llevan la se-
cuencia del punto de restricción. Por lo tanto, prácticamen-
te cualquier segmento de ADN puede ser copulado a cualquier
30 otro segmento, simplemente uniendo el oligonucleótido de

1 restricción apropiado a los extremos de la molécula y some-
tiendo el producto a la acción hidrolítica de la endonucleasa
de restricción apropiada, produciendo así los extremos cohe-
sivos requeridos. Véase Heyneker, H.L., Shine, J., Goodman,
5 H.M., Boyer, H.W., Rosenberg, J., Dickerson, R.E., Narang,
S.A., Itakura, K., Lin, S y Riggs, A.D., Nature 263, 748
(1976) y Scheller, R.H., Dickerson, R.E., Boyer, H.W., Riggs,
A.D. e Itakura, K., Science, 196, 177 (1977).

10 La endonucleasa S1 es una enzima de especificidad
general, capaz de hidrolizar los enlaces fosfodiéster del
ADN de una cadena o de huecos o bucles de una cadena en el
ADN por lo demás de doble hélice. Véase Vogt, V.M., Eur. J.
Biochem. 33, 192 (1973).

15 La ADN ligasa es una enzima capaz de catalizar
la formación de un enlace fosfodiéster entre dos segmentos
de ADN con un 5'-fosfato y un 3'-hidroxilo, respectivamente,
como el que puede formarse con dos fragmentos de ADN reuni-
dos mediante extremos cohesivos. La función normal de la
enzima se cree que se encuentra en la unión de muescas de
20 una hélice en una molécula de ADN por lo demás de doble hé-
lice. Sin embargo, bajo condiciones apropiadas, la ADN
ligasa es capaz de catalizar la ligadura de extremos truncados
en la que son unidas covalentemente dos moléculas con extremos
truncados. Véase Sgaramella, V., Van de Sande, J.H., y Kho-
rana, H.G., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 67, 1468 (1970).

25 La fosfatasa alcalina es una enzima de especificidad
general, capaz de hidrolizar los ésteres fosfóricos inclui-
dos los 5'-fosfatos terminales sobre el ADN.

30 Otra etapa en el procedimiento global a describir
es la inserción de un fragmento específico de ADN en un-

1 vector de ADN, tal como un plásmido. Plásmido es el término
aplicado a cualquier unidad ADN autónomamente replicado que
puede encontrarse en una célula microbiana, distinto del
genoma de la célula huésped propiamente dicha. Un plásmido
5 no está genéticamente ligado al cromosoma de la célula huésped. Los ADN plásmidos existen como moléculas anulares de
doble hélice, generalmente del orden de algunos millones de
peso molecular, aunque algunos tienen un peso molecular superior a 10^8 y habitualmente representan solo un pequeño
10 porcentaje del ADN total de la célula. El ADN plásmido es habitualmente separable del ADN de la célula huésped debido a la gran diferencia de tamaño entre ellos. Los plásmidos pueden replicarse independientemente de la velocidad de división de la célula huésped y en algunos casos su velocidad de replicación puede ser controlada por el investigador
15 mediante variaciones en las condiciones de crecimiento. Aunque el plásmido existe como anillo cerrado, es posible por medios artificiales introducir un segmento de ADN en el plásmido, formando un plásmido recombinante con un tamaño
20 molecular ampliado, sin afectar sustancialmente su capacidad para replicarse o para expresar cualquier gen que pueda llevar. Por lo tanto, el plásmido sirve como vector útil para transferir un segmento de ADN a una nueva célula huésped. Los plásmidos que son útiles para la tecnología del ADN recombinante contienen típicamente genes que pueden ser útiles
25 para fines de selección, tales como genes para dotar de resistencia a las drogas.

30 Para ilustrar la práctica de esta invención, se describe con detalle el aislamiento y la transferencia del gen de insulina de la rata. Se eligió la insulina para este tra-

1 bajo debido a su importancia central desde el punto de vis-
ta de la medicina clínica y desde el punto de vista de la in-
2 vestigación básica. El procedimiento descrito es aplicable
3 por los expertos en este campo al aislamiento del de insuli-
4 na de otros organismos, incluido el hombre.

5 La insulina fué aislada por primera vez en 1922.
6 En la actualidad, el uso de esta hormona en el tratamiento
7 de la diabetes es muy conocido. Aunque los mataderos propor-
8 cionan pancreasas de buey y cerdo como fuentes de insulina,
9 está desarrollándose una escasez de la hormona a medida que
10 aumenta el número mundial de diabéticos. Además, algunos
11 diabéticos desarrollan una reacción alérgica a la insulina
12 de buey y cerdo, con efectos perjudiciales. La capacidad de
13 producir insulina humana en cantidades suficientes para res-
14 pondear a las necesidades mundiales es por lo tanto muy inte-
15 resante. La manufactura de insulina humana en las bacterias
16 es una técnica que podría alcanzar esta meta deseada. Sin
17 embargo, con anterioridad a esta invención, el progreso ha-
18 cia esta meta deseada ha sido reducido por el hecho de que
19 no se ha desarrollado ninguna técnica para introducir el gen
20 de la insulina en una bacteria. Esta invención proporciona
21 esta técnica.

22 La capacidad de obtener ADN con una secuencia espe-
23 cífica que es el código genético para una proteína específi-
24 ca hace posible modificar la secuencia de nucleótidos por
25 medios químicos o biológicos de manera que la proteína es-
26 pecífica finalmente producida también está modificada. Esto
27 permitiría producir, por ejemplo, una insulina modificada
28 a la medida para responder a una necesidad médica específi-
29 ca. La capacidad genética para producir cualquier secuencia
30 de ADN.

1 de aminoácidos relacionada con la insulina que presente las
propiedades funcionales esenciales de la insulina puede ser
por lo tanto comunicada a un microorganismo. Consideraciones
similares son aplicables al caso de las hormonas del creci-
5 miento.

La capacidad para transferir el código genético pa-
ra una proteína específica necesaria para el metabolismo
normal de un organismo superior particular a un microorganis-
mo como una bacteria abre importantes posibilidades a la pro-
10 ducción en cultivo de dichas proteínas. Esto a su vez pro-
porciona importantes posibilidades de aumentar o sustituir
la producción de dichas proteínas con las producidas por mi-
croorganismos alterados de acuerdo con esta invención, siem-
pre que la capacidad del organismo superior para funcionar
15 normalmente en la producción de estas proteínas haya sido
perturbada y sugiere, por ejemplo, la posibilidad de esta-
blecer relaciones simbióticas entre los microorganismos pro-
ducidos de acuerdo con esta invención y los seres humanos,
con enfermedades deficitarias crónicas o agudas, con lo que
20 los microorganismos genéticamente alterados en la forma aquí
descrita pueden ser implantados o de alguna otra forma aso-
ciados al hombre para compensar la deficiencia patológica
en el metabolismo de este último.

25 COMPENDIO DE LA INVENCION

Se describe un procedimiento para aislar una secuen-
cia específica de nucleótidos que contiene información gené-
tica, la síntesis de ADN con la secuencia específica de nu-
cleótidos y la transferencia del ADN a un microorganismo
30 huésped.

La invención es ilustrada por las secuencias especí-

1 ficas de ADN transferidas a una bacteria que incluye el gen
estructural para la preproinsulina de rata, el gen para la
hormona del crecimiento de la rata y el gen para la hormona
del crecimiento humano. Por lo tanto, se considera que el
5 método es aplicable a la transferencia de cualquier sécuencia
deseada de ADN desde un organismo superior, tal como
un vertebrado, a cualquier microorganismo. Un organismo supe-
rior se define aquí como un organismo eucariótico con teji-
dos diferenciados, incluidos, aunque no limitados a ellos,
10 los insectos, moluscos, plantas, vertebrados incluidos los
mamíferos y en esta última categoría incluidos el ganado
vacuno, cerdos, primates y seres humanos. Un microorganismo,
en el sentido entendido en este campo, puede ser cualquier
organismo vivo microscópico como su nombre indica, protista,
15 procariótico o eucariótico, incluidas por ejemplo las bacte-
rias, los protozoos, las algas y los hongos, incluyéndose en
esta última categoría las levaduras. En el procedimiento,
primero se aísla mediante un método mejorado una población
celular seleccionada. Se extrae ARNm intacto de las células
20 por un nuevo procedimiento mediante el cual se suprime vir-
tualmente toda la actividad RNasa. El ARN mensajero intacto
se purifica a partir del extracto por cromatografía en colum-
na y se somete a la acción de la enzima transcriptasa de inver-
sión que actúa en presencia de los cuatro desoxinucleósidos
25 trifosfatos necesarios para sintetizar una cadena complemen-
taria (ADNc). El producto de esta primera reacción con la
transcriptasa de inversión se somete a un procedimiento que eli-
mina selectivamente la secuencia de ribonucleótidos. La se-
cuencia residual de desoxinucleótidos, complementaria al
30 ARNm original, se incuba en una segunda reacción con trans-

1 criptasa de inversión o ADN-polimerasa en presencia de los
cuatro desoxinucleósidos trifosfatos. El producto resultan-
te es una estructura duplex de ADNc con sus cadenas comple-
mentarias unidas entre sí en un extremo mediante un bucle de
5 una cadena. Este producto es tratado después con una nuclea-
sa específica de una cadena que escinde el bucle de una cade-
na. El ADNc de doble hélice resultante se somete después a
una prolongación de su longitud mediante la adición a ambos
extremos de un ADN específico que contiene una secuencia de
10 punto de reconocimiento de una enzima de restricción. La adi-
ción es catalizada por una enzima ADN ligasa. El ADNc pro-
longado se trata a continuación con una endonucleasa de res-
tricción, produciendo extremos de una cadena autocomplementa-
rios en el extremo 5' de cada cadena del duplex.

15 Un ADN plásmido con un punto de reconocimiento para
la misma endonucleasa de restricción se trata con la enzima
con objeto de escindir la cadena de polinucleótidos y produ-
cir secuencias de nucleótidos de una cadena auto-complementa-
rios en los extremos 5'. Los grupos 5'-fosfato terminales so-
20 bre los extremos de una cadena se eliminan para evitar que
el plásmido forme una estructura circular capaz de transfor-
mar a una célula huésped. El ADNc preparado y el ADN del plás-
mido se incuban juntos en presencia de ADN-ligasa. Bajo las
condiciones de reacción descritas, la formación de un anillo
25 cerrado viable de ADN del plásmido solamente puede ocurrir
si se incluye un segmento de ADNc. El plásmido que contiene
la secuencia ADNc se introduce después en una célula huésped
apropiada. Las células que han recibido un plásmido viable
son detectadas por el aspecto de colonias con un rasgo gené-
30 tico conferido por el plásmido, tal como resistencia a una

1 droga. Las cepas bacterianas puras que contienen el plásmi-
do recombinante con la secuencia de ADNc incorporada son des-
pués cultivadas y el plásmido recombinante reaislado. De es-
ta forma pueden prepararse grandes cantidades de ADN del plás-
5 mido recombinante y la secuencia de ADNc específica puede ser
aislada de nuevo de este plásmido por escisión endonucleolí-
tica con la enzima de restricción apropiada.

10 El procedimiento básico de la invención es aplicable
al aislamiento y transferencia a un microorganismo huésped
de cualquier secuencia de nucleótidos deseada obtenida de un
organismo superior, incluido el hombre. El método será útil
en la transferencia de un gen que codifica a una proteína
específica con valor médico o industrial y en la síntesis
15 microbiológica de dicha proteína. Para poner en práctica la
invención, se ha aislado de la rata la secuencia de nucleóti-
dos que codifica a la insulina, se ha transferido a unas
bacterias y se ha replicado en ellas. Análogamente, se ha
aislado la secuencia de nucleótidos que codifica a la hormona
del crecimiento de la rata, se ha transferido y se ha repli-
20 cado en bacterias. El método es aplicable a la transferencia
de una secuencia de nucleótidos aislada de una fuente humana,
incluida la insulina y la hormona del crecimiento humanas,
así como otras hormonas polipeptídicas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

25 Esta invención incluye un método para el aislamiento
de una molécula de ADN con una secuencia de nucleótidos es-
pecífica y su transferencia a un microorganismo, donde la se-
cuencia de nucleótidos original del ADN se encuentra después
de la replicación en el organismo al que se ha transferido.

30 La secuencia de etapas que constituyen el procedimien-

1 to de la invención puede ser clasificada en cuatro categorías generales:

1. Aislamiento de una población celular deseada de un organismo superior

5 Existen dos fuentes posibles de una secuencia genética que codifique una proteína específica: el ADN del organismo fuente propiamente dicho y ARN transcrito del ADN. Los actuales requisitos de seguridad de los Institutos Nacionales de Sanidad de los Estados Unidos especifican que
10 los genes humanos de cualquier clase pueden ser introducidos en ADN recombinante y después en las bacterias solamente una vez que los genes han sido purificados muy cuidadosamente o en instalaciones especiales para casos de gran riesgo (P4). Véase Federal Register, vol. 41, n° 131, 7 de Julio de
15 1967, págs. 27.902-27.943. Por lo tanto, para cualquier procedimiento con utilidad potencial para la producción de proteínas humanas, como el procedimiento de esta invención, la solución preferida consiste en aislar ARNm específico con una secuencia de nucleótidos que codifique a la proteína deseada. La adopción de esta estrategia presenta la ventaja
20 adicional de que el ARNm puede ser purificado más fácilmente que el ADN extraído de la célula. En particular, es posible aprovechar el hecho de que, en organismos altamente diferenciados como los vertebrados, puede ser posible identificar
25 una población específica de células con una situación específica dentro del organismo, cuya función está dedicada fundamentalmente a la producción de la proteína en cuestión. Alternativamente, esta población puede aparecer durante una fase de desarrollo transitoria del organismo. En estas poblaciones celulares, una gran parte del ARNm aislado de las cé-
30

1 lulas tendrá la secuencia de nucleótidos deseada. Por lo tan-
to, la elección de la población celular a aislar y del méto-
do de aislamiento empleado puede ser sustancialmente ventajo-
5 sa desde el punto de vista de la pureza inicial del ARNm ais-
lado de la misma.

En la mayoría de los tejidos, glándulas y órganos,
las células se mantienen unidas mediante una red generalmen-
te fibrosa de tejido conjuntivo, constituida principalmente
por colágeno pero que también puede contener, según el teji-
do de que se trate, otras proteínas estructurales, polisacá-
ridos y depósitos minerales. El aislamiento de las células
de un tejido dado necesariamente requiere el empleo de técni-
cas para liberar las células de la matriz de tejido conjun-
tivo. El aislamiento y purificación de un tipo de célula di-
15 ferenciado específico supone por lo tanto dos fases fundamen-
tales: la separación de las células de la matriz de tejido
conjuntivo y la separación de las células del tipo deseado
de todos los demás tipos de células encontradas en el tejido.
Los principios operativos inherentes y descritos en esta in-
20 vención serán aplicables al aislamiento de una variedad de
tipos de células de una variedad de tejidos de origen. A tí-
tulo de ejemplo, se describirá el aislamiento de islotes de
Langerhans del páncreas, adecuados para el aislamiento del
ARNm que codifica a la insulina.

25 Las células productoras de insulina pueden derivarse
de otras fuentes, tales como el páncreas de ternera fetal o
las células de tumores de islotes cultivadas. El aislamiento
de células puras de islote será mucho más sencillo en estos
casos, especialmente cuando se utilizan cultivos celulares
30 puros. El método de aislamiento de las células de islotes

1 discutido más arriba no será necesario en estos casos; sin embargo, el método continúa siendo ventajoso debido a su aplicabilidad general.

5 Frecuentemente, se encontrará que la proporción de ARNm deseado puede ser aumentada aprovechando las respuestas celulares a los estímulos ambientales. Por ejemplo, el tratamiento con una hormona puede ser causa de una mayor producción del ARNm deseado. Otras técnicas incluyen el crecimiento a una temperatura particular y la exposición a un nutriente específico o a otra sustancia química. En el aislamiento del ARNm de la hormona del crecimiento de la rata, el tratamiento de las células de la pituitaria de la rata cultivadas con hormona tiroide y glucocorticoides aumenta sinérgicamente la proporción de ARNm de la hormona del crecimiento en una cantidad importante.

15 2. Extracción del ARNm

Una característica importante de esta invención es la eliminación esencialmente completa de la actividad RNasa en el extracto celular. El ARNm que ha de ser extraído es una sola cadena de polinucleótidos, despareada de cualquier cadena complementaria. Por lo tanto, la escisión hidrolítica de un solo enlace fosfodiéster en la secuencia volverá inútil a toda la molécula para los fines de transferir una secuencia genética intacta a un microorganismo. Como se ha indicado anteriormente, la enzima RNasa está ampliamente distribuida y es activa y excepcionalmente estable. Se encuentra en la piel, sobrevive a las técnicas habituales de lavado del material de vidrio y algunas veces contamina a los productos químicos orgánicos. Las dificultades son especialmente graves cuando se trata de extractos de células de páncreas

1 ya que el páncreas es una fuente de enzimas digestivas y,
por lo tanto, es rico en RNasa. Sin embargo, el problema de
la contaminación con RNasa se encuentra en todos los tejidos
y el método aquí descrito para eliminar la actividad RNasa
5 es aplicable a todos los tejidos. La eficacia excepcional
del método se pone de manifiesto en esta invención por el
éxito del aislamiento de ARNm intacto de células de islotes
aisladas del páncreas.

10 Esta invención emplea una combinación de un anión
caotrópico, un catión caotrópico y un agente rompedor del
enlace disulfuro, durante la disrupción celular y durante
todas las operaciones requeridas para separar ARN esencial-
mente exento de proteína. La eficacia de la acción combinada
de los agentes antes citados ha sido demostrada por su utili-
15 zación en el aislamiento de ARNm esencialmente sin degradar
con buen rendimiento a partir de islotes aislados de Langerhans
de páncreas de rata.

20 La elección de los iones caotrópicos adecuados se basa
en su solubilidad en medios acuosos y en su disponibilidad.
Los cationes caotrópicos adecuados son el guanidinio, carba-
moilguanidinio, guanilguanidinio, litio y similares. Entre
los aniones caotrópicos adecuados se encuentran el yoduro,
perclorato, tiocianato, diyodosalicilato y similares. La efi-
25 cacia relativa de las sales combinadas combinando estos catio-
nes y aniones estará determinada en parte por su solubilidad.
Por ejemplo, el diyodosalicilato de litio es un desnaturizan-
te más potente que el tiocianato de guanidinio pero tiene una
solubilidad de solamente alrededor de 0,1M y también es rela-
30 tivamente caro. El tiocianato de guanidinio constituye la
combinación preferida de catión-anión debido a que es fácil-

1 mente asequible y es muy soluble en medios acuosos, hasta
5M aproximadamente.

5 Se sabe que los compuestos tiólicos, como el β -mercap
toetanol, rompen los enlaces disulfuro intramoleculares de
las proteínas mediante una reacción de intercambio tiol-di-
sulfuro. Se conocen muchos compuestos tiólicos adecuados efec-
tivos, incluidos, además del β -mercaptoetanol, el ditiotrei-
tol, la cisteína, el propanol dimercaptano y similares. La
10 solubilidad en agua es una propiedad necesaria ya que el
compuesto tiólico debe encontrarse presente en gran exceso
sobre los disulfuros intramoleculares con objeto de que la
reacción de intercambio sea esencialmente completa; se pre-
fiere el β -mercaptoetanol debido a su disponibilidad a pre-
cio razonable.

15 Para los fines de inhibir la RNasa durante la extrac-
ción de ARN de las células o tejidos, la eficacia de una sal
caotrópica dada depende directamente de su concentración.
La concentración preferida, por lo tanto, es la concentración
20 máxima que pueda emplearse en condiciones prácticas. Se cree
que el éxito de esta invención en preservar intacto el ARNm
durante la extracción depende de la rapidez con la cual es
desnaturalizada la RNasa, además del grado de desnaturaliza-
ción. Esto se cree que explica, por ejemplo, la superiori-
25 dad del tiocianato de guanidinio sobre el hidrocloreuro, a
pesar del hecho de que el hidrocloreuro solo es ligeramente
menos potente como agente desnaturalizante. La eficacia de
un desnaturalizante se define como la concentración umbral
necesaria para conseguir la desnaturalización completa de
30 una proteína. Por otra parte, la velocidad de desnaturaliza-
ción de muchas proteínas depende de la concentración del des-

1 naturalizante con respecto al umbral, elevada desde la quinta
a la décima potencia. Véase Tanford, C.A., Adv.Prot.Chem. 23,
121 (1968). Cualitativamente esta relación sugiere que un
5 desnaturalizante solo ligeramente más potente que el hidroclo-
ruro de guanidinio puede desnaturalizar a una proteína a una
velocidad muchas veces mayor a la misma concentración. Se
cree, que antes de esta invención, no ha sido reconocida o
explotada la relación entre la cinética de la desnaturaliza-
10 ción de la RNasa y la preservación del ARNm durante su extrac-
ción de las células. El análisis precedente, si es correcto,
sugiere que el desnaturalizante preferido será el que presen-
te una baja concentración umbral de desnaturalización combi-
nada con una gran solubilidad en agua. Por esta razón, el
15 tiocianato de guanidinio se prefiere sobre el diyodo-salici-
lato de litio incluso aunque este último es un desnaturali-
zante más potente, debido a que la solubilidad del tiociana-
to de guanidinio es mucho mayor y por lo tanto puede ser uti-
lizado a una concentración que permite una inactivación más
rápida de la RNasa. El análisis precedente también explica
20 por qué se prefiere el tiocianato de guanidinio a la sal hi-
drocloruro de solubilidad comparable, ya que el primero es
un desnaturalizante algo más potente.

El uso de un agente rompedor del enlace disulfuro en
combinación con un desnaturalizante potencia y aumenta la
25 eficacia de este último al permitir que la molécula de RNasa
se desdoble completamente. Se cree que el compuesto tióxico
aumenta la velocidad del proceso de desnaturalización al im-
pedir la rápida renaturalización que puede producirse cuando
los enlaces disulfuro intramoleculares se dejan intactos.
30 Además, cualquier RNasa contaminante que quede en la prepa-

1 ración de ARNm permanecerá sustancialmente inactiva, inclu-
so en ausencia del desnaturalizante y del tiol. Los agentes
rompedores del enlace disulfuro con grupos tiol son eficaces
5 hasta cierto punto a cualquier concentración, aunque en gene-
ral, se prefiere un gran exceso de grupos tiol con respecto
a los enlaces disulfuro intramoleculares, para desplazar la
reacción de intercambio en la dirección de la escisión del
disulfuro intramolecular. Por otra parte, muchos compuestos
10 tiólicos son malolientes y de manejo desagradable a gran
concentración, de manera que existe un límite superior prác-
tico de la concentración. Empleando β -mercaptoetanol, se han
encontrado eficaces unas concentraciones del orden de 0,05M
a 1,0M y una concentración de 0,2M se considera óptima para
el aislamiento de ARN sin degradar del páncreas de la rata.

15 El pH del medio durante la extracción del ARNm de
las células puede ser cualquiera comprendido entre 5,0 y 8,0.

Después de la etapa de disrupción celular, el ARN
se separa de la masa de proteína celular y del ADN. Para es-
te fin se han puesto a punto diversos procedimientos, todos
20 ellos adecuados y todos conocidos en este campo. Una prácti-
ca común en la técnica anterior consiste en utilizar un pro-
ceso de precipitación con etanol que precipita selectivamen-
te el ARN. La técnica preferida de esta invención consiste
en obviar la precipitación y depositar el homogenado directa-
25 mente sobre una solución de cloruro césico 5,7M en un tubo
de centrífuga y después someter el tubo a centrifugación co-
mo describe Glisin, V., Crkvejakov, R. y Byus, C., Biochemis-
try, 13, 2633 (1974). Se prefiere este método porque se man-
tiene un medio continuamente hostil a la RNasa y se recupera
30 el ARN con gran rendimiento, exento de ADN y proteína.

1 Los procedimientos descritos permiten purificar el
ARN total del homogenado celular. Sin embargo, solamente
una parte de este ARN es el ARNm deseado. Para purificar
5 todavía más el ARNm, se aprovecha el hecho de que, en las
células de los organismos superiores, el ARNm, después de
la transcripción, es procesado en la célula mediante la
unión de ácido poliadenílico. Este ARNm que contiene secuen-
cias poli A unidas al mismo puede ser aislado selectivamente
10 por cromatografía en columnas de celulosa a las que se une
oligo-timidilato, como describen Aviv, H. y Leder, P. supra.
Los procedimientos anteriores son suficientes para proporcio-
nar ARNm traducible, intacto y esencialmente puro, proceden-
te de fuentes ricas en RNasa. La purificación del ARNm y
los subsiguientes procesos in vitro pueden realizarse esen-
15 cialmente de la misma manera para cualquier ARNm, indepen-
dientemente del organismo de origen.

 Bajo ciertas circunstancias, por ejemplo cuando se
utilizan células de cultivo tisular como fuente de ARNm,
20 la contaminación por RNasa puede ser suficientemente baja
para que no sea necesario utilizar el método de inhibición
de la RNasa que acabamos de describir. En estos casos, pue-
den ser suficientes las técnicas conocidas con anterioridad
para la reducción de la actividad de la RNasa.

3. Formación de ADNc

25 Remitimos a la Figura 1 que representa esquemáticamen-
te las etapas restantes del procedimiento. La primera etapa
de este procedimiento es la formación de una secuencia
de ADN complementario del ARNm purificado. La enzima de elec-
ción para esta reacción es la transcriptasa de inversión, aun-
30 que en principio puede utilizarse cualquier enzima capaz de

1 formar una cadena de ADN complementario fiel utilizando el
ARNm como modelo. La reacción puede llevarse a cabo en las
condiciones descritas en la técnica anterior, empleando ARNm
5 como modelo y una mezcla de cuatro desoxinucleósidos trifos-
fatos como precursores de la cadena de ADN. Es conveniente
que uno de los desoxinucleósidos trifosfatos esté marcado
con ^{32}P en la posición alfa con objeto de controlar el curso
de la reacción, proporcionar una marca para recuperar el pro-
10 ducto después de los procedimientos de separación como cro-
matografía y electroforesis y con objeto de realizar estima-
ciones cuantitativas de la recuperación. Véase Efstratiadis,
A. y colaboradores, supra.

15 Como indica la figura, el producto de la reacción con
la transcriptasa de inversión es una estructura en horquilla
de doble hélice, con enlaces no covalentes entre la cadena
de ARN y la cadena de ADN.

20 El producto de la reacción con la transcriptasa de
inversión se separa de la mezcla de reacción por las técnicas
habituales conocidas en este campo. Se ha encontrado útil
emplear una combinación de extracción con fenol, cromatogra-
fía sobre Sephadex¹ G-100 y precipitación con etanol.

25 Una vez que ha sido enzimáticamente sintetizado el
ADNc, el ARN modelo puede ser separado. Se conocen diversos
procedimientos de la técnica anterior para la degradación
selectiva del ARN en presencia de ADN. El método preferido
es la hidrólisis alcalina, que es muy selectiva y puede ser
fácilmente controlada ajustando el pH.

30 Después de la reacción de hidrólisis alcalina y la

1 Marca registrada, Pharmacia Inc., Uppsala, Suecia.

1 subsiguiente neutralización, el ADNc marcado con ^{32}P puede ser concentrado por precipitación con etanol, si se desea.

5 La síntesis de un ADNc en horquilla de doble hélice se realiza empleando una enzima apropiada, tal como ADN polimerasa o transcriptasa de inversión. Se emplean condiciones de reacción similares a las descritas anteriormente, incluido el uso de un nucleósido trifosfato marcado con $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$. La transcriptasa de inversión se puede adquirir de 10 diversas fuentes. Una fuente conveniente es el virus de la mieloblastosis aviar. El virus puede adquirirse al Dr. D.J. Beard, Life Sciences Incorporated, St. Petesburg, Florida, que produce el virus bajo contrato con los National Institutes of Health de Estados Unidos.

15 Después de la formación de la horquilla de ADNc, puede ser conveniente purificar el ADN de la mezcla de reacción. Como se ha descrito anteriormente, se ha encontrado conveniente emplear las etapas de extracción con fenol, cromatografía sobre Sephadex G-100 y precipitación con etanol para purificar el producto ADN, exento de proteína contaminante.

20 La estructura en horquilla puede convertirse en una estructura convencional de ADN de doble hélice mediante la separación del bucle de una cadena que une los extremos de las cadenas complementarias. Para este fin se dispone de diversas enzimas capaces de escindir hidrolítica y específicamente las regiones de una cadena del ADN. Una enzima conveniente para este fin es la nucleasa S1 aislada de Aspergillus oryzae. La enzima puede ser adquirida de Miles Research Products, Elkhart, Indiana. Tratando la estructura en horquilla de ADN con nucleasa S1 se consigue un gran rendimiento 25 de moléculas de ADNc con extremos apareados básicos. Después 30

1 de la extracción, se realiza la cromatografía y la precipi-
tación con etanol como se ha descrito anteriormente. El uso
de transcriptasa de inversión y nucleasa S1 en la síntesis
del ADNc de doble hélice transcrito de ARNm ha sido descri-
5 to por Efstratiadis y colaboradores, supra.

Opcionalmente, la proporción de moléculas de ADNc con
extremos truncados puede ser elevada al máximo por tratamiento
con ADN polimerasa I de E. coli en presencia de los cuatro
desoxinucleósidos trifosfatos. La combinación de las activida-
10 des exonucleasa y polimerasa de la enzima actúa eliminando
cualquier extremo 3' protuberante y llenando cualquier extre-
mo 5' protuberante. La participación de la proporción máxima
de moléculas de ADNc en las reacciones de ligadura subsi-
guientes queda así garantizada.

15 La siguiente etapa del procedimiento implica el tra-
tamiento de los extremos del producto ADNc para proporcionar
las secuencias apropiadas en cada extremo que contengan un
punto de reconocimiento por la endonucleasa de restricción.
La elección del fragmento de ADN que ha de ser agregado a
20 los extremos está determinada por cuestiones de comodidad de
manipulación. La secuencia que ha de ser agregada a los extre-
mos se selecciona sobre la base de la enzima endonucleasa de
restricción particular elegida y esta elección depende a su
vez de la elección del vector de ADN con el que ha de recombi-
25 narse el ADNc. El plásmido elegido debe tener por lo menos
un punto susceptible de escisión por la endonucleasa de res-
tricción. Por ejemplo, el plásmido pMB9 contiene un punto
de restricción para la enzima Hind III. La enzima Hind III
se aísla del Hemophilus influenzae y se purifica por el mé-
30 todo de Smith, H.O. y Wilcox, K.W., J.Mol.Biol. 51, 379

1 (1970). La enzima Hae III, de Hemophilus aegyptious, se pu-
rifica por el método de Middleton, J.H., Edgell, M.H. y
Hutchison III, C.A., J.Virol. 10, 42 (1972). Una enzima
5 de Hemophilus suis, denominada Hsu I, cataliza la misma hi-
drólisis específica del punto, en el mismo punto de recono-
cimiento que la Hind III. Estas dos enzimas, por lo tanto,
se consideran funcionalmente intercambiables.

Es conveniente emplear un decanucleótido de doble
hélice químicamente sintetizado, que contenga la secuencia
10 de reconocimiento de la Hind III, para unirlo a los extremos
del dúplex de ADNc. El decanucleótido de doble hélice contie-
ne la secuencia indicada en la Figura 1. Véase Heyneker, F.
L. y colaboradores y Scheller, R.H. y colaboradores, supra.
Los expertos en este campo disponen de varias secuencias sin-
15 téticas de puntos de restricción de manera que es posible
preparar los extremos de un ADN dúplex de manera que sean
sensibles a la acción de una cualquiera de una amplia varie-
dad de endonucleasas de restricción.

La unión de las secuencias de restricción a los extre-
20 mos de ADNc puede realizarse por cualquier etapa conocida
por los expertos en este campo. El método de elección es una
reacción denominada ligadura de los extremos truncados catali-
zada por ADN ligasa purificada por el método de Panet, A.,
y colaboradores, Biochemistry 12, 5045 (1973). La reacción de
25 ligadura de extremos truncados ha sido descrita por Sgaranella,
W. y colaboradores, supra. El producto de la reacción de liga-
dura de los extremos truncados entre un ADNc de extremos truncados
y un gran exceso molar de decanucleótido de doble hélice que
30 contiene el punto de restricción por la endonucleasa Hind
III es un ADNc con las secuencias de restricción por la Hind

1 III en cada extremo. Por tratamiento del producto de reac-
ción con la endonucleasa Hind III se produce la escisión en
el punto de restricción con formación de extremos 5' auto-
complementarios de una cadena, como muestra la Figura 1.

5 4. Formación de un vector de transferencia de ADN recombinante

En principio, puede utilizarse una amplia variedad
de ADNs víricos y plásmidos para formar recombinantes con
un ADNc preparado en la forma que acabamos de describir. Los
requisitos principales son que el vector de transferencia
10 de ADN sea capaz de entrar en una célula huésped, experimen-
tar replicación en la célula huésped y, además, contener un
determinante genético a través del cual sea posible seleccio-
nar las células huéspedes que han recibido el vector. Sin
embargo, por razones de seguridad pública, la gama de elec-
15 ción debe limitarse a las especies de vectores de transferen-
cia consideradas adecuadas para el tipo de experimentos em-
pleados, de acuerdo con las indicaciones de los National
Institutes of Health, supra. La lista de vectores de trans-
ferencia de ADN aprobados está siendo continuamente amplia-
20 da a medida que son desarrollados nuevos vectores y aproba-
dos por el Comité de Seguridad del ADN recombinante de los
NIH y debe sobreentenderse que esta invención considera el
uso de cualquier ADN vírico y plásmido que presente las pro-
piedades descritas, incluidos los aprobados más adelante por
25 los NIH. Entre los vectores de transferencia adecuados, cuyo
uso ya ha sido aprobado, se encuentran diversos derivados del
bacteriófago lambda (véase, por ejemplo Blattner, F.R.,
Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber,
H.E., Furlong, L.A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.E., Moore,
30 D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L. y Smithies, O., Science

1 196, 161 (1977)) y derivados del plásmido col E1 (véase,
por ejemplo, Rodríguez, R.L. Bolívar, S., Goodman, H.M.,
Boyer, H.W. y Betlach, M.N., Simposio ICN-UCLA sobre Meca-
5 nismos Moleculares en el Control de la Expresión Genética,
D.P. Nierlich, W.J. Rutter, C.F. Fox, Eds. (Academic Press,
NY, 1976), págs. 471-477). Los plásmidos derivados del col
E1 se caracterizan por ser relativamente pequeños, tener
10 pesos moleculares del orden de algunos millones y presentar
la propiedad de que el número de copias de ADN del plásmido
por célula huésped puede ser aumentado desde 20-40 bajo con-
diciones normales hasta 1000 o más mediante tratamiento de
las células huésped con cloranfenicol. La capacidad de ampli-
ficar la dosis de gen dentro de la célula huésped hace posi-
15 ble, bajo circunstancias apropiadas y bajo el control del
investigador, inducir a la célula huésped a producir funda-
mentalmente proteínas codificadas por los genes contenidos
en el plásmido. Estos derivados de col E1 son por lo tanto
los vectores de transferencia preferidos en el procedimien-
to de esta invención. Entre los derivados adecuados de col
20 E1 se encuentran los plásmidos pMB-9, que lleva el gen de
la resistencia a la tetraciclina y el pBR-313, pBR-315,
pBR-316, pBR-317 y pBR-322 que, además del gen de la resister-
cia a la tetraciclina, contienen un gen de la resistencia a
la ampicilina. La presencia de los genes de la resistencia
25 a las drogas constituye un método conveniente de seleccionar
las células que han sido infectadas por el plásmido con éxi-
to, ya que las colonias de estas células crecerán en presen-
cia de la droga mientras que las células que no han recibido
el plásmido no crecerán o formarán colonias. En los experi-
30 mentos aquí descritos como ejemplos específicos de esta in-

1 vención, se utilizó siempre un plásmido derivado de col E1
que contenía, además del marcador resistente a la droga des-
crito, un punto Hind III.

5 Como en el caso de la elección del plásmido, la elec-
ción de un huésped adecuado es en principio muy amplia pero,
por razones de seguridad pública, está estrechamente restrin-
gida. Se ha desarrollado una cepa de E. coli denominada
X-1776 que ha sido aprobada por los NIH para los procedimien-
10 tos del tipo aquí descrito, utilizando instalaciones de con-
tención P2. Véase Curtiss, III, R., Ann.Rev.Microbiol., 30,
507 (1976). La cepa E. coli RR-1 es adecuada cuando se dis-
pone de instalaciones de contención P3. Como en el caso de
los plásmidos, se sobreentiende que la invención considera
15 el uso de cualquier cepa de células huéspedes con capacidad
de actuar como transferentes de I. vector elegido, incluidos
los protistos distintos de bacterias, siempre que el uso de
estas cepas haya sido aprobado por los NIH.

20 Los plásmidos recombinantes se forman mezclando ADN
de plásmido tratado con endonucleasa de restricción con
ADNc que contiene grupos terminales tratados de forma simi-
lar. Con objeto de reducir al mínimo la oportunidad de que
los segmentos de ADNc formen combinaciones entre sí, el ADN
de plásmido se agrega en exceso molar sobre el ADNc. En los
25 procedimientos de la técnica anterior, esto ha dado lugar a
que la mayoría de los plásmidos formen círculos sin un frag-
mento de ADNc insertado. Las células subsiguientemente trans-
formadas contenían principalmente plásmido y no plásmidos re-
combinantes de ADNc. Como resultado de ello, el proceso de
selección era muy tedioso y largo. La solución de la técni-
30 ca anterior a este problema ha consistido en intentar dise-

1 fiar vectores de ADN con un punto para la endonucleasa de
restricción en el centro de un gen marcador adecuado de ma-
nera que la inserción de un recombinante divide el gen, pro-
duciendo así la pérdida de la función codificada por el gen.

5 Preferiblemente, se emplea un método para reducir el
número de colonias que han de ser examinadas para seleccio-
nar los plásmidos recombinantes. El método consiste en tra-
tar el ADN de plásmido cortado con la endonucleasa de res-
tricción con fosfatasa alcalina, una enzima comercial que
10 puede adquirirse en diversas fuentes, tales como Worthington
Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey. El tratamien-
to con fosfatasa alcalina separa los 5'-fosfatos terminales
de los extremos del plásmido generados por la endonucleasa
e impide la autoligadura del ADN de plásmido. Por consiguiente,
15 la formación del círculo, y por lo tanto la transformación,
dependerá de la inserción de un fragmento de ADN que contenga
extremos 5'-fosforilados. El procedimiento descrito redu-
ce la frecuencia relativa de transformación sin recombinación
a menos de 1 a 10^{+4} .

20 Esta invención se basa en el hecho de que la reacción
catalizada por ADN ligasa tiene lugar entre un grupo termi-
nal 5'-fosfato del ADN y un grupo terminal 3'-hidroxilo del
ADN. Si se separa el 5'-fosfato terminal, no se produce reac-
ción de unión. Cuando ha de unirse un ADN de doble hélice,
25 son posibles tres situaciones, como indica la Tabla I.

1

TABLA I

Caso	Reactivos		Producto de la ligasa	
I	3' ———— OH	H ₂ O ₃ PO ———— 5'	3' ———— O-P-O ———— 5'	+ 2H ₂ O
5	————— OPO ₃ H ₂ 5'	HO ———— 3'	————— O-P-O ———— 5'	————— 3'
II	3' ———— OH	H ₂ O ₃ PO ———— 5'	3' ———— O-P-O ———— 5'	+ H ₂ O
10	————— OH 5'	OH ———— 3'	————— OH HO ———— 5'	————— 3'
III	3' ———— OH	HO ———— 5'	no reacciona	
15	————— OH 5'	HO ———— 3'		

20

25

30

En la Tabla I, el ADN de doble hélice está representado esquemáticamente por líneas paralelas continuas, mientras que sus respectivos grupos terminales 5' y 3' están marcados con hidroxilo (OH) o fosfato (OPO₃H₂), según el caso. En el caso I, los 5'-fosfatos aparecen en ambos extremos reactivos, con el resultado de que ambas cadenas se unen covalentemente. En el caso II, solamente una de las cadenas que ha de ser unida contiene un 5'-fosfato terminal, con el resultado de que se produce una unión covalente de una cadena, dejando una rotura de discontinuidad de una cadena en la otra cadena. La cadena no unida covalentemente permanece asociada a la molécula unida debido a las interacciones de puentes de hi-

1 drógeno entre las parejas de bases complementarias sobre ca-
denas opuestas, como es sabido. En el caso III, ninguno
de los extremos reactivos contiene un 5'-fosfato y no pue-
de producirse ninguna reacción de unión.

5 Por lo tanto, pueden evitarse las reacciones de unión
indeseables por tratamiento de los extremos reactivos apro-
piados, cuya unión desea evitarse, para eliminar los grupos
5'-fosfato de los mismos. Puede emplearse cualquier método
adecuado para eliminar los grupos 5'-fosfato que no dañe
10 de alguna otra manera a la estructura del ADN. Se prefiere
la hidrólisis catalizada por la enzima fosfatasa alcalina.

El procedimiento que acabamos de describir también es
útil en el caso de que una molécula de ADN lineal haya de di-
vidirse en dos sub-fragmentos, típicamente empleando una
15 enzima endonucleasa de restricción, y después reconstituírse
la secuencia original. Los sub-fragmentos pueden ser purifi-
cados independientemente y la secuencia deseada puede ser
reconstituida reuniendo los sub-fragmentos. La enzima ADN
ligasa, que cataliza la unión extremo a extremo de los frag-
20 mentos de ADN puede emplearse para este fin. Véase Sgarame-
lla, V., Van de Sande, J.H. y Khorana, H.G., Proc.Natl.Acad.
Sci USA 67, 1468 (1970). Cuando las secuencias que han de
unirse no son de extremos truncados, puede utilizarse la ligasa
obtenida de E. coli, Modrich, P. y Lehman, I.R., J.Biol.Chem.
25 245, 3626 (1970).

La eficiencia de la reconstitución de la secuencia
original a partir de los sub-fragmentos producidos por el
tratamiento con la endonucleasa de restricción es considera-
blemente aumentada mediante el uso de un método que evite la
30 reconstitución en una secuencia inadecuada. Este resultado

1 indeseable se evita mediante tratamiento del fragmento de
ADNc de longitud homogénea de la secuencia deseada con un
agente capaz de separar los grupos 5'-fosfato terminales
del ADNc antes de la escisión del ADNc homogéneo con una
5 endonucleasa de restricción. Se prefiere la enzima fosfata-
sa alcalina. Los grupos 5'-fosfato terminales constituyen un
requisito previo estructural para la acción de unión subsi-
guiente de la ADN ligasa utilizada para reconstituir los
sub-fragmentos separados. Por lo tanto, los extremos que
10 carecen de un 5'-fosfato terminal no pueden ser unidos co-
valentemente. Los sub-fragmentos de ADN solamente pueden
ser unidos en los extremos que contienen un grupo 5'-fosfa-
to generado por la escisión con la endonucleasa de restric-
ción realizada sobre los fragmentos aislados de ADN.

15 El procedimiento anterior evita la formación de la
reacción de unión indeseada más significativa, a saber,
la unión de los dos fragmentos en secuencia invertida, cola
a cabeza en lugar de cabeza a cola. Otras reacciones secun-
darias posibles, como la formación de dímero y la ciclación,
20 no son evitadas ya que pueden producirse mediante una reac-
ción del tipo II, supra, Tabla I. Sin embargo, estas reac-
ciones secundarias son menos molestas ya que conducen a pro-
ductos físicamente separables e identificables, mientras que
la recombinación en orden invertido no lo hace así.

25 Con objeto de ilustrar los procedimientos anteriormen-
te descritos, se ha aislado un ADNc que codifica a la insuli-
na de rata y se ha recombinado con un plásmido.

30 Se utilizaron moléculas de ADN para transformar E. coli
X-1776. Los transformantes se seleccionaron por crecimiento
sobre un medio que contenía tetraciclina. Un ADN de plásmido

1 recombinante obtenido de células transformadas se encontró
que contenía un fragmento de ADN insertado con una longitud
de aproximadamente 410 nucleótidos. También se obtuvieron y
5 analizaron otros recombinantes, aislados por procedimientos
similares. Los fragmentos insertados se liberaron del plásmido por digestión con endonucleasa Hind III o Hsu I y se sometieron a un análisis de la secuencia de ADN por el método de Maxam, A.M. y Gilbert, W., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 560 (1977). Se halló que las secuencias de nucleótidos de
10 los fragmentos de ADN insertados eran superponibles y contenían la región de codificación completa para la proinsulina I de rata, así como 13 de los 23 aminoácidos de la secuencia del prepéptido. Se construyó un compuesto de la secuencia de nucleótidos de esta región como se indica más adelante.
15

En un procedimiento similar, se aisló el ADNc que codifica a la hormona del crecimiento de la rata, se recombinó con un plásmido y se transfirió a E.coli. Se volvió a aislar una secuencia de nucleótidos con una longitud de aproximadamente 800 nucleótidos después de extensa replicación en E.coli y se halló que comprendía toda la secuencia de codificación para la hormona del crecimiento de la rata así como porciones del péptido precursor y una porción de la región 5' - sin traducir.
20

25 El procedimiento que acabamos de describir es aplicable en general al aislamiento y purificación de un gen de un organismo superior, incluido un gen humano, así como su transferencia a un microorganismo y replicación en este último. Se describen nuevos plásmidos recombinantes que
30 tienen la totalidad o una parte del gen aislado. Se descri-

1 ben nuevos microorganismos de naturaleza desconocida hasta
ahora, que contienen como parte de su sistema genético un
gen de un organismo superior. A continuación describiremos
5 ejemplos específicos que detallan cada etapa del procedi-
miento aplicado al aislamiento, purificación y transferencia
del gen de la insulina de la rata a E.coli, con objeto de
revelar más claramente las características y utilidad de
esta invención. Los siguientes ejemplos caracterizan los
10 plásmidos recombinantes que contienen porciones del gen de
la insulina de la rata, el gen de la hormona del crecimiento
de la rata, el gen de la insulina humana y el gen de la hor-
mona del crecimiento humana y nuevos microorganismos que
contienen dichos genes.

EJEMPLOS OPERATIVOS

15

EJEMPLO 1

Los procedimientos descritos pomen de manifiesto la
extracción y aislamiento de ARNm de insulina de rata, la
síntesis de un ADN complementario de aquél y la caracteriza-
ción del ADN complementario. Para preparar células de aislo-
20 te de rata purificadas, el páncreas de una rata anestesia-
da se infundió con solución salina de Hank, por infusión
retrógrada en el conducto pancreático. La solución salina
de Hank es una mezcla patrón de solución salina conocida en
este campo y obtenible de diversas fuentes comerciales,
25 como Gran Island Biological Supply Company, Grand Island,
New York. Después se extirpó el páncreas, se desmenuzó en
solución de Hank a 0°C y se digirió con colagenasa e inhi-
bidor de la tripsina de soja. Todos los procesos se reali-
zaron a 0-4°C salvo indicación en contrario. Las condicio-
30 nes del proceso de digestión eran extraordinariamente crí-

1 ticas. En un tubo de vidrio de 30 ml se introdujeron 2 pán-
creas de rata desmenuzados con un volumen total de 8 ml en
medio de Hank. Todos los tubos de vidrio se trataron previa-
mente con silicona². La mezcla de incubación contenía 12 mg
5 de colagenasa, una enzima preparada a partir de Clostridium
histolyticum, esencialmente por el método de Mandl, I.,
Mackennan, J.D. y Howes, E.L., J.Clin.Invest. 32, 1323
(1943), tipo CLS.IV, obtenido de la Worthington Biochemical
Corporation, Freehold, New Jersey, y 1 mg de inhibidor de la
10 tripsina de soja, obtenido de la Sigma Chemical Company,
St. Louis, Missouri. La incubación se realizó a 37°C duran-
te 25 minutos, sacudiendo a un ritmo de 90 sacudidas por mi-
nuto. Fué necesario inspeccionar continuamente para garanti-
zar que la digestión con colagenasa había transcurrido has-
15 ta el grado óptimo. Si la incubación era demasiado corta,
las células de islote eran liberadas incompletamente y si
la incubación era demasiado larga, las células de islote
podían empezar a lisarse. Después de la incubación, el tubo
fué centrifugado durante 1 minuto a 200 x G. Se decantó el
20 líquido sobrenadante y el gránulo se lavó con solución de
Hank y este proceso se repitió cinco veces. Después de la
centrifugación final, el gránulo se suspendió en 15 ml de
Ficoll³, con una densidad de 1,085. Se agregó una capa de
25 8 ml de Ficoll de densidad 1,080, después se agregó una ca-
pa de 5 ml de Ficoll de densidad 1,060 y el tubo se centri-
fugó en un rotor de cesta oscilante durante 5 minutos a
500 x G, seguidos de 5 minutos a 2000 x G. Como resultado

30 -----
2 - Siliclad, marca comercial, Clay-Adams Division, Becton-
Dickinson Inc., Parsippany, New Jersey

3 - Marca comercial, Pharmacia Chemical Company, Uppsala, Suecia

1 del procedimiento anterior, quedaron en el fondo del tubo
células acinares y las células de islote ascendieron en el
gradiente y formaron un banco entre las dos capas superiores.
La banda de células de islote contenía células contaminantes
5 de ganglio, nodos linfáticos y tejido conjuntivo. Se separaron grandes fragmentos contaminantes del material de la banda. El resto de la preparación se colocó bajo un microscopio de disección donde los materiales contaminantes visibles se retiraron manualmente utilizando una micropipeta.
10 La preparación celular se diluyó después con solución de Hank y se centrifugó. El líquido sobrenadante se decantó y el gránulo celular se conservó congelado en nitrógeno líquido.

15 Se homogeneizaron células de islote reunidas de 200 ratas en tiocianato de guanidinio $4M^4$ conteniendo β -mercaptoetanol 1M tamponado a pH 5,0 a 4°C. El homogenado se depositó sobre 1,2 ml de CsCl 5,7M conteniendo AEDT 100 mM y se centrifugó durante 18 horas a 37.000 rpm en el rotor SW 50.1 de una ultracentrífuga Beckman a 15°C (Beckman
20 Instrument Company, Fullerton, California). El ARN se movió hasta el fondo del tubo.

Se aisló ARN poliadenilado por cromatografía de la preparación total de ARN sobre oligo(dT)-celulosa, de acuerdo con el procedimiento de Aviv, H. y Leder, P., supra.

25 Para transcribir el ARN poliadenilado total desde los islotes de rata de Langerhans al ADNc se utilizó transcriptasa de inversión del virus de la mieloblastosis aviar, proporcionado por D.J. Beard, Life Science Inc., St. Peters
30 4 - Tridom, marca comercial, Fluka AG Chemische Fabrik, Buchs, Suiza

1 burg, Florida. Las reacciones se realizaron en Tris 50 mM-
HCl, pH 8,3, MgCl₂ 9 mM, NaCl 30 mM, β-mercaptoetanol 20 mM,
1 mM de cada uno de los tres desoxirribonucleósidos trifos-
5 trifosfato marcado con α-³²P, actividad específica 50-200
curios por mol, 20 µg/ml de oligo-dT₁₂₋₁₈ de Collaborative
Research, Waltham, Massachusetts, 100 µg/ml de ARN poliade-
nilado y 200 unidades/ml de transcriptasa de inversión. La
mezcla se incubó a 45°C durante 15 minutos. Después de la
10 adición de AEDT-Na₂ a 25 mM, la solución se extrajo con un
volumen igual de fenol saturado de agua, seguido de cromato-
grafia de la fase acuosa en una columna de Sephadex G-100,
de 0,3 cm de diámetro por 10 cm de altura, en Tris 10 mM-
HCl, pH 9,0, NaCl 100 mM, AEDT 2 mM. El ácido nucleico
15 eluído en el volumen vacío fué precipitado con etanol des-
pués de la adición de acetato amónico pH 6,0, hasta 0,25M.
El precipitado se recogió por centrifugación, el gránulo se
disolvió en 50 µl de NaOH 0,1M recién preparado y se incu-
bó a 70°C durante 20 minutos para hidrolizar el ARN. La
20 mezcla se neutralizó por adición de acetato sódico 1M,
pH 4,5 y el producto ³²P-ADNc se precipitó con etanol y
se redisolvió en agua. Unas partes alícuotas del ADNc de
una cadena se analizaron sobre geles de poliacrilamida na-
tivos por el método de Dingman, C.W. y Peacock, A.C.,
25 Biochemistry 7, 659 (1968). Se secaron los geles y el ³²P-
ADN se detectó por autorradiografía utilizando una pellicu-
la Kodak-No-Screen NS-2T⁵. El ADNc era heterodisperso, a

30

5- Marca comercial, Eastman Kodak Corporation, Rochester, New York.

1 juzgar por el diagrama de electroforesis. Contenia por lo
menos una especie prominente de ADNc de unos 450 nucleótidos,
a juzgar por la comparación con patrones conocidos.

EJEMPLO 2

5 Se describe la síntesis y caracterización de ADNc
de doble hélice conteniendo la secuencia de la insulina de
la rata. El producto ADNc de una cadena del Ejemplo 1 se
trató con transcriptasa de inversión para sintetizar la ca-
dena complementaria. La mezcla de reacción contenía Tris
10 50 mM - HCl, pH 8,3, MgCl₂ 9 mM, ditioneitol 10 mM, 50 mM
de cada uno de los tres desoxirribonucleósidos trifosfatos
sin marcar, 1 mM del nucleósido trifosfato marcado con α -³²P,
de actividad específica 1-10 curios por milimol, 50 µg/ml
de ADNc y 220 unidades/ml de transcriptasa de inversión. La
15 mezcla de reacción se incubó a 45°C durante 120 minutos. La
reacción se interrumpió por adición de AEDT-Na₂ hasta 25 mM,
se extrajo con fenol y se cromatografió sobre Sephadex G-100
seguido de precipitación con etanol. Una parte alícuota del
producto de reacción con 500 cpm a 1000 cpm fué analizada
20 por electroforesis de gel como se ha descrito en el Ejemplo
1. Se observó una banda heterodispersa centrada, de una lon-
gitud de unos 450 nucleótidos, determinado por comparación
con muestras patrón. Unas partes alícuotas de los productos
de reacción ADN de los Ejemplos 1 y 2 se trataron independien-
25 temente por digestión con un exceso de la endonucleasa de
restricción Hae. II y se analizaron análogamente por electro-
foresis de gel. Ambos productos fueron escindidos por la en-
donucleasa de manera que se observaron dos bandas de radio-
actividad por electroforesis de gel. Las bandas resultantes
30 de la escisión del ADNc de doble hélice representaban unos

1 productos de escisión esencialmente de la misma longitud
que los resultantes de la escisión del ADNc de una sola
cadena.

EJEMPLO 3

5 Se describe la ligadura de extremos truncados de los
ligantes decanucleótidos Hind III al ADNc de cadena del islo-
te de rata. El producto de reacción de cadena del Ejemplo 2,
a una concentración de 2-5 µg/ml, fué tratado con 30 unida-
des de nucleasa S1 con una actividad de 1200 unidades/ml,
10 obtenida de los Miles Laboratories, Elkhart, Indiana, en
acetato sódico 0,03M, pH 4,6, cloruro sódico 0,3M, ZnCl₂ 4,5
mM, a 22°C durante 30 minutos de incubación, seguido de una
incubación adicional de 15 minutos a 10°C. Para interrumpir
la digestión se hizo uso de la adición de Tris-base hasta
15 una concentración final 0,1M, AEDT hasta 25 mM y ARNt de
E.coli, preparado por el método de von Ehrenstein, G.,
Methods in Enzymology, S.P. Colowick y N.O. Kaplan, Eds.,
vol. 12A, págs. 588 (1967), hasta 40 µg/ml. Después de ex-
traer con fenol la mezcla de reacción y cromatografía so-
20 bre Sephadex G-100, el ³²P-ADNc eluido en el volumen vacío
fué precipitado con etanol. Este tratamiento dió lugar a un
gran rendimiento de moléculas de ADNc con los extremos de ba-
ses apareadas necesarios para la ligadura de extremos trunca-
dos a los decanucleótidos químicamente sintetizados. Se pre-
25 pararon decámeros de Hind III por el método de Scheller,
R.H. Dickerson, R.E., Boyer, H.W., Riggs, A.D. e Itakura,
K. Science 196, 177 (1977). La ligadura de los decámeros de
Hind III al ADNc se realizó por incubación a 14°C en Tris
66 mM-HCl, pH 7,6, MgCl₂ 6,6 mM, ATP 1 mM, ditiotreititol 10 mM,
30 decámeros de Hind III 3 mM con 10⁵ cpm/pmol y T4 ADN ligasa,

1 aproximadamente 500 unidades/ml, durante una hora. Después
la mezcla de reacción se calentó a 65°C durante 5 minutos
para inactivar la ligasa. Antes de la digestión con 150 uni-
dades/ml de endonucleasa Hsu I o Hind III, durante 2 horas
5 a 37°C, se agregó KCl hasta una concentración final de 50 mM
β-mercaptoetanol hasta una concentración final de 1 mM y
AEDT hasta una concentración final de 0,1 mM. Las endonuclea-
sas Hind III y Hae III son productos comerciales de la New
England Bio-Labs, Beverly, Massachusetts. El producto de
10 reacción se analizó por electroforesis de gel como en el
Ejemplo 1 y se observó un pico correspondiente a una secuen-
cia de aproximadamente 450 nucleótidos, además de los frag-
mentos de los decámeros de Hind III escindidos.

EJEMPLO 4

15 Se describe la formación de un plásmido recombinante
y su caracterización después de la replicación. El ADN pMB-9
de plásmido, preparado como describen Rodríguez, R.L., Boli-
ver, F., Goodman, H.M., Boyer, H.W. y Betlach, M., en Simpo-
sio ICN-UCLA sobre Biología Molecular y Celular, D.P. Wier-
lich, W.J. Rutter y C.F. Fox, Eds., (Academic Press, New
20 York 1976, págs. 471-477, fué escindido en el punto de res-
tricción de la Hind III con endonucleasa Hsu I y después
tratado con fosfatasa alcalina, tipo BAPF, Worthington Bio-
chemical Corporation, Freehold, New Jersey. La enzima se en-
25 contraba en la mezcla de reacción a una concentración de
0,1 unidades/microgramo de ADN y la mezcla de reacción se
incubó en Tris 25 mM-HCl, pH 8, durante 30 minutos a 65°C,
seguido de extracción con fenol para separar la fosfatasa.
Después de la precipitación con etanol, el ADN de plásmido
30 tratado con fosfatasa fué agregado al ADNc que contenía gru-

1 pos terminales cohesivos con Hind III, a una relación molar
de 3 moles de plásmido por cada mol de ADNc. La mezcla se
incubó en Tris 66 mM, pH 7,6, MgCl₂ 6,6 mM, ditiotreitól
10 mM y ATP 1 mM, durante una hora a 14°C, en presencia de
5 50 unidades/ml de T4 ADN ligasa.

EJEMPLO 5

El ADN del pAU-1 descrito en el Ejemplo 4 se purificó
todavía más por electroforesis sobre un gel de poliacrilami-
da al 6 %. Después de eluirlo del gel, el ADN se marcó por
10 incubación con γ -³²P-ATP y la enzima polinucleótido kinasa,
bajo las condiciones descritas por Maxam y Gilbert, supra.
La enzima cataliza la transferencia de un grupo fosfato
radiactivo de la γ -³²P-ATP a los extremos 5' del ADN. La
enzima se obtuvo a partir de E. coli para métodos de Panet,
15 A. y colaboradores, Biochemistry 12, 5045 (1973). El ADN
así marcado se escindió con la endonucleasa Hae III, como
se describe en el Ejemplo 2, y los dos fragmentos marcados,
de unas 265 y 135 parejas de bases respectivamente, se sepa-
raron sobre un gel de poliacrilamida en las condiciones des-
critas en el Ejemplo 1. Los fragmentos aislados se sometie-
ron a reacciones selectivas de escisión y análisis de secuen
cias de acuerdo con el método de Maxam y Gilbert, supra. La
secuencia de la Tabla I se basa sobre una composición de los
hallazgos de esta serie de experimentos y los de una serie
25 similar de ADNc utilizando vectores de plásmidos derivados
de col E1, tales como pMB-9 y pBR-322. En la secuencia en
el extremo 5', una secuencia estimada entre 50 y 120 nucleó-
tidos de longitud está indeterminada y el segmento poli da
en el extremo 3' es de longitud variable. Esta secuencia se
30 comunica como representativa de la mejor información actual-

1 mente existente, con el sobreentendido de que los estudios
en marcha pueden revelar detalles adicionales o pueden indi-
car la necesidad de una ligera revisión en algunas áreas.
La correspondiente secuencia de aminoácidos de la proinsu-
5 lina I de la rata comienza en la posición del triplete marca-
da con el n° 1 y termina en la posición del triplete marcada
con el n° 86. Existe todavía cierta incertidumbre con respec-
to a la secuencia subrayada con una línea de puntos.

10

15

20

25

30

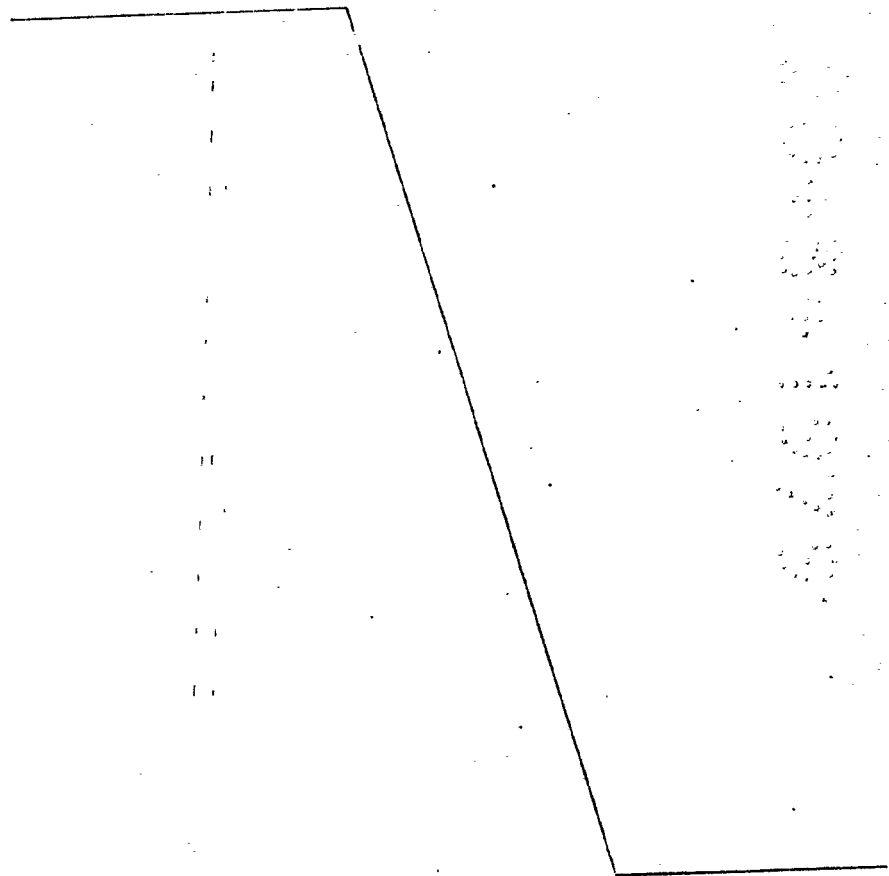


TABLA I

indeterminado.... GCC CTG CTC GTC CTC TGG GAG CCC AAG CCT GCT CAG GCT TTT GTC AAA CAG CAC CTT
 1
 TGT GGT CCT CAC CAC CTG CTG GAG GCT GTG TAC CTG GTG TGT GGG GAA CGT GGT TTC TTC
 20
 TAC ACA CCC AAC AAC TCC CGT CGT GAA GTG GAG GAC CCG CAA GTG CCA CAA CTG GAG CTG
 30 40
 GCT GGA GGC CCG GAC GAC GCC GGG GAT CTT CAG ACC TGG GCA CTG GAG GTT GCC CGG CAG
 50 60
 AAG CGT GGC ATT GTG GAT CAG TGC TGC ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAA CTG GAG
 70 80

AAC TAC TGC AAC TGA GTTCAATGCAATTTCCCGATCCACCCCTCTGCAATGATRAAGCCCTTTGAATGAGC- poli A
 86

secciones subrayadas = áreas de incertidumbre en la actualidad.

1.

5

10

15

20

25

50

1.

TABLA I

indeterminado.... GCC CTG CTC GTC CTC TGG GAG CCC AAG CCT GC

5

TGT GGT CCT CAC CTG GTG GAG GCT GTG TAC CT

TAC ACA CCC AAC TCC CGT CGT GAA GTG GAG GA

10

GCT GGA GGC CCG GAC GCC GGG GAT CTT CAG AC

AAG CGT GGC ATT GTG GAT CAG TGC TGC ACC AG

AAC TAC TGC AAC TGA GTTCAATCAATTCCCGATCCACCCCTC

secciones subrayadas = áreas de incertidumbre en la actualidad.

15

20

25

30

TABLA I

10	AC	CTC	TGG	GAG	CCC	AAG	CCT	GCT	CAG	GCT	TTT	GTC	AAA	CAG	CAC	CTT
											1					
20	AC	CTG	GTG	GAG	GCT	GTG	TAC	CTG	GTG	TGT	GGG	GAA	CGT	GGT	TTC	TTC
											20					
30	AC	TCC	CGT	CGT	GAA	GTG	GAG	GAC	CCG	CAA	GTG	CCA	CAA	CTG	GAG	CTG
											40					
40	CG	GAC	GCC	GGG	GAT	CTT	CAG	ACC	TGG	GCA	CTG	GAG	GTT	GCC	CGG	CAG
											50					
50	TT	GTG	GAT	CAG	TGC	TGC	ACC	AGC	ATC	TGC	TCC	CTC	TAC	CAA	CTG	GAG
											60					
60																
70																
80																
86	AC	TGA	GTTCAATCAAT	TCCCGATCCACCCCTCTGCAATGAATAAAGCCTTTGATGAGC-	poli A											

86
AC TGA GTTCAATCAATTCCCGATCCACCCCTCTGCAATGAATAAAGCCTTTGATGAGC- poli A
ertidumbre en la actualidad.

EJEMPLO 6

1 Se aísla una secuencia de nucleótidos que codifica a
la insulina humana, se purifica y se incorpora a un plásmido
esencialmente como se ha descrito en los Ejemplos 1-4, a
5 partir de tejido de páncreas humano aislado de una fuente
humana adecuada, tal como un páncreas donado o un cadáver
fresco o un insulinoma humano.

EJEMPLO 7

10 Se describe el aislamiento y purificación de ADN con
la secuencia estructural completa del gen para la hormona
del crecimiento de la rata (RGH) junto con la síntesis de un
vector de transferencia que contiene el gen estructural
completo para la hormona del crecimiento de la rata y la
15 construcción de una cepa de un microorganismo que contiene
el gen de la hormona del crecimiento de la rata como parte
de su sistema genético.

20 Cuando están implicados genes de origen no humano, las
restricciones de seguridad federales de Estados Unidos no
exigen el aislamiento del ADNc en un grado de pureza tan
alto como el requerido para los ADNc humanos. Por lo tanto,
fue posible aislar el ADNc conteniendo el gen estructural
completo de la hormona del crecimiento de la rata por aisla-
miento de ADN electroforéticamente separado de la longitud
25 esperada, alrededor de 800 parejas de bases, determinada a
partir de la longitud conocida de aminoácidos de la hormona
del crecimiento de la rata. Como fuente de ARNm de la hormo-
na del crecimiento de la rata se utilizaron células de pitui-
taria de rata cultivadas, un sub-clon de la línea celular
GH-1 obtenible de la American Type Culture Collection. Véase
30 Tashjian, A.H. y colaboradores, Endocrinology 82, 342 (1968).

1 En estas células, cuando se desarrollan en condiciones for-
males, el ARNm de la hormona del crecimiento representa so-
lamente un pequeño porcentaje, 1-3 %, del ARN total conte-
niendo poli-A. Sin embargo, los niveles de ARNm de la hormo-
5 na del crecimiento se elevaron por encima del de otras es-
pecies de ARNm celular por la acción sinérgica de hormonas
de tiroides y glucocorticoides. Se obtuvo ARN a partir de
5 x 10⁸ células desarrolladas en un cultivo en suspensión
en las que se había inducido la producción de la hormona del
10 crecimiento incluyendo dexametasona 1 mM y L-triyodotironina
10 mM en el medio durante 4 días antes de recoger las célu-
las. Se aisló ARN poliadenilado de la fracción de membrana
citoplásmica de las células cultivadas, como se ha descrito
en otra parte. Véase Martial, J.A., Baxter, J.D., Goodman,
15 H.M. y Seeburg, P.H. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74, 1816 (1977)
y Bancroft, F.C., Wu, G. y Zubay, G., Proc.Nat.Acad.Sci.
USA 70, 3646 (1973). El ARNm fué purificado y transcrito al
ADNc de doble hélice esencialmente como se ha descrito en los
Ejemplos 1, 2 y 3 anteriores. Por fraccionamiento mediante
20 electroforesis de gel, se observó una banda débil pero clara
correspondiente a un ADN de una longitud de unas 800 parejas
de bases.

Por tratamiento del ADNc total transcrito desde el
ARNm de células de pituitaria cultivada con la endonucleasa
25 Hha I, se obtuvieron dos fragmentos principales de ADN por
separación electroforética, correspondientes a 320 nucleóti-
dos (fragmento A) y 240 nucleótidos (fragmento B) aproxima-
damente. El análisis de la secuencia de nucleótidos de los
fragmentos A y B, en la forma descrita en el Ejemplo 5,
30 reveló que estos fragmentos eran de 8 porciones de la región

1 de codificación para la hormona del crecimiento de la rata,
basándose en los datos publicados de la secuencia de amino-
ácidos de dicha hormona y en comparaciones con otras secuen-
cias conocidas de hormonas del crecimiento. Véase Wallis,
5 M. y Davies, R.V.N., Growth Hormone And Related Peptides
(Eds., Copecile, A. y Muller, E.E.), págs. 1-14 (Elsevier,
New York, 1976) y Dayhoff, M.O., Atlas of Protein Sequence
and Structure, 5, suppl. 2, págs. 120-121 (National Biome-
dical Research Foundation, Washington, D.C., 1976). Cuando
10 el ADNc de cadena, de 800 parejas de base, aislado electro-
foréticamente como se ha descrito anteriormente, se sometió
de forma similar a un tratamiento con la endonucleasa Hha I,
se encontraron entre los productos de escisión principales
dos fragmentos cuya longitud correspondía a los fragmentos
15 A y B.

Como el ADNc de la hormona del crecimiento de la rata
de 800 parejas de bases no fué purificado recurriendo al
tratamiento con la endonucleasa de restricción, fué neces-
sario tratar el ADN con objeto de separar los extremos de
20 una cadena sin aparear. En la práctica, el tratamiento para
eliminar estos extremos sin aparear fué realizado antes de
la separación electroforética en 25 µl de Tris 60 mM-HCl,
pH 7,5, MgCl₂ 8 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, ATP 1 mM y
25 200 µM de cada uno de los compuestos dATP, dTTP, dGTP y
dCTP. La mezcla se incubó con una unidad de ADN polimerasa
I de E. coli a 10°C durante 10 minutos para eliminar exonu-
cleolíticamente cualquier extremo 3' protuberante y llenar
cualquier extremo 5' protuberante. La ADN polimerasa I es
un producto comercial de la Boehringer-Mannheim Biochemi-
30 cals, Indianapolis, Indiana.

1 El ADNc de 80 parejas de bases de la hormona del cre-
cimiento de la rata se trató por adición de ligantes Hind
III químicamente sintetizados, como se describe en el Ejem-
plo 3. El plásmido pBR-322, con un gen de la resistencia a
5 la ampicilina y un solo punto Hind III situado dentro de
un gen de la resistencia a la tetraciclina, fué tratado
previamente con la endonucleasa Hind III y fosfatasa alca-
lina, como se describe en el Ejemplo 4. El plásmido trata-
do se combinó con el ADNc de 800 parejas de bases de la
10 hormona del crecimiento de la rata, en una mezcla de reac-
ción con ADN ligasa, como se describe en el Ejemplo 3.

EJEMPLO 8

15 Se describe el aislamiento y purificación de la se-
cuencia completa del gen que codifica a la hormona del cre-
cimiento humana (HCH), junto con la síntesis de un plásmido
recombinante que contiene el gen estructural completo de la
hormona de crecimiento humana y la producción de un micro-
organismo con el gen estructural completo para la hormona
del crecimiento humana como parte de su sistema genético.

20 El aislamiento del ARNm de la hormona del crecimiento
humana se realiza esencialmente como se ha descrito en el
Ejemplo 7, a excepción de que la fuente biológica es el
tejido de un tumor de la pituitaria humana. Cinco tumores
benignos de la pituitaria humana, congelados rápidamente
25 en nitrógeno líquido después de su extirpación quirúrgica,
con un peso de 0,4 a 1,5 g cada uno, se descongelaron y
homogeneizaron en tiocianato de guanidinio 4M conteniendo
mercaptoetanol 1M, tamponado a pH 5,0 a 4°C. El homogenado
se depositó sobre 1,2 ml de CsCl 5,7M conteniendo AEDT
30 100 mM y se centrifugó durante 18 horas a 37.000 rpm en el

1 rotor SW 50.1 de una ultra-centrífuga Beckman a 15°C
(Beckman Instrument Company, Fullerton, California). El
ARN se trasladó al fondo del tubo. Se purificó todavía más
5 utilizando una columna de oligo-dT y sedimentación con gra-
diente de sacarosa como se ha descrito previamente en los
Ejemplos 1, 2 y 3. Alrededor del 10 % de ARN así aislado
codificaba a la hormona del crecimiento, a juzgar por la
incorporación del aminoácido precursor radiactivo en el ma-
terial precipitado anti-hormona del crecimiento en el sis-
10 tema de traducción exento de células derivado del germen
de trigo. Véase Roberts, B.E. y Patterson, B.M., Proc.Nat.
Acad.Sci. USA 70, 2330 (1973). La preparación de ADNc-HCH
se realiza esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo
7. El ADNc-HCH se fracciona por electroforesis de gel
15 y el material que migra a una posición correspondiente a
una longitud de unos 800 nucleótidos se selecciona para for-
mar el clon. La fracción seleccionada se trata con ADN po-
limerasa I como se describe en el Ejemplo 6 y después se
trata mediante la adición terminal de ligante Hind III. El
20 ADNc se recombina después con el plásmido pBR-322 tratado
con fosfatasa alcalina, empleando ADN ligasa. Se encuen-
tra que el ADN clorado de la hormona del
crecimiento humana comprende nucleó-
25 tidos que codifican la secuencia com-
pleta de aminoácidos de dicha hormona.
Los veintitres primeros aminoácidos
de la hormona del
30 Los aminoácidos de la hormona del

POOR
QUALITY

1

crecimiento humana son H₂N-Phe-Pro-Thr-Ile-Pro-Leu-Ser

10

20

Arg-Leu-Phe-Asp-Asn-Ala-Met-Leu-Arg-Ala-His-Arg-Leu-His-

Gln-Leu-. El resto de la secuencia está indicado en la Ta-

5

bla III.

10

15

20

25

30

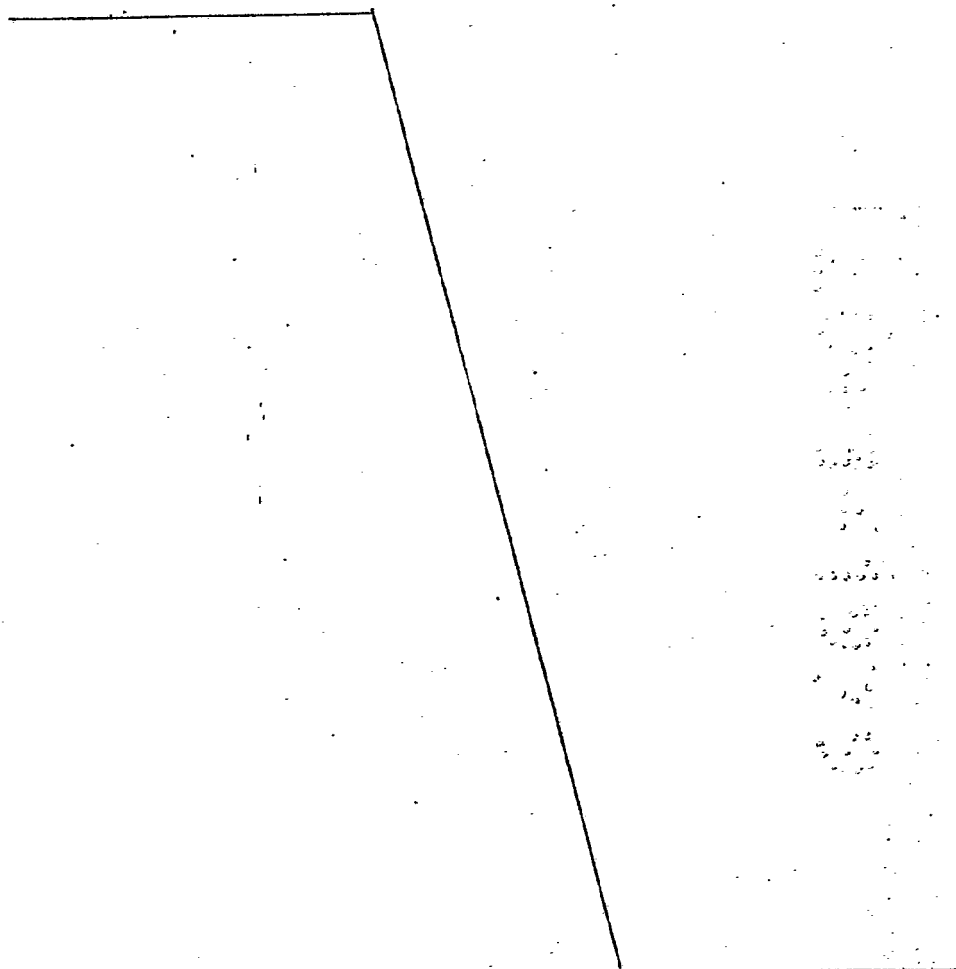


TABLA III

Secuencia de nucleótidos de una cadena de ADN de la hormona del crecimiento humana. Los números se refieren a la secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana comenzando en el extremo que contiene el grupo amino. La secuencia del ADN mostrada corresponde a la secuencia del ADNm para la hormona del crecimiento humana, a excepción de que U sustituye a T en el ARNm.

1	5'	----- G	24	34	40	43
		Ala Phe Asp Thr Gln Thr Tir Gln Thr Phe Glu Glu Ala Tir Ile Pro Lis Glu Gln Lis Tir Ser Phe				
		5'----- G GCC TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT GAA GAA GAA GCC TAT ATC CCA AAG GAA CAG AAG TAT TCA TTC				
10		Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cis Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Asp Glu	60			
		CTG CAG AAC CCC CAG ACC TTC CTC TGT TTC TCA GAG TCT ATT CCG ACA CCC TCC AAC AGG GAG				
		Glu Thr Gln Gln Lis Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Ile Gln Ser Trp	80			
		GAA ACA CAA CAG AAA TCC AAC CTA GAG CTG CTC CGC ATC TCC CTG CTG ATC CAG TCG TGG				
15		Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Leu Val Tir Gln Ala Ser Asp	100			
		CTG GAG CCC GTG CAG TTC CTG AGG AGT GTC TTC GCC AAC AAC CTG GTG TAC GGC GCC TCT GAC		120		
		Ser Asn Val Tir Asp Leu Leu Lis Asp Leu Glu Glu Ile Gln Thr Leu Met Gln Arg Leu				
		AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA AAG GAC CTA GAG CAA GGC ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG				
20		Glu Asp Gln Ser Pro Arg Thr Gln Ile Phe Lis Gln Thr Tir Ser Lis Phe Asp Thr Asn	140			
		GAA GAC GGC AGC AGC CCC CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC AGC AAG TTC GAC ACA AAC				
		Ser His Asn His Asp Ala Leu Leu Lis Asn Tir Gln Leu Leu Tir Cis Phe Arg Lis Asp Met	160			
		TCA CAC AAC CAT GAC GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC TTC AGG AAC GAC ATG				
25		Asp Lis Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cis Arg Ser Val Glu Gln Ser Cis Gln Phe	180			
		GAC AAG GTC GAG ACA TTC CTG CGC ATC GTG CAG TGC CGC TCT GTG GAG GCC AGC TGT GGC TTC				191

TAG CTCCCCGGTGCATCCCTGTGACCCCTCCCACTGCCCTCTCTGGCC ----- 3'

EJEMPLOS DE REFERENCIA

EJEMPLO A

La mezcla de ligadura se agrega directamente a una suspensión de células de E.coli X-1776 preparadas para la transformación como sigue: Se cultivan las células hasta una densidad celular de alrededor de 2×10^8 células/ml en 50 ml de medio que contiene 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl, NaOH 2 mM, 100 μ g/ml de ácido diaminopimélico y 40 μ g/ml de timina, a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 5000 x G a 5°C, se suspendieron de nuevo en 20 ml de NaCl 10 mM frío, se centrifugaron como antes y se volvieron a suspender en 20 ml de tampón de transformación que contenía CaCl₂ 75 mM, NaCl 140 mM y Tris 10 mM, pH 7,5 y se dejó durante 5 minutos en hielo. Después las células se centrifugaron y se suspendieron de nuevo en 0,5 ml de tampón de transformación. La transformación se realizó mezclando 100 μ l de la suspensión celular y 50 μ l de ADN recombinante (1 μ g/ml). La mezcla se incubó a 0°C durante 15 minutos y después se transfirió a 25°C durante 4 minutos y a continuación a 0°C durante 30 minutos. Después las células se transfirieron a placas de agar para su crecimiento en condiciones de selección.

La selección de los plásmidos recombinantes se realizó en tetraciclina a una concentración de 5 microgramos/ml para la transformación en el punto de Hind III. Se aisló un recombinante seleccionado, denominado pAU-1. Las preparaciones crudas de plásmido, de 2 μ g - 5 μ g de ADN aislado de pAU-1, se digirieron con un exceso de la endonucleasa Hsu I. Después se añadieron AEDT-Na₂ hasta una concentración final de 10 mM y sacarosa hasta una concentración final del 10 % en peso/vol.

1 lumen, y la mezcla se resolvió sobre un gel de poliacril-
amida al 8 %. El ADN se encontró en una posición correspon-
diente a una longitud de unas 410 parejas de bases. En un
5 experimento similar, se empleó el plásmido pBR-322 como
vector de transferencia. Todas las condiciones fueron iguales
a las descritas excepto que la selección final de los clones
recombinantes se realizó sobre placas que contenían 20 µg/ml
de ampicilina.

EJEMPLO B

10 Se produjo un microorganismo, esencialmente en la forma
descrita en el Ejemplo A, con una secuencia de nucleótidos
que codificaban a la cadena A y la cadena B de insulina hu-
mana. La secuencia de aminoácidos conocida de la cadena A
de insulina humana es:

15 1 10
Gli-Ile-Val-Glu-Gln-Cis-Cis-Thr-Ser-Ile-Cis-Ser-Leu-Tir-Glu-
20
Leu-Glu-Asn-Tir-Cis-Asn.

20 La secuencia de aminoácidos conocida de la cadena B de
la insulina humana es:

1 10
Phe-Val-Asn-Glu-His-Leu-Cis-Gli-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-
20 30
Tir-Leu-Val-Cis-Gli-Glu-Arg-Gli-Phe-Phe-Tir-Thr-Pro-Lis-Thr.

25 Las secuencias de aminoácidos son numeradas a partir
del extremo con un grupo amino libre. Véase Smith, L.F.,
Diabetes 21 (supl. 2), 458 (1972).

EJEMPLO C

30 Se utilizó la mezcla de reacción con ligasa para trans-
formar una suspensión de células de E.coli X-1776, tratadas

1 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo A. Las co-
lonias recombinantes se seleccionaron por crecimiento sobre
placas nutrientes que contenían ampicilina y por la incapa-
5 cidad para crecer sobre 20 µg/ml de tetraciclina. Se obtu-
vieron 10 de estas colonias, todas las cuales contenían
un plásmido con un inserto de aproximadamente 800 parejas
de base que fué liberado por escisión con Hind III.

10 El ADNc de 800 parejas de bases de la hormona del cre-
cimiento de la rata fué aislado en cantidades preparativas
a partir del clon recombinante pRGH-1 y su secuencia de
nucleótido fué determinada como se describe en el Ejemplo 5.
En este caso, la secuencia de nucleótidos incluía porciones
15 de la región 5' no traducida de la hormona del crecimiento
de la rata (RGH), así como una secuencia de 26 aminoácidos
encontrada en la proteína precursora de la hormona del cre-
cimiento antes de la secreción. El mensaje de la secuen-
cia ARNm deducida de la secuencia del gen está indicado en
la Tabla II. La secuencia de aminoácidos prevista concuerda
20 bien, excepto en las posiciones 1 y 8, con la secuencia de
aminoácidos parcial de la hormona del crecimiento de la rata
descrita por Wallis y Davies, supra, que comprende restos
1-43, 65-69, 108-113, 133-143 y 150-190.

EJEMPLO D

25 El E.coli X-1776 se transformó con el ADN recombinante
y se seleccionó una cepa que contenía ADN de la hormona del
crecimiento humana. La cepa conteniendo ADN de la hor-
mona del crecimiento humana se cultivó en cantidades pre-
parativas, se aisló el ADN de la hormona del crecimiento de
30 las mismas y se determinó la secuencia de nucleótidos de
este ADN.

TABLA II

Secuencia de nucleótidos del ADN de una cadena, que contiene la secuencia completa que codifica a la hormona del crecimiento de la rata (RGH). Se indican los aminoácidos correspondientes, junto con su número de posición respecto al terminal amino. Los aminoácidos numerados negativamente representan la secuencia de la pre-hormona del crecimiento. La secuencia del ARNm correspondiente es la misma, salvo que U sustituye a T en el ARNm.

-26

Met Ala Ala Asp Ser Gln Thr Pro Trp Leu Leu Thr Phe Ser Leu Leu
ATG GCT GCA GAC TCT CAG ACT CCC TGG CTC CTG ACC TTC AGC CTG CTC

5' -----GTGACAGATCACTGAGTGGCG

1

Cis Leu Leu Trp Pro Gln Glu Ala Gli Ala Leu Pro Ala Met Pro Leu Ser Ser Leu Phe Ala Asn Ala
TGC CTG CTG TGG CCT CAA GAG GCT GGT GCT TTA CCT GCC ATG CCC TTG TCC AGT CUG TTT GCC AAT GCT

10

20

Val Leu Arg Ala Gln His Gln Leu Ala Ala Asp Thr Tlr Lis Glu Phe Glu Arg Ala Tlr Ile
GTG CTC CGA GCC CAG CAC CAG CTG GCT GCT GAC ACC TAC AAA GAG TTC CAG CGT GCC TAC ATT

40

Pro Glu Gli Gln Arg Thr Ser Ile Gln Asn Ala Gln Ala Ala Phe Cis Phe Ser Glu Thr Ile Pro Ala
CCC GAG GGA CAG CAG CGC TAT TCC ATT CAG AAT GCC CAG GCT GCT TTC TCC TTC TCA GAG ACC ATC CCA GCC

15

60

Pro Thr Gli Lis Glu Glu Ala Gln Gln Arg Thr Asp Met Glu Leu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Ile
CCC ACC GCC AAG GAG GAG GCC CAG CAG AGA ACT GAC ATG GAA TTG CTT CGC TTC TCG CTG CTC ATC

20

100

Gln Ser Trp Leu Gli Pro Val Gln Phe Leu Ser Arg Ile Phe Thr Asn Ser Leu Met Phe Gli Thr Ser
CAG TCA TGG CTG GGG CCC GTG CAG TTT CTC AGC AGG ATC TTT ACC AAC AGC CTG ATG TTT GGT ACC TCG

120

Asp Arg Val Tlr Glu Lis Leu Lis Asp Leu Glu Glu Ile Gln Ala Leu Met Gln Glu Leu Glu Asp
GAC CGC GTC TAT GAG AAA CTG AAG GAC CTG GAA GAG GGC ATC CAG GCT CTG ATG CAG GAG CTG GAA GAC

25

140

Gli Ser Pro Arg Ile Gli Gln Ile Leu Lis Gln Thr Tlr Asp Lis Phe Asp Ala Asn Met Arg Ser Asp
GGC ACC CCC CGT ATT GGG CAG ATC CTC AAG CAA ACC TAT GAC AAG TTT GAC GCC AAC ATG CGC ACC GAT

30

TABLA II (continuación)

160
 Asp Ala Leu Leu Lis Asn Tlr Gli Leu Leu Ser Cis Phe Lis Lis Asp Leu His Lis Ala Glu Thr
 GAC GCT CTG CTC AAA AAC TAT GGG CTG CTC TCC FGC TTC AAG AAG GAC GAC CTG CAC AAG GCA GAG ACC

 180
 Tlr Leu Arg Val Met Lis Cis Arg Arg Phe Ala Glu Ser Ser Cis Ala Phe
 TAC CTG CGG GTC ATG AAG TGT CGC CGC TTT GCG GAA AGC AGC TGT GCT TTC TAG GCACACACTGGTGTCTCTGCG

 .GCACCTCCCGTTACCCCTGTACTCTGGCAACTGCCACCCCTACACTTTTCTCTAATAAATAAATGATGATCATATC poli(A)..... 3'

1

5

10

15

20

25

30

TABLA II (continuació)

1

160

5

Asp	Ala	Leu	Leu	Lis	Asn	Tir	Gli	Leu	Leu	Ser	Cis	Phe	Lis
GAC	GCT	CTG	CTC	AAA	AAC	TAT	GGG	CTG	CTC	TCC	TGC	TTC	AAG

180

10

Tir	Leu	Arg	Val	Met	Lis	Cis	Arg	Arg	Phe	Ala	Glu	Ser	Ser
TAC	CTG	CGG	GTC	ATG	AAG	TGT	CGC	CGC	TTT	GCG	GAA	AGC	AGC

GC ACTCCCCGTTACCCCCCTGTACTCTGGCAACTGCCACCCCTACACTTTGTCTTAATAAAATTAATGATC

15

20

25

30

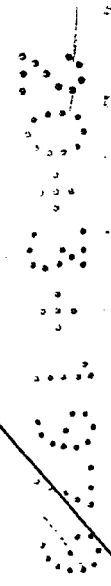


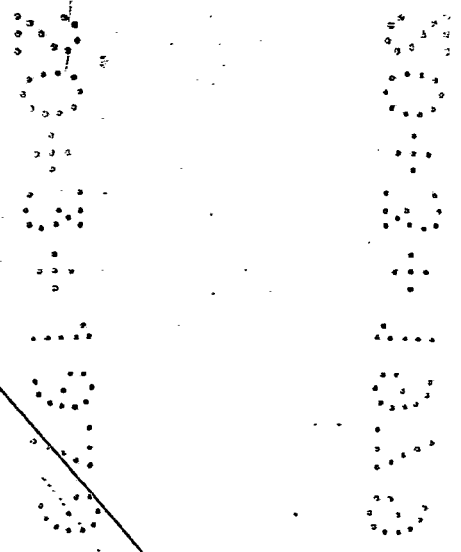
TABLA II (continuación)

160

Gli	Leu	Leu	Ser	Cis	Phe	Lis	Lis	Asp	Leu	His	Lis	Ala	Glu	Thr
GGG	CTG	CTC	TCC	TGC	TTC	AAG	AAG	GAC	CTG	CAC	AAG	GCA	GAG	ACC

Arg	Arg	Phe	Ala	Glu	Ser	Ser	Cis	Ala	Phe					
CGC	CGC	TTT	GCG	GAA	AGC	AGC	TGT	GCT	TTC	TAG	GCACACACTGGTGTCTCTGCG			

CGCCACCCCTACACTTTGTCCTAATAAAATTAATGATGCATCATATC poli(A).... 3'



1 realizaciones específicas de la misma, se sobreentiende que
es susceptible de nuevas modificaciones y se pretende que
esta memoria cubra cualquier variación, uso o adaptación de
la invención, siguiendo en general los principios de la in-
5 vención incluyendo las desviaciones de esta descripción al
alcance de la práctica conocida o acostumbrada dentro del
campo a que pertenece la invención o que resulte fácilmente
evidente a los expertos en esta técnica. Con este sobreent-
endido, la invención solo ha de ser limitada en el grado
10 requerido por las reivindicaciones del apéndice.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

15 1ª.- Un método de preparación de un vector de -
transferencia del ADN con una secuencia de nucleótidos para
una proteína específica, cuyo procedimiento comprende:

a) aislar células que contengan ARNm que codifi-
quen a la proteína a partir de un organismo que produzca
la proteína.

20 b) extraer el ARNm de las células en presencia
de una composición inhibidora de la RNasa, con lo que se
impide la degradación del ARNm por la RNasa;

c) separar el ARNm esencialmente exento de proteí-
na, ADN y otros ARN;

25 d) sintetizar un ADNc de doble hélice, en el que
una cadena contiene una secuencia de nucleótidos complemen-
taria al ARNm, produciendo así un ADNc con una secuencia de
nucleótidos que codifica la proteína deseada;

30 e) proveer un vector de transferencia de ADN con
extremos reactivos capaces de ser unidos entre sí o de ser

1 unidos con ADNc de doble hélice,

5 f) unir el vector de transferencia del ADB con el ADNc de doble hélice que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la insulina, con lo que se produce un vector de transferencia de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína deseada.

2ª.- Un método según la reivindicación 1, donde la proteína es insulina y la etapa a) consiste en:

10 tratar el tejido de páncreas que contiene células de islotes y otras células con una enzima hidrolítica y un inhibidor de la tripsina para liberar los islotes de las otras células,

15 fraccionar el tejido tratado para obtener islotes esencialmente exentos de las otras células y residuos celulares,

 aislar ARNm de los islotes, estando dicho ARN enriquecido con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica a la insulina.

20 3ª.- Un método según la reivindicación 2, donde la enzima hidrolítica es una preparación de colagenasa empíricamente seleccionada.

25 4ª.- Un método según la reivindicación 2, donde el tratamiento con la enzima hidrolítica se realiza en un material de vidrio tratado con silicona.

 5ª.- Un método según la reivindicación 2, donde el tratamiento con la enzima hidrolítica se realiza en un material de plástico.

30 6ª.- Un método según la reivindicación 1, donde la proteína es insulina y la composición inhibidora de la RNasa comprende un catión caotrópico, un anión caotrópico

1 y un agente rompedor del enlace disulfuro.

7^a.- Un método según la reivindicación 6, donde el catión caotrópico es guanidinio y el anión caotrópico es tiocianato.

5 8^a.- Un método según la reivindicación 6, donde el agente rompedor del enlace disulfuro es β -mercaptoetanol.

9^a.- Un método según la reivindicación 1, donde la proteína es insulina y la composición inhibidora de la RNasa comprende tiocianato de guanidinio 4M y β -mercaptoetanol 0,2M.

10 10^a.- Un método según la reivindicación 1, donde la proteína es insulina y donde la etapa (f) consiste en:
tratar previamente una porción seleccionada de los extremos reactivos con un reactivo capaz de separar los grupos 5'-terminales de los mismos,

15 incubar las moléculas de ADN con los extremos reactivos pre-tratados y no tratados junto con una enzima ADN ligasa, con lo que es catalizada una reacción de unión entre dichos extremos reactivos, a excepción de los extremos reactivos previamente tratados que no se unen entre sí por la reacción catalizada por ligasa.

20 11^a.- Un método según la reivindicación 10, donde el reactivo para el tratamiento previo de los extremos reactivos es fosfatasa alcalina.

25 12^a.- Un método según la reivindicación 10, donde las moléculas de ADN que han de ser unidas comprenden una mezcla de ADN de plásmido tratado con endonucleasa de restricción y ADN lineal no plásmido y la porción seleccionada para el tratamiento previo comprende el ADN de plásmido, -
30 con lo que se impide la unión extremo a extremo del ADN-de

1 plásmido en ausencia de recombinación con el ADN no plásmi-
do.

13^a.- Un método según la reivindicación 1, donde
la proteína es la hormona del crecimiento.

5 14^a.- Un método según la reivindicación 13, donde
la composición inhibidora de la RNasa comprende un catión
caotrópico, un anión caotrópico y un agente rompedor del
enlace disulfuro.

10 15^a.- Un método según la reivindicación 14, donde
el catión caotrópico es guanidinio y el anión caotrópico es
tiocianato.

16^a.- Un método según la reivindicación 14, donde
el agente rompedor del enlace disulfuro es β -mercaptoetanol.

15 17^a.- Un método según la reivindicación 13, donde
la composición inhibidora de la RNasa comprende tiocianato
de guanidinio 4M y β -mercaptoetanol 0,2M.

18^a.- Un método según la reivindicación 13, don-
de la etapa (f) consiste en:

20 tratar previamente una porción seleccionada de los
extremos reactivos con un reactivo capaz de separar los -
grupos 5' fosfato terminales de la misma,

25 incubar las moléculas de ADN con extremos reacti-
vos pre-tratados y sin tratar junto con una enzima ADN liga-
sa, con lo que se cataliza una reacción de unión entre di-
chos extremos reactivos a excepción de los extremos reacti-
vos tratados previamente que no se unen entre sí mediante
la reacción catalizada por ligasa.

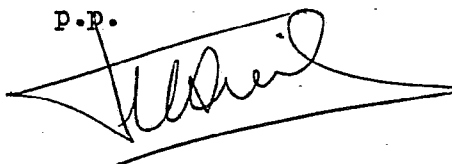
30 19^a.- Un método según la reivindicación 18, donde
el reactivo para el tratamiento previo de los extremos reac-
tivos es fosfatasa alcalina.

1 20a.- Un método según la reivindicación 18, donde
las moléculas de ADN que han de ser unidas comprenden una
mezcla de ADN de plásmido tratado con endonucleasa de res-
tricción y ADN lineal no plásmido y la porción seleccionada
5 para el tratamiento previo comprende el ADN de plásmido, con
lo que se impide la unión extremo a extremo del ADN de plás-
mido en ausencia de recombinación con el ADN no plásmido.

 21a.- Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita
10 por: UN METODO DE PREPARACION DE UN VECTOR DE TRANSFERENCIA.

 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de sesenta y cuatro
páginas mecanografiadas.

15 Madrid, 26 de mayo de 1.978
 BERNARDO UNGRIA
 P.P.



20

25

30