

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



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

474851

11	NUMERO	10 A1
21		474.851
32	FECHA DE PRESENTACION	6-11-78

PATENTE DE INVENCION

ESPAÑA

A1 474851 791201 C12K 1/02

50	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	849,691		8-11-77		Estados Unidos.

67	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C07C		

64	TITULO DE LA INVENCION
MEJORAS EN UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN PRODUCTO QUE COMPRENDE UNA CODIFICACION DEL GEN ESTRUCTURAL PARA LA EXPRESION MICROBIANA DE UN POLIPEPTIDO.	

71	SOLICITANTE (S)
GENENTECH INC.	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE	
460, Point San Bruno Boulevard, SAN FRANCISCO, California 94080. ESTADOS UNIDOS.	

72	INVENTOR (ES)
Keichi Itakura.	

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.	

BAD ORIGINAL

RESUMEN DE LA INVENCION

La Invención se refiere a:

1. Los vehículos de clonación microbianos recombinantes que contienen la codificación de un ADN heterólogo para la expresión de una hormona de mamíferos (v. gr., somatostatina) y otros polipéptidos, incluyendo plásmidos apropiados para la transformación de huéspedes bacterianos. Los últimos incorporan un regulador homólogo al huésped en su estado no transformado, en la fase de lectura con el gene estructural para el ADN heterólogo;

2. La codificación de vehículos de clonación para la expresión microbiana de una proteína que consiste distintamente de (a) un hapteno de polipéptido y proteína adicional en cantidad suficiente para conferir inmunidad al producto de la expresión, que puede encontrar uso en la elevación de los anticuerpos al hapteno para uso de ensayo o en la fabricación de vacunas; y (b) un producto de polipéptido deseado y proteína adicional de los cuales puede separarse el producto deseado; y

3. Los métodos para preparar genes estructurales sintéticos que codifican la expresión de los polipéptidos de mamíferos en sistemas de clonación microbianos.

ANTECEDENTES

La información genética se codifica en el ácido desoxirribonucléico de doble hebra ("ADN" o "genes") de acuerdo con el orden en que la hebra de codificación de ADN presenta las bases características de sus componentes nucleótidos de repetición. La "expresión" de la información codificada para formar los polipéptidos involucra un procedimiento en dos partes. De acuerdo con los requisitos

1 de ciertas regiones de control ("reguladores") en el gen,
la polimerasa ARN puede moverse a lo largo de la hilera
de codificación formando el ARN mensajero (ácido ribonu-
cléico) en un proceso llamado "transcripción". En un paso
5 de "traducción" siguiente, los ribosomas de la célula jun-
to con el ARN de transferencia convierten el "mensaje" del
mARN en polipéptidos. Incluida en la información del mARN
transcrito del ADN están las señales para la iniciación y
terminación de la traducción ribosomal así como la identi-
10 dad y secuencia de los aminoácidos que constituyen el po-
lipéptido. La hebra de codificación de ADN consiste en se-
cuencias largas de triplete de nucleótido llamados "codo-
nes" debido a que las bases características de los nucleóti-
dos en cada triplete o codón codifican fragmentos de infor-
15 mación específicos. Por ejemplo, 3 nucleótidos leídos como
ATG (adenina-timina-guanina), dan por resultado una señal
en el mARN que se interpreta como "iniciar la traducción",
mientras que los codones de terminación TAG, TAA y TGA se
interpretan como "detener la traducción". Entre los codo-
20 nes de iniciación y detención queda el llamado gen estruc-
tural, cuyos codones definen la secuencia de aminoácidos
traducida finalmente. Esa definición está de acuerdo con
el "código genético" bien establecido (v. gr., J.D. Watson,
Biología Molecular del Gen W.A. Benjamin Inc., Nueva York,
25 tercera edición 1976) que describe los codones para los
distintos aminoácidos. El código genético es degenerado en
el sentido de que diferentes codones puedan rendir el mis-
mo aminoácido pero solo él, ya que para cada aminoácido
hay uno o más codones para él mismo y no para otro. De es-
30 ta manera por ejemplo, todos los codones TTT, TTC, TTA y

1 TTG, cuando se leen de esa manera, efectúan la codifica-
ción para serina y para ningún otro aminoácido. Durante la
transcripción, debe mantenerse la forma de lectura o fase
de lectura apropiada. Tomamos en cuenta por ejemplo, lo que
5 sucede cuando el transcriptor de polimerasa ARN lee bases
diferentes como comienzo de un codón (subrayado) en la
secuencia . . . GCTGGTTGTAAG . . . :

. . . GCT GGT TGT AAG Ala-Gly-Cys-Lys . . .
10 . . . G CTG GTT GTA AG Leu-Val-Leu . . .
. . . GC TGG TTG TAA A Trp-Leu (DETENER)

El polipéptido producido en última instancia depende vitalmente de la relación espacial del gen estructural con respecto al regulador.

15 Se comprenderá más claramente el procedimiento de la expresión genética una vez que se hayan definido ciertos componentes de los genes:

Operón -- Un gen que consiste del gen(genes) estructural para la expresión de polipéptido y la región de control ("regulador") que regula esa expresión.

20 Promotor -- Un gen dentro del regulador en el cual debe enlazarse la polimerasa ARN para la iniciación de la transcripción.

25 Operador -- Un gen al cual puede enlazarse la proteína represora, impidiendo de esta manera el enlace de la polimerasa ARN en el promotor adyacente.

30 Inductor -- Una sustancia que desactiva la proteína represora, liberando al operador y permitiendo que la polimerasa ARN se enlace al promotor y comience la transcripción.

Sitio de unión de la Proteína Activadora de Catabolito

1

5

10

15

20

25

30

("CAP") -- Un gen que enlaza el monofosfato de adenosina cíclico ("c AMP") por medio del CAP, que se requiere también comúnmente para la iniciación de la transcripción. El sitio de unión de CAP puede ser innecesario en casos específicos. Por ejemplo, una mutación del promotor en el operon de lactosa del fago λ plac UV5 elimina el requisito de cAMP y CAP para la expresión. J. Beckwith y otros, J. Mol. Biol 69, ISS-160 (1972).

Sistema de Promotor-Operador -- Tal y como se usa aquí, una región de control operable de un operón, con o sin tener en cuenta su inclusión de un sitio de unión de CAP o capacidad para codificar la expresión de la proteína represora.

Asimismo a modo de definición, y para usarse en la discusión del ADN recombinante que se da a continuación, se define lo siguiente:

Vehículo de Conación - ADN de doble hebra no cromosomal que consiste de un "replicon" intacto de manera tal que el vehículo se replica, cuando se coloca dentro de un organismo unicelular ("microbio") mediante un procedimiento de "transformación". Un organismo transformado de esta manera se denomina un "transformante".

Plásmido - Para los fines presentes, un vehículo de clonación derivado de virus o bacterias, siendo los últimos "plásmidos bacterianos".

Complementaridad -- Una propiedad conferida mediante las secuencias de base del ADN de una sola hebra que permite la formación del ADN de doble hebra a través de enlaces de hidrógeno entre bases complementarias en las hebras respectivas. La adenina (A) complementa con timina

1 (T) mientras que la guanina (G) complementa con citosina
(C).

5 Los adelantos en bioquímica en años recientes,
han conducido a la construcción de vehículos de clonación
"recombinantes" en donde por ejemplo, los plásmidos se elab-
boran para contener ADN exógeno. En casos particulares,
el recombinante puede incluir ADN "heterólogo", por lo que
se supone que el ADN codifica los polipéptidos ordinaria-
mente no producidos por el organismo susceptibles de trans-
10 formación por el vehículo recombinante. De esta manera, los
plásmidos se dividen o segmentan para proporcionar ADN li-
neal que tiene terminales capaces de ligarse. Estos se en-
lazan a un gen exógeno que tiene terminales capaces de ligarse
se para proporcionar un residuo biológicamente funcional
15 con un replicon intacto y una propiedad fenotípica deseada.
El residuo recombinante se inserta en un microorganismo me-
diante transformación y los transformantes se aíslan y se
someten a clonación con el objeto de obtener poblaciones
grandes capaces de expresar la nueva información genética.
20 Los métodos y medios para formar los vehículos de clona-
ción recombinantes y para transformar los organismos con
los mismos han sido dados a conocer extensamente en la li-
teratura. Véase, V. gr., de H. L. Heynecker y otros, Nature
263, 748-752 (1976); Cohen y otros, Proc. Nat. Acad. Sci.
25 USA 69, 2110 (1972); ibid., 70 1293 (1973); ibid., 70, 3240
(1973); ibid., 71, 1030 (1974); Morrow y otros, Proc. Nat.
Acad. Sci. U.S.A. 71, 1743 (1974); Novick, Bacteriological
Rev., 33, 210 (1969); Hershfield y otros, Proc. Soc. Nat'l.
Acad. Sci. U.S.A. 71, 3455 (1974) y Jackson y otros, ibid.
30 69, 2904 (1972). Una discusión generalizada sobre la materia

1 objeto aparece en Scientific American 233, de S. Cohen, 24
(1975). Estas y otras publicaciones mencionadas en la pre-
sente se incorporan como referencia.

5 Hay disponibles una variedad de técnicas para
la recombinación del ADN de acuerdo con las cuales los ex-
tremos adyacentes de los fragmentos separados del ADN se
preparan de una manera u otra para facilitar la unión. El
último término se refiere a la formación de enlaces de fos-
fodiéster entre los nucleótidos adyacentes, frecuentemente
10 a través del enzima T4 ADN-ligasa. De esta manera, los ex-
tremos romos pueden ligarse directamente. Alternativamente
los fragmentos que contienen hebras individuales complemen-
tarias en sus extremos adyacentes, son promovidos por puen-
tes de hidrógeno que colocan los extremos respectivos para
15 la unión siguiente. Tales hebras sencillas, referidas al
extremo cohesivo, pueden formarse mediante la adición de
nucleótidos a los extremos romos usando transferasa termi-
nal y algunas veces simplemente juntando una hilera de un
extremo romo con un enzima tal como λ -exonucleasa. De
20 nuevo, y de manera más común, puede recurrirse a endonu-
cleasas de restricción que rompen los enlaces de fosfodi-
éster en y alrededor de secuencias singulares de nucleóti-
dos de aproximadamente 4 a 6 pares de bases de longitud.
Muchas endonucleasas de restricción y sus sitios de recono-
25 cimiento son conocidas, la llamada endonucleasa Eco RI es
la que se emplea más extensamente. Las endonucleasas de
restricción que rompen el ADN de doble hebra en "palíndro-
mes" rotacionalmente simétricos dejan terminales cohesivos.
Por lo tanto, un plásmido u otro vehículo de clonación pue-
30 de romperse dejando terminales que consta cada uno de ellos

1
5
10
15
20
25
30

de la mitad del sitio o de reconocimiento de la endonucleasa de restricción. Un producto de ruptura del ADN exógeno obtenido con la misma endonucleasa de restricción tendrá extremos complementarios a los terminales del plásmido. Alternativamente, tal y como se ha dicho antes, el ADN sintético con terminales cohesivos puede proporcionarse para insertarse en el vehículo roto. Para impedir la reunión de los terminales cohesivos de los vehículos pendientes de inserción del ADN exógeno, los terminales pueden digerirse con fosfatasa alcalina, proporcionando una selección molecular para los cierres que incorporan el fragmento exógeno. La incorporación de un fragmento con la orientación apropiada con relación a otros aspectos del vehículo puede mejorarse cuando el fragmento suplanta el ADN de vehículo escindido por dos endonucleasas de restricción diferentes y comprende por sí terminales que constituyen respectivamente la mitad de la secuencia de reconocimiento de las endonucleasas diferentes.

A pesar del trabajo extenso en años recientes en la investigación del ADN recombinante, se han obtenido pocos resultados susceptibles de aplicación inmediata y práctica. Esto se ha demostrado especialmente en el caso de los intentos fallidos para expresar los polipéptidos y semejantes codificados mediante el "ADN sintético", ya sea que se construyan nucleótido por nucleótido de manera convencional o se obtengan mediante transcripción inversa del ARN in aislado (complementario o "cADN"). En esta solicitud se describe lo que parece ser que representa la primera expresión de un producto de polipéptido funcional a partir de un gen sintético, junto con los desarrollos relacionados

1 que prometen aplicación extensa. El producto al cual se ha
ce referencia es la somatostatina (Patente Norteamericana
de Guillemin Número 3.904.594) un inhibidor de la secreción
de la hormona de crecimiento, insulina y glucagon cuyos
5 efectos sugieren su aplicación en el tratamiento de acro-
melagía, pancreatitis aguda y diabetes dependiente de insu-
lina. Véase de R. Guillemin y otros, Annual Rev. Mod. 27,
379 (1976). El modelo de la somatostatina se muestra cla-
ramente en la aplicabilidad de los nuevos desarrollos des-
critos en la presente en numerosos y benéficos frentes, ta-
10 les y como aparecerá de los dibujos que se acompañan, y
más claramente de la descripción detallada que se da a con-
tinuación.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

15 Los dibujos que se acompañan ilustran un con-
texto en donde las modalidades preferidas de la invención
encuentran la aplicación, es decir, expresión de la soma-
tostatina de la hormona mediante transformantes bacteria-
nos que contienen plásmidos recombinantes.

20 Figura 1. Perfil esquemático del procedimien-
to: El gen para la somatostaina, elaborado mediante sínte-
sis química del ADN, se funde en el gen de la β -galacto-
sidasas de E. coli en el plásmido pBR322. Después de la trans-
formación en E. coli, el plásmido recombinante dirige la
25 síntesis de una proteína precursora que puede romperse espe-
cíficamente in vitro por los restos de metionina mediante
bromuro de cianógeno para rendir la hormona polipeptídica
de mamífero activa. A, T, C y G representan las bases carac-
terísticas (respectivamente adenina, timina, citosina y
30 guanina) de los desoxirribonucleotidos en la hobra de codi-

1 ficación del gen de somatostatina.

Figura 2. Estructura esquemática del gen sintético cuya hebra de codificación (es decir, la hebra "superior") consta de codones para la secuencia de aminoácidos de somatostatina (dada).

Figura 3. Ilustración esquemática del método preferido para la construcción de trómeros de nucleótido usados para construir genes sintéticos. En la anotación convencional empleada para ilustrar los nucleótidos en la Figura 3, el 5' OH queda a la izquierda y el 3' OH hacia la derecha, v. gr.,

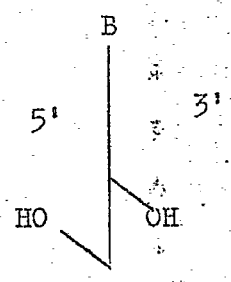


Figura 4. La gráfica de flujo para la construcción de un plásmido recombinante (v. gr., pSOM11-3) capaz de expresar una proteína que contiene somatostatina ("SOM")- comenzando con el plásmido original pBR322. En la Figura 4, el peso molecular aproximado de cada plásmido se da en daltones ("d"). Ap^r y Tc^r respectivamente representan genes con resistencia a la ampicilina y tetraciclina, mientras que Tc^s representa susceptibilidad a la tetraciclina que resulta de la exunión de una porción del gene Tc^r. Se ilustran posiciones relativas de los distintos sitios de ruptura específicos de endonucleasa de restricción en los plásmidos (v. gr., Eco, RI; Bam I, etc.).

1 facilidad en la purificación, etc., los fragmentos del oligodeoxirribonucleótido por ejemplo de aproximadamente 11 a
5 16 nucleótidos se preparan separadamente, y luego se arman o juntan en la secuencia deseada. Por lo tanto, se prepara una primera y una segunda serie de fragmentos de oligodeoxirribonucleótidos de tamaño conveniente. La primera serie, cuando se une en la secuencia apropiada, rinde una hebra de codificación de ADN para la expresión del polipéptido (véase por ejemplo la Figura 2, fragmentos A, B, C y D),
10 La segunda serie, cuando se unen de manera semejante en la secuencia apropiada, rinde una hebra complementaria a la hebra de codificación (v. gr., Figura 2, Fragmentos E, F, G y H). Los fragmentos de las hebras respectivas se solapan preferiblemente de tal manera que la complementaridad activa su autoarmado a través de puentes de hidrógeno de los
15 terminales cohesivos de los bloques fragmento. Después de armarse, el gen estructural se completa mediante unión de manera convencional.

20 La degeneración del código genético permite libertad considerable para la selección de codones para cualquier secuencia determinada de aminoácido. Para los fines presentes, sin embargo, la selección del codon fue guiada ventajosamente por tres consideraciones. Primero, los codones y los fragmentos se seleccionaron y el armado de fragmentos se preparó a fin de evitar complementaridad
25 indebida de los fragmentos, uno con el otro, excepto para los fragmentos adyacentes uno al otro en el gen propuesto. En segundo lugar, se evitan las secuencias ricas en pares de base de AT (v. gr., aproximadamente cinco o más), particularmente cuando son precedidas por una secuencia rica en
30

1 pares de base de GC para evitar la terminación prematura
de la transcripción. En tercer lugar, por lo menos una ma-
yoría de los codones seleccionados son aquellos preferidos
en la expresión de los genomas microbianos (véase por ejem-
5 plo de W. Fiers, y otros, Nature 260, 500 (1976)). Para los
fines de las reivs.anexas, se definen los siguientes como
codones "preferidos para la expresión de los genomas micro-
bianos":

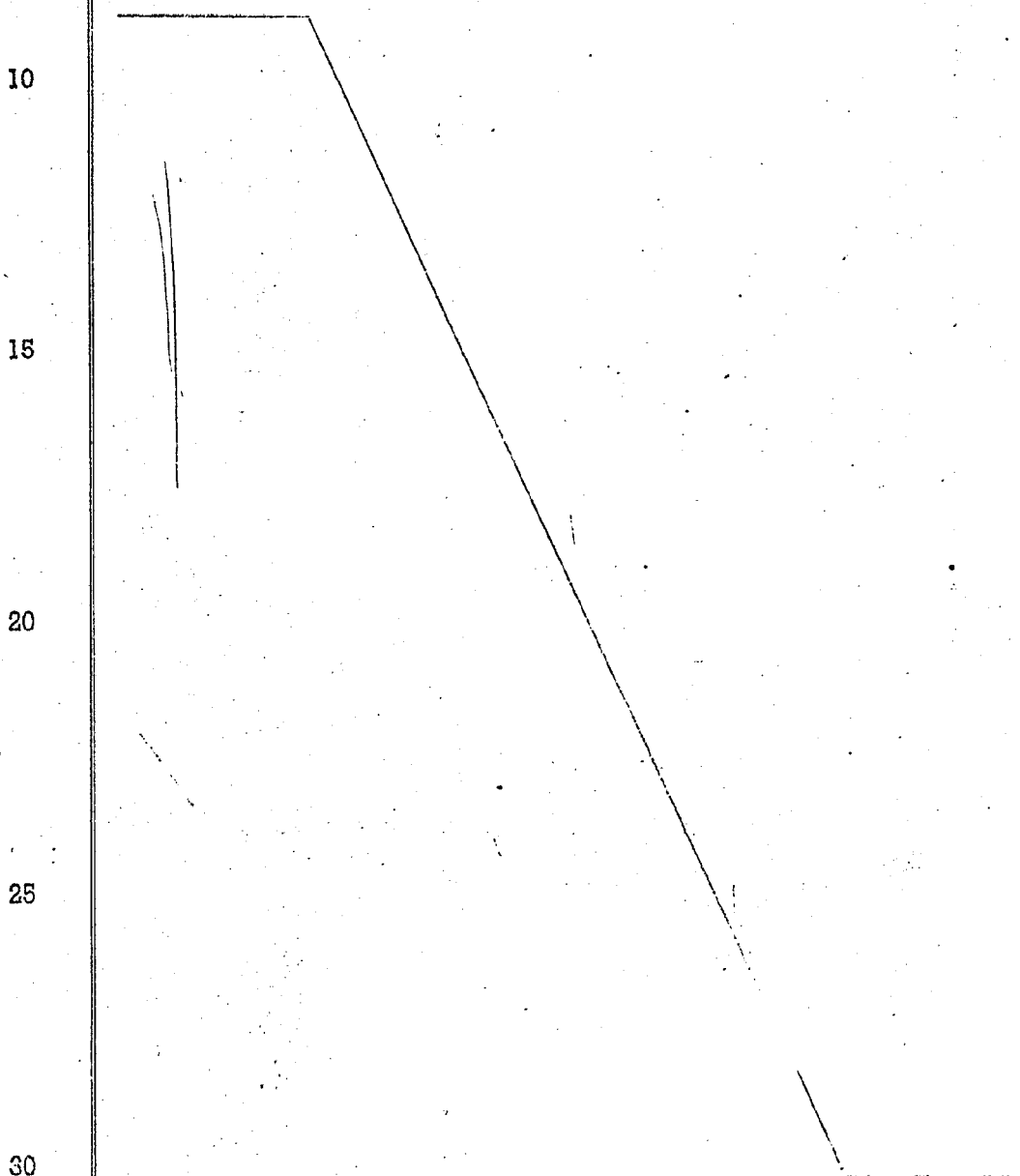


TABLA I

ASIGNACIÓN PREFERENCIAL DE CUBIERTOS

Primera Posición (Extremo 5')	Segunda Posición (Léase a Través)	Tercera Posición (Extremo 3')
Léase hacia abajo	(Léase Hacia Abajo)	(Léase Hacia Abajo)
	T C A G	T C A G
	phe ---	cys T
T	ser	tyr C
	leu ---	detención detención A
	ser	detención trp G
	leu pro	his arg T
	leu pro	his arg C
	leu pro	gln --- A
C	pro	gln --- G
	ile thr	asn --- T
	ile thr	asn ser C
	---	--- --- A
A	met(ini- ciación) thr	lys --- G
	val ala	asp gly T
	val ---	asp --- C
	val ---	glu --- A
G	val ala	glu --- G

1

5

10

15

20

25

30

TABLA I
ASIGNACION PREFERIDA DE CODONES

Segunda Posición		(Léase a Través)		Tercera Posición	
T	C	A	G	(Extremo 3')	(Léase Hacia Abajo)
phe	---	---	cys	T	
phe	ser	tyr	---	C	
leu	---	detención	detención	A	
---	ser	detención	trp	G	
leu	pro	his	arg	T	
leu	pro	his	arg	C	
leu	pro	gln	---	A	
---	pro	gln	---	G	
ile	thr	asn	---	T	
ile	thr	asn	ser	C	
---	---	---	---	A	
met(ini- ciación)	thr	lys	---	G	
val	ala	asp	gly	T	
val	---	asp	---	C	
val	---	glu	---	A	
val	ala	glu	---	G	

1 De preferencia en el caso de la somatostati-
na, las relaciones del aminoácido (codon) del gen estruc-
tural son: gly (CGT); cys (TGT); lys (AAG); trp (TGG); ala
(GCT, GCG); asn (AAT, AAC); phe (TTC, TTT); thr (ACT, ACG);
5 y ser (TCC, TCG).

Cuando el gen estructural de un polipéptido de-
seado va a insertarse en un vehículo de clonación para
expresarse como tal, el gen es precedido por un codon de
"iniciación" (v. gr., ATG), y seguido inmediatamente por
10 uno o más codones de terminación o de detención (véase la
Figura 2). Sin embargo, tal y como se describió antes, la
secuencia de aminoácido de un polipéptido específico puede
expresarse con una proteína adicional que precede y/o sigue
al mismo. Si el uso propuesto del polipéptido requiere rup-
15 tura de la proteína adicional, se codifican sitios de rup-
tura apropiados adyacentes al codon de unión del polipép-
tido-proteína adicional. De esta manera, en la Figura 1
como ejemplo, el producto de la expresión es una proteína
precursora que consiste tanto de somatostatina como de la
20 mayor parte del polipéptido de β -galactosidasa. Aquí, el
ATG no se requiere para que codifique la iniciación de la
traducción debido a que la construcción ribosomal de la
proteína adicional de β -gal les hacía el gen estructural
de la somatostatina. La incorporación de la señal ATG, sin
25 embargo, se codifica para la producción de metionina, un
aminoácido roto específicamente mediante bromuro de cianó-
geno, proporcionando un método fácil para convertir la pro-
teína precursora en el polipéptido deseado.

30 La Figura 2 también muestra una particulari-
dad adicional preferida en el ADN heterólogo destinado pa-

1 ra empleo recombinante, es decir, la provisión de termina-
les cohesivos que preferentemente comprenden una de las dos
5 hebras con un sitio de reconocimiento de la endonucleasa
de restricción. Debido a las razones anteriormente discuti-
das, los terminales de preferencia se diseñan para crear si-
tios de reconocimiento respectivamente diferentes después
de la recombinación.

Aún cuando los desarrollos descritos en la
presente han demostrado ser satisfactorios con el modelo
10 de somatostatina, se apreciará que la codificación del ADN
heterólogo para virtualmente cualquiera secuencia de ami-
noácido conocida se puede emplear, mutatis mutandis. Por lo
tanto, las técnicas discutidas con anterioridad y poste-
riormente, son aplicables, mutatis mutandis, con respecto
15 a la producción de poli(amino)ácidos, tales como polileu-
cina y polialanina; enzimas; proteínas de suero; polipép-
tidos analgésicos, tales como β -endorfinas, que modulan
los umbrales del dolor, etc. De preferencia, los polipépti-
dos producidos de esta manera será hormonas de mamífero o
20 intermedios de las mismas. Entre estas hormonas se pueden
mencionar v. gr., la somatostatina, insulina humana, hormo-
na de crecimiento humana y de bovino, hormona de leutiniza-
ción, ACTH, polipéptido pancreático, etc. Los intermedios
incluyen, por ejemplo, preproinsulina humana, proinsulina
25 humana, las cadenas A y B de la insulina humana y así suce-
sivamente. Además, del ADN elaborado in vitro, el ADN hete-
rólogo puede consistir de cADN que resulta de la transcrip-
ción inversa del mARN. Véase, v. gr., de Ullrich y otros,
Science 196, 1313 (1977).

30 2. Codificación Recombinante para la Expresión de la Pro-

1 teína Precursora

5 En el procedimiento ilustrado esquemática-
mente en la Figura 1, la expresión rinde una proteína pre-
cursora que consiste tanto del polipéptido codificado median-
te un gen estructural heterólogo (somatostatina) como pro-
teína adicional (que consiste de una porción de la enzima
de β -galactosidasa). El sitio de ruptura selectivo adyacen-
te a la secuencia del aminoácido de somatostatina permite
la separación siguiente del polipéptido deseado de la pro-
teína superflua. El caso ilustrado es representativo de una
10 clase considerable de procedimientos que son disponibles por
medio de las técnicas descritas en la presente.

15 De manera más común, la ruptura se efectua-
rá fuera del medio ambiente replicativo del Plásmido u otro
vehículo, tal como por ejemplo, después de la cosecha del
cultivo microbiano. De esta manera, la conjugación temporal
de los polipéptidos pequeños con la proteína superflua, pue-
de proteger a los primeros contra v. gr., degradación in vi-
vo mediante enzimas endógenas. Al mismo tiempo, la proteína
20 adicional ordinariamente despojará al polipéptido deseado
de la bioactividad pendiente de la ruptura extratcelular, con
el efecto de mejorar la bioseguridad del procedimiento. En
casos específicos, desde luego, puede ser deseable efectuar
la ruptura dentro de la célula. Por ejemplo, podrían pro-
25 porcionarse vehículos de clonación con codificación de ADN
para enzimas que convierten los precursores de insulina en
la forma activa, funcionando en tándem con otro ADN codifi-
cado para la expresión de la forma precursora.

30 En el caso preferido, el polipéptido parti-
cular deseado carece de sitios de ruptura internos que co-

1 rresponden al empleado para desprender la proteína super-
flua, aún cuando se apreciará que cuando no se satisface
esa condición las reacciones de competencia todavía propor-
cionarán el producto deseado, aunque en menor rendimiento.
5 Cuando el producto deseado, está exento de metionina, la
ruptura con bromuro de cianógeno en la metiotina adyacente
a la secuencia deseada se ha demostrado ser altamente efec-
tiva. Asimismo, los productos exentos de arginina y lisina
10 pueden romperse enzimáticamente con v. gr., tripsina o qui-
motripsina en arg-arg, lys-lys o sitios de ruptura semejan-
tes adyacentes a la secuencia deseada. En el caso en donde
la ruptura deja, v. gr., arginina no deseada fijada al pro-
ducto deseado, puede reponerse mediante digestión con carbo-
xipeptidasa. Cuando se emplea tripsina para romper por arg-
15 arg, pueden protegerse primero los sitios de lisina dentro
del polipéptido deseado tal como con anhídridos maléicos o
citraconícos. Las técnicas de ruptura que se discuten en la
presente a modo de ejemplo sólo son representativas de mu-
chas variantes que se les ocurrirán a aquellas personas ex-
20 pertas en la técnica como consecuencia de la especificación.

La proteína separable puede expresarse adya-
cente ya sea a los terminales C- o N- del polipéptido espe-
cífico o aún dentro del polipéptido mismo, tal como en el
caso de la secuencia incluida que distingue la proinsulina
25 y la insulina. De nuevo, el vehículo empleado puede codifi-
carse para la expresión de proteína que consiste de secuen-
cias repetidas del polipéptido deseado, cada uno separado
mediante sitios de ruptura selectivos. De manera especial-
mente preferida, sin embargo, los codones para la proteína
30 superflua se traducirán antes del gen estructural del pro-

1 ducto deseado, tal como en el caso ilustrado en las Figuras. En cada caso, debe tenerse cuidado de mantener la forma de lectura apropiada con relación al regulador.

3. Expresión de Inmunógenos

5 La capacidad para expresar tanto el polipéptido específico como la proteína superflua proporciona herramientas útiles para la producción de sustancias inmunogénicas. Los "haptenos" de polipéptido (es decir, sustancias que contienen materiales determinantes enlazados específicamente mediante anticuerpos y semejantes, pero que son por lo general demasiado pequeños para producir una respuesta inmune) pueden expresarse como conjugados con proteína adicional suficiente en tamaño para conferir inmunidad. Desde luego, el conjugado de β -gal - somatostatina producido aquí a modo de ejemplo es de tamaño inmunogénico y puede esperarse que eleve los anticuerpos que enlazan el hapteno de somatostatina. Las proteínas que contienen un exceso de 100 aminoácidos, más comúnmente un exceso de 200 aminoácidos, exhiben carácter inmunogénico.

20 Los conjugados preparados de la manera anteriormente citada, pueden emplearse para elevar los anticuerpos útiles para ensayos radioinmunes u otros ensayos para el hapteno, y alternativamente en la producción de vacunas. A continuación se describe un ejemplo de la última aplicación. El bromuro de cianógeno - u otros productos de ruptura de la proteína de revestimiento viral, rendirán oligopéptidos que se enlazan al anticuerpo elevado por la proteína misma. Desde la secuencia de aminoácidos de este hapteno de oligopéptido, el ADN heterólogo para el mismo puede expresarse como un conjugado con proteína adicional que

1 confiere inmunidad. El uso de estos conjugados como vacunas
podría esperarse que disminuyera las reacciones secundarias
que acompañan el uso de la proteína de revestimiento misma,
para conferir inmunidad.

5 4. Elementos de Control

La Figura 1 ilustra un procedimiento donde un organismo
transformante expresa el producto de polipéptido del ADN he-
terólogo colocado bajo el control de un regulador "homólogo"
al organismo en su estado no transformado. Así, el ADN
10 cromosomal de E. coli dependiente de lactosa comprende un
operon de lactosa o "lac" el cual interviene en la diges-
tión de la lactosa, inter alia, elaborando la enzima β -ga-
lactosidasa. En el caso específico ilustrado, los elemen-
tos de control de lac se obtienen de un bacteriofago, λ
15 plac 5, que es ineficaz para el E. Coli. El operon lac del
fago, a su vez, derivó mediante transducción de las mismas
especies bacterianas, de aquí la "homología". Los regula-
dores homólogos apropiados para usarse en el procedimiento
descrito, pueden proceder alternativamente del ADN plasmí-
20 dico nativo al organismo.

La sencillez y eficacia del sistema de pro-
motor-operador lac recomiendan su uso en los sistemas que
se describen así como su capacidad para incluirse mediante
el IPTG. (isopropiltio- β -D-galactosido). Desde luego, otros
25 operones o porciones de los mismos, podrían emplearse tam-
bién v. gr., el promotor-operador lambda, el operon arábino
sa (ϕ 80 dara), o los operones de colicina El, galactosa,
fosfatasa alcalina, o triptofano. Los promotores-operado-
res derivados del último (es decir, el "operon tryp") po-
30 dría esperarse que confiriera una inducción pendiente de la

1 represión del 100 por ciento (con el ácido indolacrílico)
y cosecharse.

5. Construcción del Plásmido por lo General

5 Los detalles del procedimiento ilustrado esquemática-
mente en la Figura 4, aparecen de la sección Experimental,
infra. En este punto, sin embargo, es útil discutir breve-
mente varias técnicas empleadas para construir el plásmido
recombinante de la modalidad preferida.

10 La clonación y expresión del gen de somatos-
tatina sintética empleó dos plásmidos. Cada plásmido tiene
un sitio substrato de EcoRI en una región diferente del gen
estructural de β -galactosidasa (véanse las Figuras 4 y 5).
La inserción del fragmento de ADN de somatostatina sintéti-
co en los sitios de EcoRI de estos plásmidos llevan la ex-
15 presión de la información genética en aquel fragmento bajo
control de los elementos que controlan el operon lac. Des-
pués de la inserción del fragmento de somatostina en estos
plásmidos, la traducción debe dar por resultado un polipé-
tido de somatostatina precodido ya sea por 10 aminoácidos
20 (pSOM1) o por virtualmente toda la estructura de la subu-
nidad de la β -galactosidasa (pSOM11-3).

25 El programa de construcción del plásmido se
inicia con el plásmido pBR322, un vehículo de clonación
bien caracterizado. La introducción en los elementos lac de
este plásmido se logró mediante inserción de un fragmento
de endonucleasa de restricción HaeIII (203 nucleótidos) que
lleva el promotor lac, el sitio de enlace de CAP, el opera-
dor, el sitio de enlace al ribosoma y los primeros 7 codones
de aminoácidos del gene estructural de β -galactosidasa. El
30 fragmento de HaeIII proviene del ADN de λ plac5. El plásmi-

1 do EcoRI- PBR322 separado, que tenía sus terminales repara-
dos con polimerasa de ADN T4 y trifosfato de desoxirribonu-
cléotido, se ligó con el extremo romo del fragmento HaeIII
para crear terminales EcoRI en los puntos de inserción. La
5 unión de estos terminales de HaeIII y EcoRI reparado general
el sitio de restricción de EcoRI (véanse las Figuras 4 y 5)
en cada terminal. Los transformantes de E. coli RR1 con es-
te ADN se seleccionaron con resistencia a la tetraciclina
(Tc) y a la ampicilina (Ap) en el medio de 5-bromo-4-cloro-
10 incolilgalactosido (X-gal). En este medio indicador, las
colonias constitutivas para la síntesis de β -galactosidasa
debido al número aumentado del represor de evaluación de
los operadores lac, se identificaron mediante su color
azul. Dos orientaciones del fragmento de HaeIII, son desde
15 luego posibles, pero estos se distinguieron mediante la
ubicación asimétrica de un sitio de restricción de Hha, en
el fragmento. El plásmido pBH10 se modificó además para eli-
minar el sitio de endonucleasa de EcoRI distante del opera-
dor lac (pBH20).

20 Los ocho oligodesoxirribonucléotidos, quími-
camente sintetizados (Figura 2) se marcaron en los termina-
les 5' con γ -³²P-ATP mediante polinucleótido quinasa
y se unieron con la ligasa de ADN T4. A través de enlaces
de hidrógeno entre los fragmentos empalmados, el gen de la
25 somatostatina se arma por sí y eventualmente se polimeriza
en moléculas más grandes, debido a los terminales del sitio
de restricción cohesivo. Los productos ligados se trataron
con endonucleasas de restricción de EcoRI y BamHI para ge-
nerar el gen de somatostatina tal y como se ilustra en la
30 Figura 2.

1 El fragmento del gen de somatostatina sinté-
tico con los terminales de EcoRI y BamI se ligó con el plás-
mido pBH20, tratado anteriormente con las endonucleasas de
restricción de EcoRI y BamHI y la fosfatasa alcalina. El
5 tratamiento con fosfatasa alcalina proporciona una selec-
ción molecular de plásmidos que llevan el fragmento inser-
tado. Los transformantes resistentes a la ampicilina, obte-
nidos con este ADN ligado, se seleccionaron para determinar
la sensibilidad a la tetraciclina y se examinaron varios
10 para la inserción en un fragmento de EcoRI-BamHI del tama-
ño apropiado.

Ambas hebras en los fragmentos de EcoRI-BamHI
de los plásmidos de dos clones se analizaron mediante análi-
sis de secuencia de nucleótidos comenzando desde los si-
15 tios de BamHI y EcoRI. El análisis en secuencia se exten-
dió hacia los elementos de control de lac; la secuencia del
fragmento lac estaba intacta y en un caso, pSOM1, la se-
cuencia del nucleótido de ambas hileras se determinaron in-
dependientemente, cada una de ellas proporcionando la se-
cuencia ilustrada en la Figura 5A.

20 El fragmento de EcoRI-Pst del plásmido pSOM1
con el elemento de control lac, se separó y se reemplazó
por el fragmento de EcoRI-Pst del pBR322 a fin de producir
el plásmido pSOM11. El fragmento de EcoRI de plac 5, que
25 lleva la región de control del operon lac y la mayor parte
del gen estructural de β -galactosidasa, se insertó en el
sitio de EcoRI del pSOM11. Dos orientaciones del fragmento
lac de EcoRI del λ plac⁵ se esperaban. Una de estas orien-
taciones mantendría la forma de lectura apropiada en el gen
30 de somatostatina, y la otra no. El análisis de los clones

1 independientemente aislados con actividad de somatostatina
identificó los clones que contenían el gen orientado apro-
piadamente, del cual el clono designado pSOM11-3 era uno
de ellos.

5 6. El Microorganismo

Se han propuesto varios microorganismos uni-
celulares como candidatos para la transformación tales como
bacterias, hongos y algas. Es decir, aquellos organismos
unicelulares que sean capaces de crecer o desarrollarse en
10 cultivos o fermentación. Las bacterias en su mayor parte
son los organismos más convenientes para trabajar. Las bac-
terias que son susceptibles a transformación incluyen miem-
bros de Enterobacteriaceas, tales como cepas de Escherichia
coli y Salmonella; Bacillaceas, tal como Bacillus subtilis;
15 Pneumococcus; Streptococcus, y Haemophilus influenzae.

El organismo específico que se selecciona
para el trabajo experimental que se discutirá a continua-
ción fue el E. coli. cepa RRL, genotipo: $\text{Pro}^- \text{Leu}^- \text{Thi}^- \text{R}_B^- \text{M}_B^-$
 $\text{r}\text{ec} \text{ A}^+ \text{Str}^F \text{Lac} \text{ y}^-$. E. Coli. RRL se deriva de E. Coli
20 HB101 (H.W. Boyer y otros, J. Mol Biol. (1969) 41, 459-472)
apareándose con E. Coli K12 cepa K116 como donador de Hfr.
Véase de J.H. Miller, Experimentos en Genética Molecular
(Cold Spring Harbor, Nueva York 1972). El solicitante ha in-
dicado que los cultivos de E. Coli RRL como de E. Coli RRL
25 (pBR322) se depositaron en la Colección de Cultivo America-
na sin restricción al acceso concurrentemente con la presen-
tación de esta solicitud, con los números de ATCC 31343 y
31344 respectivamente.

30 "En el caso de la insulina humana, los genes
de cadenas A y B fueron clonados en E. Coli K12 cepa 294

1 (final A, thi⁻, hsr⁻, hsmk⁺) ATCC No, --- y ese organismo
empleado en expresión de la cadena A (E. Coli K12 hebra 294
[pIal], ATCC No ---). La cadena B de insulina humana fue
5 primero expresada en un derivado de HB101, i.e., E. Coli K-12
hebra D1210, un lac⁺ (iQo⁺ zty⁺), y que el gen B que con-
tiene el organismo ha sido depositado igualmente (ATCC No ---)
Alternativamente, el gen B puede ser insertado y expresado
del organismo mencionado primeramente, i.e., hilera 294".

EXPERIMENTAL

I SOMATOSTATINA

1. Construcción de los Fragmentos del Gen de Somatostatina

15 Ocho oligodeoxirribonucleótidos, marcados res-
pectivamente A a H en la Figura 2, se construyeron primero
principalmente mediante el método de triéster modificado de
K. Itakura y otros, J. Am. Chem. Soc. 97, 7327 (1975). Sin
embargo en el caso de los fragmentos C, E y H se recurrió
a una técnica mejorada en donde los trimeros completamente
20 protegidos se preparan primero como unidades básicas para
construir oligodeoxirribonucleótidos más largos. La técnica
mejorada se ilustra esquemáticamente en la Figura 3, en don-
de B es timina, adenina N-benzoilada, citosina N-benzoilada
o guanina N-isobutirilada. Abreviando y con referencia a la
Figura 3, con un exceso de I (2 milimoles), la reacción de
25 copulación con II (1 milimol) casi se completó en 60 minu-
tos con la ayuda de un reactivo de copulación poderoso, la
tetrazolida de 2, 4, 6-triisopropilbencenosulfonilo (TPSTe,
4 milimoles) 2). Después de la separación del grupo 5'-pro-
30 tector con una solución al 2 por ciento de ácido bencenosul-
fónico, el dímero 5'-hidroxilo V podía separarse del exc-

1 so del monómero de fosfodiéster IV mediante extracción con
 un disolvente sencillo con una solución de NaHCO₃ acuosa y
 CHCl₃. El bloque trímero, completamente protegido se prepa
 5 ró sucesivamente a partir del dímero de 5'-hidroxilo V, I
 (2 milimoles), y TPSTe (4 milimoles) y se aisló mediante
 cromatografía sobre gel de sílice, tal como en el artículo
 de B. T. Hunt y otros, Chem, and Ind. 1967, 1868 (1967).
 Los rendimientos de los trímeros elaborados de acuerdo con
 la técnica mejorada aparecen del Cuadro II.

10

CUADRO II

Rendimientos de los Trímeros Completamente Protegidos

Secuencia	Rendimiento	Secuencia	Rendimiento
TTT	81 %	ATG	69 %
TTT	75 %	GCC	61 %
15 GGA	41 %	CCA	72 %
AGA	49 %	CAA	72 %
ATC	71 %	TTA	71 %
CGT	61 %	CAT	52 %
ACA	63 %	CCC	73 %
20 ACC	65 %	AAC	59 %
CGT	51 %	GAT	60 %

20

25

30

Los ocho oligodeoxirribonucleótidos, des-
 pués de la separación de todos los grupos protectores se
 purificaron mediante cromatografía de líquido de alta pre-
 sión en Permafase AAZ (R. A. Henry y otros J. Chrom. Sci.
II, 358 (1973)). La pureza de cada oligómero se comprobó
 mediante homocromatografía en DEAE-celulosa de capa fina y
 también mediante electroforesis en capa de acrilamida al
 20 por ciento después de marcar los oligómeros con γ -³²P-
 γ -ATP en presencia de polinucleótido quinasa. Un produc-

1 to principal marcado se obtuvo de cada fragmento de ADN.
2. Unión y Análisis en Gel de Acrilamida del ADN de Somatos
tatina

5 Los terminales de 5' OH de los fragmentos
A a H químicamente sintetizados se fosforilaron separada-
mente con polinucleótido quinasa T4. Se usó γ - ^{32}P -ATP
en la fosforilación de manera que los productos de reacción
podían supervisarse autoradiográficamente aún cuando se
apreciara que el ATP no marcado serviría también pero sin
10 autorradiografía. Justamente antes de la reacción de la qui-
nasa, 25 uCi de γ - ^{32}P -ATP (aproximadamente 1500 Ci/
milimoles) (Maxam y Gilbert, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.
74, 1507 (1977) se evaporaron hasta sequedad en tubos de
Eppendorf de 0,5 mililitros de capacidad. Cinco microgra-
15 mos del fragmento se incubaron con 2 unidades de la ADN
quinasa T4 (fracción de hidroxilapatita, 2500 unidades/mi-
lilitro; 27), en 70 mM de Tris-HCl de pH de 7,6, 10 mM de
MgCl₂, 5 mM de ditiotreitól en un volumen total de 150 mi-
crolitros durante 20 minutos a temperatura de 37°C. Para
20 asegurar la fosforilación máxima de los fragmentos con el
fin de unirlos, 10 microlitros de una mezcla que consistía
de 70 mM de Tris-HCl de pH de 7,6 10 mM de MgCl₂, 5 mM de
ditiotreitól 0,5 mM de ATP y dos unidades de ADN quinasa,
se añadieron y la incubación se continuó durante 20 minu-
25 tos adicionales a una temperatura de 7°C. Los fragmentos
(250 ng/microlitros) se almacenaron a una temperatura de
-20°C. sin tratamiento adicional. Los fragmentos A, B, E
y F sometidos a quinasa (1,25 microgramos cada uno) se li-
garon en un volumen total de 50 microlitros en 20 mM de
30 Tris-HCl de pH de 7,6, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de ditiotrei-

1 tol, 0,5 mM de ATP y 2 unidades de ADN ligasa T4 (fracción
de hidroxilapatita, 400 unidades/mililitros; 27), durante
16 horas a una temperatura de 4°C. Los fragmentos C, D, G
5 y H se ligaron en condiciones semejantes. Se separaron mues-
tras de 2 microgramos para análisis mediante electroforesis
en gel de poliacrilamida al 10 por ciento seguido por auto
radiografía (H.L. Heyneker y otros, Nature 263, 748 (1976))
10 en donde los fragmentos de ADN sin reaccionar están repre-
sentados por el material que emigra rápidamente y en donde
la forma monomérica de los fragmentos ligados emigran con
un colorante de azul de bromofenol (BPB). Ocurre también
cierta dimerización debido a los extremos cohesivos de los
fragmentos A, B, E y F ligados y los fragmentos C, D, G y
H ligados. Estos dímeros representan el material que emigra
15 más lentamente, y pueden romperse mediante endonucleasa de
restricción EcoRI y Bam HI, respectivamente.

Las dos medias moléculas (A + B + E + F li-
gadas y C + D + G + H ligadas) se unieron mediante un paso
de unión adicional llevado a cabo en un volumen final de
20 150 microlitros a una temperatura de 4°C. durante 16 horas.
Un microlitro se separó para análisis. La mezcla de reac-
ción se calentó durante 15 minutos a una temperatura de 65°C
para inactivar la ADN ligasa T4. El tratamiento térmico
25 no afecta el patrón de migración de la mezcla de ADN. Se
añadió una cantidad suficiente de endonucleasa de restric-
ción BamHI a la mezcla de reacción para romper las formas
multiméricas del ADN de somatostatina en 30 minutos a una
temperatura de 37°C. Después de la adición de NaCl 100 mM,
30 el ADN se digirió con la endonucleasa de EcoRI. Las diges-
tiones de la endonucleasa de restricción se dieron por ter-

1 minadas mediante extracción del ADN con fenol-cloroformo.
El fragmento de ADN de somatostatina se purificó de frag-
mentos de ADN no reaccionados y parcialmente unidos, median-
te electroforesis de preparativa en un gel de poliacrilami-
5 da al 10 por ciento. La banda que contenía el fragmento de
ADN de somatostatina se separó del gel y el ADN se eluyó
rebanando el gel en pedazos pequeños y extrayendo el ADN
con un tampón de elución (acetato de amonio de 0,5 M, 10 mM
de $MgCl_2$, 0,1 mM de EDTA, 0,1 por ciento de SDS) durante la
10 noche a temperatura de 65°C. El ADN se precipitó con 2 vo-
lúmenes de etanol, se centrifugó, se volvió a disolver en
200 microlitros de Tris-HCl de 10 mM de un pH de 7,6 y se
dializó contra el mismo tampón dando por resultado una con-
centración de ADN de somatostatina de 4 microgramos por mi-
15 lilitro.

3. Construcción de Plásmidos Recombinantes

La Figura 4 ilustra esquemáticamente la ma-
nera en la cual los plásmidos recombinantes que constituyen
el gen de somatostatina se construyeron, y se puede referir
20 en relación con la siguiente discusión más pormenorizada.

A. El Plásmido Original pBR322

El plásmido seleccionado para clonación de
somatostatina experimental fue el pBR322, un plásmido peque-
ño (de peso molecular de aproximadamente 2,6 megadaltones)
25 que lleva genes de resistencia a los antibióticos de ampici-
lina (Ap) y tetraciclina (Tc). Como se indica en la Figura
4, el gen de resistencia a la ampicilina incluye un sitio
de ruptura con la endonucleasa de restricción Pst I, el gen
de resistencia a la tetraciclina incluye un sitio semejante
30 para la endonucleasa de restricción Bam III, y un sitio de

1 Eco RI se sitúa entre los genes de Ap^r y Tc^r. El plásmido
pBR322 se deriva de pBR313, un plásmido de 5,8 megadaltones
de Ap^rTc^rCol^{imm} (R. L. Rodríguez y otros, Symposium de la
5 (1976), de R. L. Rodríguez y otros, Construcción y Caracte-
rización de los Vehículos de Clonación, en Mecanismos Mole-
culares en el Control de la Expresión del Gen, página 471-
477, Academic Press, Inc., (1976). El plásmido pBR322 es-
tá caracterizado y la manera de su derivación se describe
10 completamente en el artículo de F. Bolivar y otros, "Cons-
trucción y Caracterización de los Nuevos Vehículos de Clo-
nación II. Un Sistema de Clonación para fines Múltiples",
Gen (noviembre de 1977).

B. Construcción de Plásmido pBH10

15 Cinco microgramos del plásmido pBR322 de
ADN se digirieron con 10 unidades de la endonucleasa de
restricción EcoRI en 100 mM de Tris-HCl de pH de 7,6, 100
mM de NaCl, 6 mM de MgCl₂ a una temperatura de 37°C. duran-
te 30 minutos. La reacción se dió por terminada mediante
20 extracción con fenol-cloroformo; el ADN luego se precipitó
con dos y medio volúmenes de etanol y se volvió a suspender
en 50 microlitros de un tampón de ADN polimerasa T4 (67 mM
de Tris-HCl, pH de 8,8, 6,7 mM de MgCl₂, 16,6 mM de (NH₄)₂
SO₄, 167 mg/ml de albúmina de suero de bobino, 50 mM de cada
25 uno de los aNTP; A. Panet y otros, Biochem. 12, 5045 (1973).
La reacción se comenzó mediante la adición de 2 unidades
de la ADN polimerasa T4. Después de incubarse durante 30
minutos a temperatura de 37°C, la reacción se dió por termi-
nada mediante extracción con fenol-cloroformo del ADN segui-
do por precipitación con etanol. Tres microgramos de ADN
30

1 de λ plac⁵ (Shapiro y otros Natur e 224 768 (1969) se digi-
rieron durante 1 hora a una temperatura de 37°C. con la en-
zima de restricción HaeIII (3 unidades) en 6 mM de Tris-HCl
5 de pH de 7,6, 6 mM de MgCl₂, 6 mM de beta-mercaptoetanol en
un volumen final de 20 microlitros. La reacción se detuvo
calentándose durante 10 minutos a temperatura de 65°C. El
ADN tratado con pBR322 se mezcló con el ADN de λ plac⁵ di-
gerido con HaeIII y el extremo romo se ligó en el volumen
10 final de 30 microlitros con 1,2 unidades de ADN ligasa T4
(fracción de hidroxilapatita; A. Panet y otros, supra) en
20 mM de Tris-HCl de pH de 7,6, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de
ditiotreitól, 0,5 mM de ATP durante 12 horas a 12°C. La mez-
cla de ADN ligado se dializó contra 10 mM de Tris-HCl de
15 pH de 7,6, y se usó para la transformación de E. coli cepa
RR1. Los transformantes se seleccionaron por su resistencia
a la tetraciclina y ampicilina en placas de medio mínimo
que contenían 40 mg/ml de un medio de 5-bromo-4-cloro-colil
galactosido (X-gal) (J.H. Miller, Experimentos en Genética
20 Molecular (Cold Spring Harbor, Nueva York, 1972)). Las co-
lonias constitutivas para la síntesis de la β -galactosida-
sa se identificaron mediante su color azul. Después de se-
leccionar 45 colonias azules aisladas independientemente,
en tres de ellas se encontró que contenían ADN de plásmido
que tenían dos sitios de EcoRI, separados por aproximada-
25 mente 200 pares de bases. La posición de un fragmento de
HhaI colocado asimétricamente en el fragmento de control de
lac HaeIII en el par de bases 203 (W. Gilber y otros, en
Interacciones de Proteína-Grupo Coordinador, H. Sand y G.
Blauer, Editores (De Gruyter, Berlín, (1975) páginas 193 a
30 210) permite la determinación de la orientación del frag-

1 mento de HaeIII, que ahora es un fragmento de EcoRI en es-
tos plásmidos. El plásmido pBH10 se mostró que llevó el
fragmento en la orientación deseada, es decir, la trans-
cripción de lac que va hacia el gen de Tc^r del plásmido.

5 C. Construcción del Plásmido pBH20

 El plásmido pBH10 se modificó luego para
eliminar el sitio de EcoRI distante del operador lac. Esto
se logró mediante ruptura preferencial con endonucleasa de
EcoRI en el sitio distante que involucra la protección par-
10 cial mediante ARN polimerasa del otro sitio de EcoRI colo-
cado entre los promotores de Tc^r y lac, que están separa-
dos únicamente en más o menos 40 pares de bases. Después
de enlazar con ARN polimerasa, el ADN (5 microgramos) se di-
girió con EcoRI (1 unidad) en un volumen final de 10 micro-
15 litros durante 10 minutos a una temperatura de 37°C. La
reacción se detuvo mediante calentamiento a una temperatu-
ra de 65°C. durante 10 minutos. Los terminales cohesivos
de EcoRI se digirieron con nucleasa S1 en 25 mM de Na-acet-
tato, pH de 4,5, 300 mM de NaCl, 1 mM de ZnCl₂ a una tem-
20 peratura de 25°C. durante 5 minutos. La mezcla de reacción
se detuvo mediante la adición de EDTA (10 mM finales) y
Tris-HCl de pH de 8 (50 mM final). El ADN se extrajo con
fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y se resuspendió
en 100 microlitros de un tampón de unión de ADN T4. La ADN
25 ligasa T4 (1 microlitro) se añadió y la mezcla se incubó
a una temperatura de 12°C. durante 12 horas. El ADN ligado
se transformó en E. coli cepa RRL, y se seleccionaron los
transformantes Ap^rTc^r en un medio de X-gal-antibiótico. El
análisis con el enzima de restricción del ADN seleccionado
30 de 10 colonias azules aisladas reveló que estas clones lis-

1 vaban ADN de plásmido con un sitio de EcoRI. Siete de estas
colonias habían retenido el sitio de EcoRI colocado entre
los promotores de lac y Tc^r. Se confirmó la secuencia de
nucleotidos hacia el sitio de EcoRI en la región de control
5 lac de uno de los plásmidos, pBH20. Este plásmido se usó
luego para clonación del gen de somatostatina.

D. Construcción del Plásmido pSOM.1

10 Veinte microgramos del plásmido pBH20 se di-
girieron hasta completar su digestión con las endonuclea-
sas de restricción EcoRI y BamHI en un volumen final de 50
microlitros. Se añadió fosfatasa alcalina bacteriana (0,1
unidad de Worthington BAPF) y la incubación se continuó du-
rante 10 minutos a una temperatura de 65°C. Las reacciones
15 se dieron por terminadas mediante extracción con fenol-clo-
roformo, y el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol se
centrifugó y se disolvió en 50 microlitros de 10 mM de tris-
HCl de pH de 7,6, 1 mM de EDTA. El tratamiento con fosfata-
sa alcalina impide de manera efectiva la auto-unión del
ADN de pBH20 tratado con EcoRI, BamHI, pero los plásmidos
20 recombinantes circulares que contenían ADN de somatostatina
podían formarse todavía después de la unión. Puesto que el
E. coli RRI se transformó con eficiencia muy baja mediante
plásmido de ADN lineal, la mayoría de los transformantes con-
tendrán plásmidos recombinantes. Cincuenta microlitros del
25 ADN de somatostatina (4 mg/ml) se unieron con 25 microlitros
del ADN de pBH20 tratado con fosfatasa alcalina de BamHI,
EcoRI, en un volumen total de 50 microlitros que contenían
20 mM de Tris-HCl de pH de 7,6, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de
ditiotrecitol, 0,5 mM de ATP y 4 unidades de la ligasa de
30 ADN IV a una temperatura de 22°C. Después de 10, 20 y 30

1 minutos, se añadió a la mezcla de reacción ADN de somatos
tatina adicional (40 ng) (la adición gradual de ADN de so
matostatina puede favorecer la unión del plásmido con re-
lación a la autoligazón). La unión se continuó durante 1
5 hora seguido por diálisis de la mezcla contra 10 mM de
tris-HCl de pH de 7,6. En un experimento de control, el
ADN de pBH20 tratado con fosfatasa alcalina de BamHI,
EcoRI, se unió en ausencia del ADN de somatostatina en
condiciones semejantes. Ambas preparaciones se usaron sin
10 tratamiento adicional para transformar el E. coli RR1. Los
experimentos de transformación se llevaron a cabo en una
instalación de recipientes físicos P3 (National Institutes
of Health, U.S.A. Recombinant DNA Research Guidelines,
1976). Los transformantes se seleccionaron en placas de
15 medio mínimo que contenían 20 mg/ml de Ap y 40 mg/ml de
X-gal. Se aularon diez transformantes, que eran todos sen-
sibles a Tc. Para referencia estos se designaron pSOM1,
pSOM2, etc. pSOM 10. En el experimento de control no se
20 obtuvieron transformantes. Cuatro de los diez transforman-
tes contenían plásmidos tanto con un sitio de EcoRI como
un sitio de BamHI. El tamaño del fragmento pequeño de
EcoRI, BamHI de estos plásmidos recombinantes era en los
cuatro casos semejantes al tamaño del ADN de somatostatina
preparado in vitro. El análisis de secuencia de bases de
25 acuerdo con Maxam y Gilbert Proc. Nat. Acad. Sci, U.S.A.
74, 560 (1977), reveló que el plásmido pSOM1 tenía inser-
tado el fragmento de ADN de somatostatina deseado.

30 La secuencia de ADN del plásmido pSOM1 que
lleva el clono, predice que debe producir un péptido que
conste de somatostatina. Sin embargo, no se ha detectado

1 actividad radioinmune de somatostatina en extractos de gra
nulos de células o líquidos sobrenadantes de cultivo ni se
detecta la presencia de somatostatina cuando el cultivo en
crecimiento se añade directamente a ácido fórmico al 70 por
5 ciento y bromuro de cianógeno. Los extractos de E. Coli.
RRI se ha observado que degradan muy rápidamente la soma-
tostatina exógena. La ausencia de actividad de somatostati-
na en el plásmido pSOM 1 que lleva los clones podría dar
por resultado la degradación intracelular mediante enzimas
10 proteolíticas endógenas. El plásmido pSOM 1 se empleó para
construir una codificación de plásmido para una proteína
precursora que conste de somatostatina y que es lo suficien-
temente grande para esperarse que resista la degradación
proteolítica.

15 E. La Construcción de los Plásmidos pSOM 11 y pSOM 11-3

Se construyó un plásmido en donde el gen
de somatostatina podía colocarse en el terminal C del gen
de β -galactosidasa manteniendo la traducción en fase. La
presencia de un sitio de EcoRI cerca del terminal C de este
20 gen y la secuencia de aminoácido disponible de esta proteí-
na (B. Polisky y otros, Proc. Nat. Acad. Sci, U.S.A. 73,
3900 (1976), A. V. Fowler y otros, Id. at 74, 1507 (1976),
A.I. Bikhari y otros, Nature New Biology 243, 238 (1973) y
K.E. Langley, J. Biol. Chem. 250, 2587 (1975)) permitió la
25 inserción del gen de somatostatina de EcoRI BamHI en el si-
tío de EcoRI, mientras que se mantenga la forma de lectura
apropiada. Para la construcción de este plásmido, se digi-
rió el ADN de pSOM1 (50 microgramos) con las enzimas de res-
tricción EcoRI y PstI en un volumen final de 100 microlit-
30 tros. Se usó un gel de poliacrilamida al 5 por ciento pre-

1 parativo para separar el fragmento grande de Pst-EcoRI que
lleva el gen de somatostatina del fragmento pequeño que lle
va los elementos de control lac. La banda grande se separó
del gel y el ADN se eluyó rebanando el gel en trozos peque
5 ños y extrayendo el ADN a 65°C. durante la noche. De mane
ra semejante, se digirió el ADN del plásmido pBR322 (50 mi
crogramos) con las endonucleasas de restricción PstI y
EcoRI y los dos fragmentos de ADN resultantes se purifica
ron por electroforesis preparativa en un gel de polisacril
10 mida al 5 por ciento. El fragmento pequeño de PstI-EcoRI
del pBR322 (1 microgramo) se unió con el fragmento grande
de ADN de PstI-EcoRI (5 microgramos) de pSOM1 en un volu
men final de 50 microlitros con una unidad de ADN-ligasa T4
a 12°C. durante 12 horas. La mezcla unida se usó para trans
15 formar el E. coli RRI y se seleccionaron transformantes pa
ra resistencia a ampicilina en un medio de X-gal. Como era
de esperar, casi todos los transformantes de Ap^r (95 por
ciento) proporcionaron colonias blancas (sin operador lac)
en las placas indicadoras de X-gal. El plásmido resultante,
20 pSOM11 se usó en la construcción del plásmido pSOM11-3. Una
mezcla de 5 microgramos de ADN de pSOM11 y 5 microgramos de
ADN de λ plac⁵ se digirió con EcoRI (10 unidades durante 30
minutos a 37°C.). La digestión de la endonucleasa de res
25 tricción terminó por extracción con fenol-cloroformo. Des
pues el ADN se precipitó con etanol y se resuspendió en un
estabilizador de ADN-ligasa T4 (50 microlitros). La ADN-li
gasa T4 (una unidad) se añadió a la mezcla y se incubó a
12°C. durante 12 horas. La mezcla ligada se dializó contra
10 mM de Tris-HCl de pH 7,6 y se usó para transformar el E.
30 coli de la cepa RRI. Los transformantes se seleccionaron en

1 ra Ap^r en placas de X-gal que contenían ampicilina y se se
leccionaron para la producción de β -galactosidasa constitu
tiva. Aproximadamente el 2 por ciento de las colonias eran
5 azules (pSOM11-1, 11-2 etc.). El análisis de la enzima de
restricción del ADN de plásmido que se obtiene de estos clo
nos reveló que todos los plásmidos llevaban un nuevo frag-
mento de EcoRI de aproximadamente 4,4 megadaltones, que
contiene los sitios de control del operon lac y la mayoría
10 dos orientaciones del fragmento de EcoRI, se utilizó la ubi
cación asimétrica del sitio de restricción de HindIII, para
determinar cual de las colonias llevaba este fragmento de
EcoRI con transcripción de lac que continuaba hacia el gen
de somatostatina. Las digestiones dobles de HindIII-BamHI,
15 indicaron que solamente los plásmidos pSOM11-3, pSOM11-5,
pSOM11-6 y pSOM11-7 llevaban clones contenían el fragmento
de EcoRI en esta orientación.

4. ENSAYO RADIOINMUNE PARA ACTIVIDA DE LA SOMATOSTATINA

20 Los ensayos radioinmunes normales (RIA) pa
ra la somatostatina, (A. Arimura y otros, Proc. Soc. Exp.
Biol. Med. 148, 784 (1975)) se modificaron disminuyendo el
volumen del ensayo y usando un estabilizador de fosfato.
La somatostatina Tyr¹¹ se yodó usando un procedimiento de
cloramina T (Id.). Para ensayar la somatostatina, la mues-
25 tra usualmente en ácido fórmico al 70 por ciento, que con-
tiene 5 miligramos por mililitro de bromuro de cianógeno,
se secó en un tubo de polipropileno cónico (0,7 mililitros,
de Sarstedt) a través de KOH húmedo a vacío. Se añadieron
30 20 ml del estabilizador de PBSA (75 mM de NaCl; 75 mM de
fosfato de sodio, de pH 7,2; 1 miligramo/mililitro de al-

1 búmina de suero bovino; y 0,2 miligramos por mililitro de
azida de sodio) seguidos por 40 microlitros de un "cocktail"
de somatostatina [^{125}I] y 20 microlitros de una dilución
5 a 1.000 veces en PBSA de suero inmune a la antisomatostati-
na del conejo S39 (Vale y otros, Metabolism 25, 1491 (1976).
El cocktail de somatostatina [^{125}I] contenía, por milili-
tro del estabilizador de PBSA: 250 microgramos de γ -globu-
lina de conejo normal (Antibodies, Inc.), 1500 unidades de
un inhibidor de proteasa ("Trasyol", Calbiochem) y aproxi-
10 madamente 100.000 cuentas de [^{125}I]-Tyr¹¹-somatostatina.
Después de dejarse reposar por lo menos durante 16 horas a
temperatura ambiente, se añadieron a los tubos de muestra
0,333 mililitros de γ -globulina de anti-conejo de cabra
(Antibodies, Inc., P=0,03) en un estabilizador de PBSA. La
15 mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C. se enfrió hasta 5°C.
y después se centrifugó a 10.000 X-g durante 5 minutos. El
líquido sobrenadante se separó y los gránulos se contaron
en un contador γ . Con la cantidad de antisuero utilizada,
el 20 por ciento de las cuentas se precipitó sin somatosta-
20 tina de competencia no marcada. El antecedente con somatos-
tatina infinita (200 ng) era usualmente de 3 por ciento. Se
obtuvo la mitad de la competencia máxima con 10 pg de soma-
tostatina. Los experimentos iniciales con extractos de E.
coli cepa RRL (la cepa receptora) indicaron que podían de-
25 tectarse menos de 10 pg de somatostatina fácilmente en pre-
sencia de 16 microgramos o más de la proteína bacteriana
tratada con bromuro de cianógeno. Más de 2 microgramos de
proteína de los extractos bacterianos tratados con ácido
fórmico interfirieron hasta cierto grado aumentando los ante-
30 cedentes, pero la ruptura con bromuro de cianógeno redujo

1 grandemente esta interferencia. Los experimentos de recons-
trucción mostraron que la somatostatina es estable en los
extractos tratados con bromuro de cianógeno.

5 A. Competencia por Extractos Bacterianos

Las cepas E. coli RRL (pSOM11-5) y E. coli
RRL (pSOM11-4), se desarrollaron a 37°C. hasta 5×10^8 cé-
lulas por mililitro de caldo de Luria. Luego se añadió IPTG
a un milimol y el crecimiento se continuó durante 2 horas.
Se centrifugaron alícuotas de un mililitro durante unos cuan-
tos segundos en una centrífuga de Eppendorf y los gránulos
se suspendieron en 500 microlitros de ácido fórmico al 70
por ciento que contenía 5 miligramos por mililitro de bro-
muro de cianógeno. Después de aproximadamente 24 horas a
temperatura ambiente, las alícuotas se diluyeron 10 veces
en agua y los volúmenes indicados en la Figura 6A se ensa-
yaron en triplicado para determinar la somatostatina. En la
Figura 6A, "B/B₀" es la relación de la somatostatina
 $\sqrt[125]{1.7}$ enlazada en presencia de la muestra a la enlazada
en ausencia de somatostatina de competencia. Cada punto es
el promedio de tubos triplicados. Se determinó el contenido
de proteína de las muestras no diluidas siendo de 2,2 mili-
gramos por mililitro para E. coli RRL (pSOM11-5) y de 1,5
miligramos por mililitro para E. coli RRL (pSOM-4).

25 B. La Selección Inicial de Clonos de pSOM11 para la
Somatostatina

Los extractos tratados con bromuro de cia-
nógeno de 11 clonos (pSOM11-2, pSOM11-3, etc.) se elabora-
ron tal y como se describe anteriormente para el caso de
la Figura 6A. Se tomaron 30 ml de cada extracto por tripli-
cado para el ensayo radioinmune, cuyos resultados aparecen

1 de la Figura 6B. Se indica la escala de puntos de ensayo. Se leyeron los valores para picogramos de somatostatina en una curva patrón que se obtiene como parte del mismo experimento.

5 Los resultados del ensayo radioinmune descritos hasta ahora pueden resumirse de la siguiente manera. En contraste con los resultados de los experimentos con pSOM1, se encontró que cuatro clones (pSOM11-3, 11-5, 11-6, y 11-7) tenían actividad radioinmune de somatostatina fácilmente detectable, Figuras 6A y 6B. El análisis del fragmento de restricción reveló que pSOM11-3, pSOM11-5, pSOM11-6 y pSOM11-7 tenían la orientación deseada del operón lac, mientras que pSOM11-2 y 11-4 tenían la orientación opuesta. Por lo tanto, hay una correlación perfecta entre la orientación correcta del operón lac y la producción de la actividad radioinmune de somatostatina.

15 C. Efectos de la Inducción de IPTG y Separación de CNBr
en Clonos Positivo y Negativo

20 El diseño del plásmido de somatostatina predice que la síntesis de la somatostatina varía bajo el control del operón lac. El gen represor lac no se incluye en el plásmido y la cepa receptora (E. coli RR1) contiene el gen represor lac cromosomal del tipo vírgen o rústico que produce solamente de 10 a 20 moléculas represoras por célula (15). El número de copia del plásmido (y por lo tanto el número de los operadores lac) es de aproximadamente 20 a 30 por célula, de manera que es imposible una represión completa. Como se muestra en la Tabla III, infra la actividad específica de la somatostatina en el E. coli RR1 (pSOM11-3) se aumentó mediante IPTG, un inductor del operón lac. Como

25

30

1 era de esperar, el nivel de inducción fue bajo, variando
de 2,4 a 7 veces. En el experimento 7 (Tabla III) la α -ac-
tividad, una medida de los 92 primeros aminoácidos de β -ga-
lactosidasa, también se indujo mediante un factor de dos.
5 En varios experimentos la actividad radioinmune de somatos-
tatina no detectable podía detectarse antes de la ruptura
con bromuro de cianógeno de la proteína celular total. Pues-
to que el antisuero usado en el ensayo radioinmune S 39 re-
quiere una alanina N-terminal libre, no cabía esperar acti-
10 vidad antes de la ruptura con bromuro de cianógeno.

TABLA III

Actividad Específica Radioinmune de Somatostatina

15 Abreviaciones: caldo de Luria, LB; isopropiltiogalactósido,
IPTG; bromuro de cianógeno CNBr; somatostatina, SS.

La proteína se midió mediante el método de Bradford, Anal.
Bioche 72, 248 (1976).

Número de Ex- perimen- to	Cepa	Medio	IPTG 1 mi- li- mol	CNBr 5 mili- gramos por mi- lilitro	pg SS/microgramos proteína	
20	1	11-2	LB	+	+	< 0,1
		11-3	LB	+	+	12
		11-4	LB	+	+	< 0,4
		11-5	LB	+	+	15
	25	2	11-3	LB	+	+
		11-3	LB	+	-	< 0,1
		11-3	LB	+	+	61
30	3	11-3	LB	-	+	8
		11-3	LB	+	-	< 0,1
	4	11-3	LB	+	+	71

1 TABLA III (continuación)

Número de Experimento	Cepa	Medio	IPTG 1 milimol	CNBr 5 miligramos por mililitro	Pg SS/microgramos proteína
5	11-3	VB + glicerol *	+	+	62
5	11-3	LB + glicerol	+	+	250
6	11-3	LB	+	+	320
	11-2	LB	+	+	0,1
7	11-3	LB	+	+	24
10	11-3	LB	-	+	10

* Medio mínimo de Vogel-Bonner más glicerol

D. Filtración de Gel del Bromuro de Cianógeno -
Extractos Tratados

15

20

25

30

El ácido fórmico y los extractos tratados con cianógeno de los clones positivos (pSOM 11-3, 11-5, 11-6 y 11-7) se recogieron (volumen total 250 microlitros), se secaron y se resuspendieron en 0,1 mililitro de ácido acético al 50 por ciento. Se añadió γ - ^3H leucina y la muestra se aplicó a una columna de 0,7 x 47 centímetro de Sphadex G.50 en ácido acético al 50 por ciento. Se ensayaron ali-
cuotas de cincuenta microlitros de las fracciones de la columna para determinar la somatostatina. Los extractos de clono negativos recogidos (11-2, 11-4, y 11-11) se trataron idénticamente. Los resultados aparecen de la Figura 6C. En la misma columna se eluye la somatostatina conocida (Beckman Corp.) tal y como se indica (SS). En este sistema la somatostatina se separó bien de los péptidos grandes excluidos y de las moléculas pequeñas completamente incluidas. Solamen-

1 te los extractos de los clones positivos para la somatos-
tatina exhibieron actividad radioinmune en las fracciones
de la columna y esta actividad de eluye en la misma posi-
ción que la somatostatina químicamente sintetizada.

5 RESUMEN DE LA INFORMACION DE LA ACTIVIDAD

Los datos que establecen la síntesis de un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de somatostatina se resumen de la siguiente manera: (1) la actividad radioinmune de somatostatina está presente en las células de E. coli que tienen el plásmido pSOM11-3, que contiene un gen de somatostatina de secuencia correcta demostrada y tienen la orientación correcta del fragmento de DAN de ecoRI lac. Las células con el plásmido pSOM11-2 relacionado, que tiene el mismo gen de somatostatina pero una orientación opuesta del fragmento de EcoRI lac producen actividades de somatostatina no detectables; (2) como se predijo mediante el programa de diseño, no se observa actividad radioinmune de somatostatina detectable hasta después del tratamiento con bromuro de cianógeno del extracto de la célula; (3) la actividad de somatostatina está bajo el control del operón lac tal y como se demuestra mediante la inducción por IPTG, un inductor del operón lac; (4) la actividad de somatostatina co-cromatografía con somatostatina conocida en Sephadex G-50; (5) La secuencia de ADN del gen de somatostatina clonado es correcta. Si la traducción está fuera de fase, se elaborará un péptido que es diferente de la somatostatina en cada posición. Se detecta actividad radioinmune que indica que se elabora un péptido estrechamente relacionado con la somatostatina y la traducción debe estar en fase. Puesto que la traducción ocurre en fase, el có-

1 digo genético requiere que se elabore un péptido con una se-
cuencia exacta a la de la somatostatina; (6) Finalmente, las
muestras del extracto de E. coli RRI (pSOM11-3) inhiben la
liberación de la hormona de crecimiento de las células pi-
5 tuitarias de la rata mientras que las muestras de E. coli
RRI (pSOM11-2) preparadas en paralelo y con una concentra-
ción de proteína idéntica, no tienen efecto en la libera-
ción de la hormona de crecimiento.

10 ESTABILIDAD, RENDIMIENTO Y PURIFICACION
DE LA SOMATOSTATINA

15 Las cepas que llevan el fragmento del ope-
rón lac EcoRI (pSOM11-2, pSOM11-3, etc.) se separan con res-
pecto al fenotipo del plásmido. Por ejemplo, después de apro-
ximadamente 15 generaciones, aproximadamente la mitad del
cultivo de E. coli RRI (pSOM11-3) era constitutivo para la
beta-galactosidasa, es decir, llevaba el operador lac y de
éstas aproximadamente la mitad eran resistentes a la ampi-
cilina. Las cepas positiva (pSOM11-3) y negativa (pSOM11-2)
20 para la somatostatina eran inestables, y por lo tanto, la
desventaja del crecimiento procede supuestamente de la sobre-
producción de la galactosidasa grande pero incompleta e inac-
tiva. El rendimiento de somatostatina varió entre 0,001 a
0,03 por ciento de la proteína celular total (Tabla 1) proba-
blemente como resultado de la selección de células en el cul-
25 tivo que tengan plásmidos con una región lac suprimida. Se
han obtenido los rendimientos más elevados de somatostatina
en preparaciones donde el crecimiento se inició a partir de
una sola colonia constitutiva resistente a la ampicilina.
30 Aún en estos casos, el 30 por ciento de las células al cose-
charse tenían supresiones de la región lac. El almacenarlas

1 to en estado congelado (liofilización) y el crecimiento
hasta cosecharse a partir de una sola de estas colonias se
indica correspondientemente para el sistema descrito. Los
rendimientos pueden aumentarse, v. gr., recurriendo a las
5 cepas bacterianas que sobreproducen el represor lac de tal
manera que la expresión de la proteína precursora se reprime
esencialmente casi de manera total antes de la inducción
y cosecha. Alternativamente, como se ha discutido anterior-
mente, puede emplearse un sistema de triptofano u otro ope-
10 rador-promotor que por lo general se reprime totalmente.

En el extracto crudo resultante de la rotura de las células, v. gr., en una Prensa Eaton, es insoluble la proteína precursora de somatostatina - β -galactosidasa y se encuentra en el primer gránulo de centrifugación de
15 baja velocidad. La actividad puede solubilizarse en ácido fórmico al 70 por ciento, hidrocioruro de guanidina 6M o dodecilsulfato de sodio al 2 por ciento. De preferencia, sin embargo, el extracto crudo de la Prensa Eaton se extrae con urea 8M y el residuo se rompe con bromuro de cianógeno.
20 En los experimentos iniciales, la actividad de la somatostatina derivada de E. Coli cepa RRI (pSOM 11-3) se había enriquecido hasta aproximadamente 100 veces por extracción con alcohol del producto de ruptura y cromatografía en Sephadex G-50 en ácido acético al 50 por ciento. Cuando el
25 producto se cromatografía, de nuevo en Sephadex G-50 y se sometió después a cromatografía de líquido de alta presión, se pudo obtener una somatostatina esencialmente pura.

II. INSULINA HUMANA

30 Las técnicas anteriormente descritas se aplica

1 ron después a la producción de insulina humana. Por lo tan-
to, se designaron los genes para cadena B de la insulina
(104 pares de bases) y para la cadena A de la insulina (77
5 pares de bases) de la secuencia de aminoácidos de los poli-
péptidos humanos, cada uno con terminales cohesivos de una
sola hebra para las endonucleasas de restricción EcoRI y
BamHI y cada uno se designó para inserción separadamente
en los plásmidos pBR322. Los fragmentos sintéticos, los
deca- y pentadeca-nucleótidos, se sintetizaron mediante el
10 método de fosfotriéster de bloque usando trinucleótidos co-
mo bloques de construcción y se purificaron finalmente por
cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los genes sin-
téticos de las cadenas A y B de la insulina humana se some-
tieron después a clonación separadamente en el plásmido
15 pBR322. Los genes sintéticos clonados se unieron después en
un gen de β -galactasidasa de E. Coli como anteriormente pa-
ra proporcionar transcripción, traducción eficiente y una
proteína precursora estable. Los péptidos de la insulina se
separaron del precursor de β -galactasidasa, se detectaron
20 mediante ensayo radioinmune y se purificaron. Se generó des-
pués la actividad de ensayo radioinmune de la insulina mez-
clando los productos de E. Coli.

1. Diseño y Síntesis de los Genes de la Insulina Humana

25 Los genes contruidos para la insulina huma-
na se ilustran en la Figura 9. Se designaron los genes para
la cadena A y la cadena B de la insulina humana, para las
secuencias de aminoácidos de los polipéptidos humanos. Los
extremos 5' de cada gen tenían un solo terminal cohesivo de
30 una sola hebra para las endonucleasas de restricción EcoRI

1 y BamHI, para la inserción correcta de cada gen en el plásmi
do pBR322. Se incorporó un sitio de reconocimiento de endo-
nucleasa HindIII en la mitad del gen de la cadena B para la
5 secuencia de aminoácidos Glu-Ala para permitir la amplifica
ción y verificación de cada mitad del gen separadamente an-
tes de la construcción de todo el gen de la cadena B. Se de-
signaron genes de la cadena B y de la cadena A para cons-
truirlos a partir de 29 oligodesoxirribonucleótidos diferen-
tes, variando de decámeros a pentadecámeros. Cada flecha in-
10 dica el fragmento sintetizado mediante el método de fosfo-
tríéster mejorado, H1 a H8 y B1 a B12 para el gen de la ca-
dena B y A1 a A11 para el gen de la cadena A.

2. Síntesis Química de los oligodesoxirribonucleótidos

15 Los materiales y métodos para la síntesis de los
oligodesoxirribonucleótidos eran esencialmente iguales a los
descritos en el artículo de K. Itakura y otros (1975) J.
Biol. Chem. 250, 4592 y de K. Itakura y otros (1975) J. Amer
Chem. Soc. 97, 7327 excepto estas modificaciones:

20 a) Los nucleótidos completamente protegidos, los
fosfatos de 5'-O-dimetoxitritil-3'-p-clorofenil- β -ciano-
etilo se sintetizaron a partir de los derivados de nucleó-
sido usando como agente de fosforilación monofuncional el
fosforocloridrato de p-clorofenil- β -cianoetilo (equivalen-
te molar de 1,5) en acetonitrilo en presencia de 1-metil
25 imidazol, de J.H. Van Boom, y otros (1975) Tetrahedron 31,
2953. Los productos se aislaron a gran escala (de 100 a 300
gramos) mediante cromatografía líquida preparativa (Prep
500 LC. Waters Associates).

30 b) Usando el método de extracción por disol-

1 vente [T. Hirose, y otros (1978) Tetrahedron Letters,
2449] se sintetizaron 32 trómeros bifuncionales (véase el
Cuadro IV) en una escala de 5 a 10 milimoles y 13 trómeros
3 tetrámeros y 4 dímeros en los bloques terminales 3' a es-
5 cala de un milimol. La homogeneidad de los trómeros comple-
tamente protegidos se comprobó mediante cromatografía de
capa fina sobre gel de sílice en dos sistemas de disolven-
tes de metanol/cloroformo disolvente (a) 5 por ciento en
10 volumen/volumen y disolvente (b) 10 por ciento en volumen/
volumen (véase la Tabla IV). Partiendo de estos compuestos,
se sintetizaron 29 oligodesoxirribonucleótidos de secuen-
cia definida, 18 para el gen de la cadena B y 11 para el
gen de la cadena A.

15 Las unidades básicas usadas para construir
los polinucleótidos eran dos tipos de bloque de trómero,
es decir, los bloques de trómero bifuncionales de la Tabla
IV y los trómeros de terminales 3' correspondientemente
protegidos mediante un grupo anisilo en 3'-hidroxi. El
trómero bifuncional se hidrolizó en el componente de 3'-fos-
20 fodiéster correspondiente con una mezcla de piridina-trieti-
lamina-agua (3:1:1 volumen/volumen) y también en el compo-
nente de 5'-hidroxilo correspondiente con ácido bencensul-
fónico al 2 por ciento. El bloque terminal 3' al cual se
ha hecho referencia anteriormente, se trató con ácido ben-
25 censulfónico al 2 por ciento para proporcionar el 5' hidro-
xilo correspondiente. La reacción de copulación de un ex-
ceso del trómero de 3'-fosfodiéster (equivalente molar de
1,5) con el componente de 5'-hidroxilo, sin embargo, obte-
nido (un equivalente molar) en presencia de 2,4,6-triisopro-
30 pilbencensulfonil tetrazolida (TPSTe, de 3 a 4 equivalen-

1 tes) se completó casi en 3 horas. Para separar el exceso
 de reactivo del bloque de 3'-fosfodiéster, la mezcla de reac-
 ción pasó a través de una columna de gel de sílice corta
 5 colocada en un filtro de vidrio calcinado. La columna se
 lavó primero con CHCl_3 para eludir alguno de los productos
 secundarios y el reactivo de copulación, y luego con CHCl_3 :
 MeOH (95:5 en volumen/volumen) con lo que se eluyó casi to-
 do el oligómero completamente protegido. En estas condi-
 ciones el reactivo de bloque de 3'-fosfodiéster cargado
 10 permaneció en la columna. De manera semejante, se repitieron
 las copulaciones de bloque hasta que se obtuvo la lon-
 gitud deseada.

TABLA IV

SINTESIS DE BLOQUES DE CONSTRUCCION DE TRIMERO

No.	Compues- to *	Rendi- miento ** (%)	Rf		Pureza*** (%)	En la Figura 9, presente en:
			a.	b.		
1.	AAG	47	0,15	0,40	93	B5, B6
2.	AAT	49	0,25	0,52	95	H1, A1, A6
20 3.	AAC	52	0,28	0,55	93	H5, B6, A2, A8
4.	ACT	43	0,27	0,53	91	B4, B5, A6
5.	ACC	56	0,33	0,60	96	B7
6.	ACG	39	0,18	0,45	90	H5, B7
7.	AGG	45	0,10	0,26	89	H6, H7, B9
25 8.	AGT	33	0,14	0,40	96	B9, A2, A11
9.	AGC	50	0,19	0,48	92	H8, B1, A5, A10
10.	AGA	48	0,24	0,50	91	A9,
11.	TTC	44	0,26	0,52	95	B4, B7, A3
12.	TTC	49	0,11	0,31	94	H3, H5, A2, A3, A5
30 13.	TCTT	58	0,24	0,49	96	A4

1 TABLA IV (continuación)

No.	Com- puesto *	Rendi- miento ** (%)	Rf		Pureza*** (%)	En la Figura 9, presente en:
			a.	b.		
5 14.	TCA	45	0,28	0,55	92	H1, H2, H4, A1
15.	TCG	39	0,12	0,34	91	A2
16.	TGC	32	0,10	0,28	87	H3, A1, A10
17.	TGC	51	0,18	0,47	93	H6, B2, A4, A7, A8
18.	TGA	46	0,12	0,37	94	H7
10 19.	TAC	61	0,22	0,50	90	B4, A11
20.	TAA	55	0,17	0,44	95	B5, A10
21.	CCT	53	0,30	0,55	97	H3, H4, B10
22.	CAC	47	0,25	0,51	92	A3
23.	CAA	58	0,25	0,51	93	H2, H6, H8, A7
15 24.	CTT	41	0,28	0,54	92	B2, B9, A4
25.	CGA	40	0,27	0,52	93	A7
26.	CGT	75	0,25	0,50	89	H2, H4, B3, B1
27.	GGT	35	0,09	0,26	90	B3
28.	GTT	46	0,18	0,45	93	B2
20 29.	GTA	38	0,25	0,50	95	B6, B8, A6
30.	GAA	39	0,15	0,39	88	H7, B3, B8, A5
31.	GAT	52	0,22	0,49	89	B10, A9
32.	GCA	42	0,14	0,39	93	A9

25

* Tridesoxinucleótidos completamente protegidos; fosfato de 5'-O-(9-dimetoxitritil-3'-p-clorofenil-β)-cianoetilo

** El rendimiento fue el rendimiento total calculado de los monómeros de 5'-hidroxilo.

*** Basado en el análisis de HPLC.

30

Se usó cromatografía de líquido de alta presión (HPLC) extensamente durante la síntesis del oligonu

1 cleótido para a) el análisis de cada bloque de trímero y te
trámero, b) el análisis de los fragmentos intermedios (hexá
5 meros, monámeros y decámeros), c) análisis de la última reac
ción de copulación y d) purificación de los productos fina-
les. El HPLC se realizó usando un cromatógrafo de líquido
Spectra-Physios 3500B. Después de la separación de todos
los grupos protectores con NH₄OH concentrado a 50°C. (6 ho-
ras) y 80 por ciento de AcOH a temperatura ambiente (15 mi-
10 nutos), los compuestos se analizaron en una Permaphase AAX
(DuPont) [J. Van Boom y otros (1977) J. Chromatography 131,
169.] columna (1 mX 2 milímetros), usando un gradiente li-
neal del disolvente B (KH₂PO₄ 0,05M, KCl 1,0M, pH de 4,5)
en el disolvente A (KH₂PO₄ 0,01M, pH de 4,5). El gradiente
se formó comenzando con un tampón A y aplicando 3 por ciento
15 del tampón B por minuto. La elución se realizó a 60°C. con
un régimen de flujo de 2 mililitros por minuto. La purifi-
cación de los 29 oligonucleótidos finales se llevó a cabo
en Permaphase AAX, en las mismas condiciones dadas a cono-
cer anteriormente. La cresta deseada se recogió, se preci-
20 pitó con sal mediante diálisis y se liofilizó. Después de
irradiarse los terminales 5' con (γ -³²P)ATP usando poli-
nucleótido-quinasa T₄, se comprobó la homogeneidad de cada
oligonucleótido por electroforesis en un gel de poliacrila-
mida al 20 por ciento.

25 3. Armado y Clonación del Gen de la Cadena B y del Gen de
la Cadena A

Se diseñó el gen para la cadena B de la in-
sulina de modo que tuviera un sitio de restricción EcoRI
30 en el extremo izquierdo, un sitio HindIII a la mitad y un
sitio BamHI en el extremo derecho. Esto se efectúa a fin

1 de que ambas mitades, la mitad izquierda EcoRI HindIII
(BH) y la mitad derecha HindIII-BamHI (BB), puedan clonar-
se separadamente en un vehículo de clonación conveniente
pBR322 y después de que sus secuencias se hayan verificado,
5 unirse para proporcionar el gen completo B (Figura 10). La
mitad BB se armó mediante unión de 10 oligodesoxirribonu-
cleótidos representados por B1 a B10 en la Figura 9, que
se elaboraron mediante síntesis química de fosfotriéster.
B1 y B10 no se fosforilaron eliminando de esta manera la
10 polimerización indeseada de estos fragmentos a través de
sus extremos cohesivos (HindIII y BamHI). Después de la pu-
rificación por electroforesis de gel de acrilamida prepa-
rativa y elución de la banda mayor de ADN, el fragmento BB
se insertó en el plásmido pBR322 que se había separado con
15 HindIII y BamHI. Aproximadamente el 50 por ciento de las
colonias resistentes a la ampicilina derivadas de DNA eran
sensibles a la tetraciclina, indicando que se había inser-
tado un fragmento de HindIII-BamHI no plásmido. Los peque-
ños fragmentos de HindIII-BamHI de cuatro de estas colo-
20 nias (pBB101 a pBB104) se secuenciaron encontrándose que
eran correctas tal y como se habían diseñado.

El fragmento de BH se preparó de manera se-
mejante y se insertó en el pBR322 que se había roto con en-
donucleasas de restricción EcoRI y HindIII. Después se ana-
25 lizaron los plásmidos de tres transformantes resistentes
a la ampicilina sensibles a la tetraciclina (pBH1 a pBH3).
Se encontró que los fragmentos pequeños de EcoRI-HindIII
tenían la secuencia de nucleótido esperada.

30 El gen de la cadena A se armó en tres par-
tes. Los cuatro nucleótidos izquierdos, cuatro intermedios

1 y cuatro derechos (véase la Figura 9) se unieron separada-
mente y después se mezclaron y se unieron (los oligonucleó-
2 tidos A1 a A12 no se habían fosforilado). El gen de la ca-
dena A armado se fosforiló, se purificó mediante electrofo-
5 resis de gel y se sometió a clonación en pBR322 en los si-
tios EcoRI-BamHI. Los fragmentos de EcoRI-BamHI de dos clo-
nos resistentes a la ampicilina, pero sensibles a la tetra-
ciclina (pA10, pA11), contenían la secuencia del gen A de-
seado.

10 4. Construcción de Plásmidos para la Expresión de Genes de
Insulina A y B

La figura 10 ilustra la construcción del
plásmido lac de insulina B (pIB1). Los plásmidos pBH1 y
pBB101 se digirieron con endonucleasas EcoRI y HindIII. El
15 fragmento BH pequeño de pBH1 y el fragmento grande pBB101
(que contiene el fragmento BB y la mayoría de pBR322) se
purificaron por electroforesis de gel, se mezclaron y se
unieron en presencia de EcoRI-separado λ plac 5. El frag-
mento de EcoRI de λ plac 5 contiene la región de control
20 lac y la mayoría del gen estructural de β -galactosidasa.
La configuración de los sitios de restricción asegura la
unión correcta de BH en BB. El fragmento lac EcoRI puede
insertarse en dos orientaciones; de esta manera, sólo la
mitad de los clones obtenidos después de la transformación
25 pueden tener la orientación deseada. Se comprobó la orien-
tación de diez clones constitutivos resistentes a la penici-
lina de β -galactosidasa mediante análisis de restricción.
Cinco de estas colonias contenían toda la secuencia del gen
B y la lectura correcta del gen de β -galactosidasa en el
30 gen de la cadena B. Uno, pIB1 se seleccionó para experimen-

1 tos subsiguientes.

 En un experimento semejante, el fragmento
8 lac de 4,4 megadalton de λ plac5 se introdujo en el plásmi
do pAll en el sitio EcoRI para proporcionar pIAL. El pIAL
es idéntico al pIBI con la excepción de que el fragmento
del gen A se substituye por el fragmento del gen B. El aná
lisis de secuencia DNA demostró que se mantuvieron las se-
cuencias correctas del gen de las cadenas A y B en pIAL y
pIBI, respectivamente.

10 5. Expresión

 Las cepas que contienen los genes de insu-
lina fijados correctamente en la β -galactosidasa producen
grandes cantidades de una proteína del tamaño de la β -ga-
lactosidasa. Aproximadamente el 20 por ciento de la proteí-
na celular total era este híbrido de β -galactosidasa-insu-
15 lina de cadena A o B. Las proteínas híbridas son insolubles
y se encontraron en el primer gránulo de centrifugación de
baja velocidad que constituía aproximadamente el 50 por
ciento de la proteína.

20 Para detectar la expresión de las cadenas
A y B de insulina se usó un ensayo radioinmune (RIA) basa-
do en la reconstitución de la insulina completa de las ca-
denas separadas. El procedimiento reconstitución de insuli-
na de Katsoyannis y otros (1967) Biochemistry 6, 2642-
25 2655, adaptado a un volúmen de ensayo de 27 microlitros,
proporciona un ensayo muy apropiado. Se obtiene actividad
de insulina fácilmente detectable después de mezclar y re-
constituir los derivados S-Sulfonados de las cadenas de in-
sulina. Las cadenas de insulina S-Sulfonadas separadas no
30 reaccionan significativamente después de la reducción y

1 oxidación con el anticuerpo de anti-insulina usado.

Para usar el ensayo de reconstitución, se purificó parcialmente la proteína híbrida de β -galactosidasa de cadena A o B, se rompió con bromuro de cianógeno y se
5 formaron los derivados S-sulfonados.

La evidencia de que hemos obtenido la expresión correcta de los genes químicamente sintetizados para la insulina humana, puede resumirse de la siguiente manera:
a) Se ha detectado actividad radioinmune para ambas cadenas.
10 b) Se han verificado directamente las secuencias de ADN obtenidas después de la clonación y construcción del plásmido, siendo correctas tal y como se diseñaron. Puesto que se obtiene actividad radioinmune, la traducción debe quedar en fase. Por lo tanto, el código genético ordena que se produzcan péptidos con las secuencias de insulina humana. c)
15 Los productos de E. coli, después de la ruptura con bromuro de cianógeno, se comportan como cadenas de insulina en tres sistemas cromatográficos diferentes que se basan sobre tres principios diferentes (filtración de gel, intercambio de
20 iones y fase HPLC invertida). d) El E. coli producido de cadena A se ha purificado a escala pequeña mediante HPLC y tiene la composición correcta de aminoácidos.

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

25 REIVINDICACIONES:

1.- Mejoras en un procedimiento para la producción de un producto que comprende una codificación de gen estructural para la expresión microbiana de un polipéptido, caracterizadas dichas mejoras porque el gen codifica la expresión de un polipéptido de mamífero o un intermedio del mismo.
30

1 y se unen de tal forma que la mayoría de los codones de dicho gen estructural son codones preferidos para la expresión de los genomas microbianos.

5 2.- Mejoras según la reivindicación 1, caracterizadas porque dicho producto es un vehículo de clonación microbiana recombinante que comprende un primer sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y porque dicho gen se interpone entre dichos sitios.

10 3.- Mejoras según la reivindicación 2, donde dicho polipéptido es una hormona.

4.- Mejoras según la reivindicación 3, donde la hormona es somatostatina.

15 5.- Mejoras según la reivindicación 4, donde los codones para la somatostatina se seleccionan de la siguiente manera:

aminoácido	codon	aminoácido	Codon del grupo que consiste en:
gly	GGT	ala:	GCT y GCG
cys	TGT	asn:	AAT y AAC
20 lys	AAG	phe:	TTC y TTT
trp	TGG	thr:	ACT y ACG
		ser:	TCC y TCG

25 6.- Mejoras según la reivindicación 4, que comprende la secuencia de pares de bases:

GCT GGT TGT AAG AAC TTC TTT TGG AAG ACT TTC ACT TCG TGT
CGA CCA ACA TTC TTG AAG AAA ACC TTC TGA AAG TGA AGC ACA

30 7.- Mejoras según la reivindicación 1, donde dicho producto es una codificación del gen estructural para la expresión microbiana de un polipéptido en donde se preparan una serie de fragmentos de oligodesoxirribonucleótido y se arman mediante:

1 a) preparación de una primera serie de fragmentos de oligodesoxirribonucleótido que, cuando se unen en la secuencia apropiada producen una hebra de codificación de ADN para la secuencia de aminoácidos del polipéptido;

5 b) preparar una segunda serie de fragmentos de oligodesoxirribonucleótido que, cuando se unen en la secuencia apropiada, producen una hebra de codificación;

10 c) efectuar el puente de hidrógeno entre porciones mutuamente complementarias de los fragmentos de la primera y segunda serie para formar una estructura de doble hebra y

d) completar las hebras respectivas mediante unión, cuyas mejoras comprenden:

15 1) el gen resultante codifica la expresión de un polipéptido de mamífero;

2) al menos una mayoría de los codones en la hebra de codificación son los preferidos para la expresión de los genomas microbianos;

20 3) los fragmentos unidos en el paso (c) carecen de complementaridad, uno con respecto al otro, excepto los fragmentos adyacentes uno al otro en el gen estructural.

25 8.- Mejoras según la reivindicación 7, donde los fragmentos se seleccionan de tal manera que la hebra de codificación del gen estructural está inmediatamente precedida por el codon ATG e inmediatamente seguida por uno o más codones de terminación.

30 9.- Mejoras según la reivindicación 8, donde los fragmentos además proporcionan el gen resultante con terminales cohesivos que comprenden una de las dos hebras con un

1 sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción.

10.- Mejoras según la reivindicación 9, donde el polipéptido es una hormona o un intermedio de la misma.

5 11.- Mejoras según la reivindicación 10, donde el polipéptido es somatostatina y donde los codones para los aminoácidos de la somatostatina se seleccionan de la siguiente manera:

Aminoácido	codon	Aminoácido	Codon para el grupo que consiste en:
gly	GGT	ala:	GCT y GCG
cys	TGT	asn:	AAT y AAC
lys	AAG	phe:	TTC y TTT
trp	TGG	thr:	ACT y ACG
		ser:	TCC y TCG

15 12.- Mejoras según la reivindicación 10, donde el polipéptido se selecciona del grupo formado por preproinsulina humana, proinsulina humana, la cadena A de insulina humana, la cadena B de insulina humana, hormona de crecimiento para humanos o bovinos, hormona de leutinización, ACTH
20 y el polipéptido pancreático.

13.- Mejoras según la reivindicación 9, donde los terminales opuestos del gen resultante comprenden una de las dos hebras con sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción diferentes.

25 14.- Mejoras según la reivindicación 9, donde cada uno de los fragmentos contiene aproximadamente de once a dieciseis nucleótidos.

30 15.- Mejoras según la reivindicación 10, donde cada uno de los fragmentos contiene aproximadamente de once a dieciseis nucleótidos.

1

16.- Mejoras según la reivindicación 1, donde el polipéptido se selecciona del grupo formado por proinsulina humana, proinsulina humana y la cadena A de insulina humana, la cadena B de insulina humana, hormona de crecimiento humana o bovina, la hormona de leutinización, ACTH y el polipéptido pancreático.

5

17.- Mejoras según la reivindicación 1, donde el polipéptido es somatostatina.

10

18.- Mejoras según la reivindicación 17, donde los terminales opuestos comprenden una o dos hebras con sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción diferentes.

15

19.- Mejoras según la reivindicación 17, donde los codones para los aminoácidos de la somatostatina se seleccionan de la siguiente manera:

20

aminoácido:	codon	aminoácido	Codon del grupo que consiste en:
gly	GGT	ala:	GCT y GCG
cys	TGT	asn:	AAT y AAC
lys	AAG	phe:	TTC y TTT
trp	TGG	thr:	ACT y ACG
		ser:	TCC y TCG

25

20.- Mejoras según la reivindicación 19, donde el polidesoxirribonucleótido comprende la secuencia de pares de bases.

30

21.- Mejoras según la reivindicación 20, donde el polidesoxirribonucleótido tiene la secuencia de nucleótidos:

[Handwritten signature]

1

5' AA TTC ATG GCT GGT TGT AAG AAC TTC TTT
G TAC CGA CCA ACA TTC TTG AAG AAA

8

TGG AAG ACT TTC ACT TCG TGT TGA TAG
ACC TTC TGA AAG TGA AGC ACA ACT ATC CTAG 5'

10

22.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: MEJORAS EN UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN PRODUCTO QUE COMPRENDE UNA CODIFICACION DEL GEN ESTRUCTURAL PARA LA EXPRESION MICROBIANA DE UN POLIPEPTIDO.

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

15

Madrid, 6 noviembre 1.978
BERNARDO UNGRIA
p.p.

20

25

30

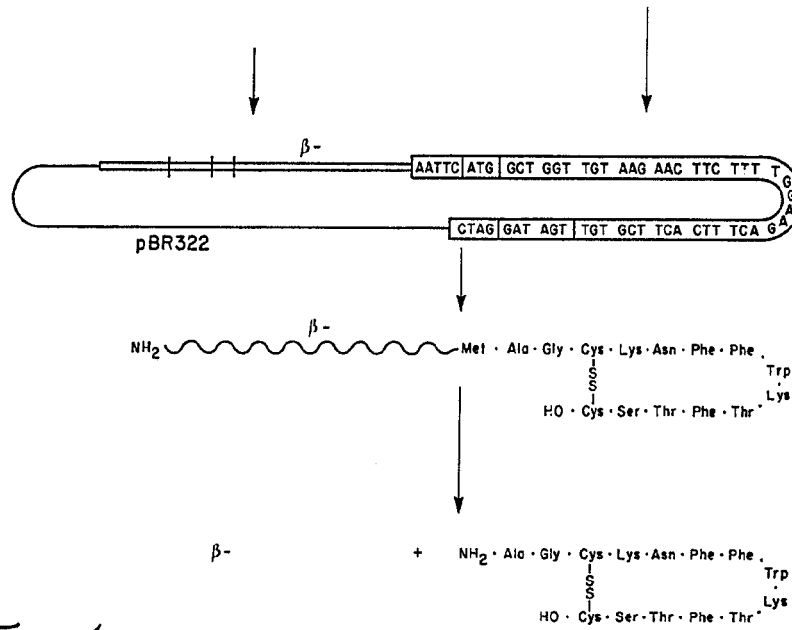


FIG. 1.

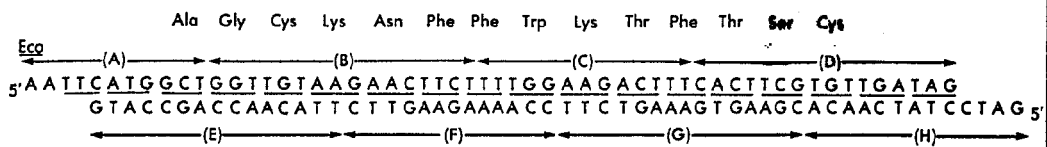


FIG. 2.

ESCALA VARIABLE
 Madrid, 6 noviembre 1.978
 BERNARDO UNGRIA
 p.p.

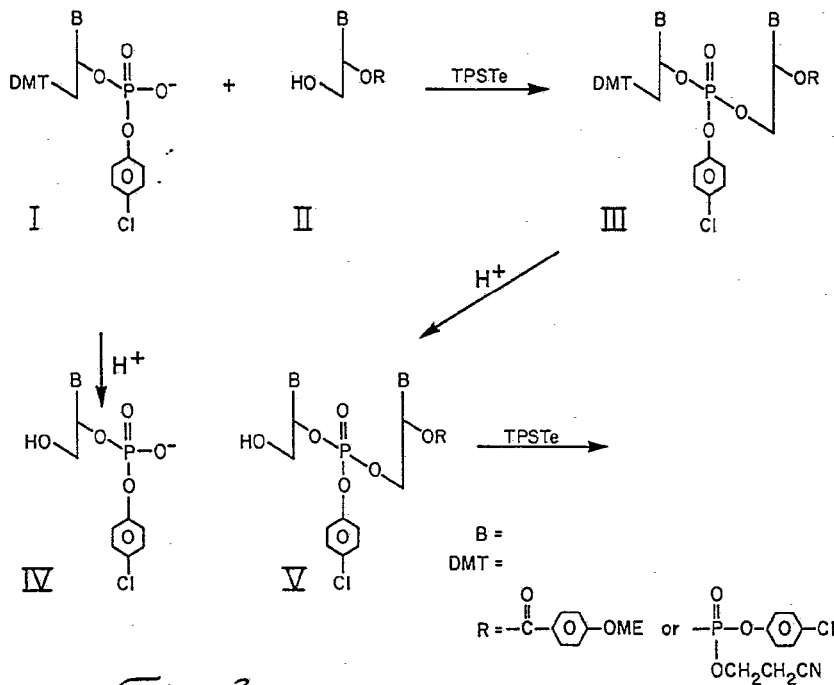
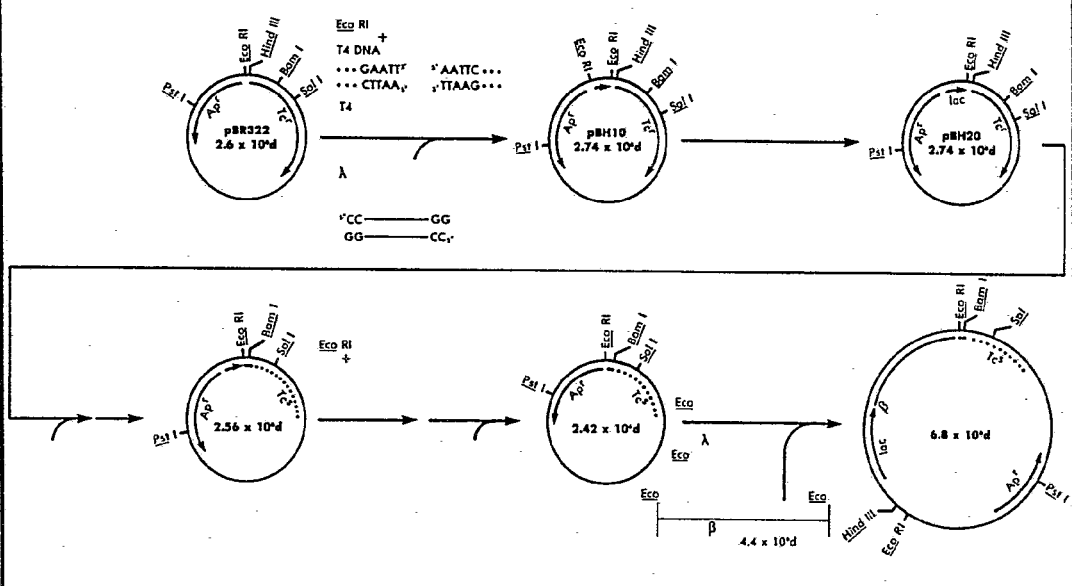


FIG. 3.



ESCALA VARIABLE
 FIG. 4. Madrid, 6 noviembre 1.978
 BERNARDO UNGRIA
 p. p.

FIG. 5A.

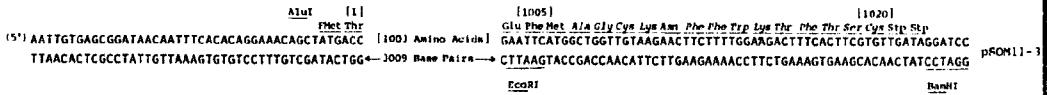
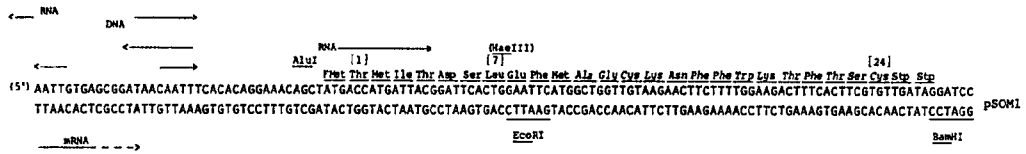


FIG. 5B.

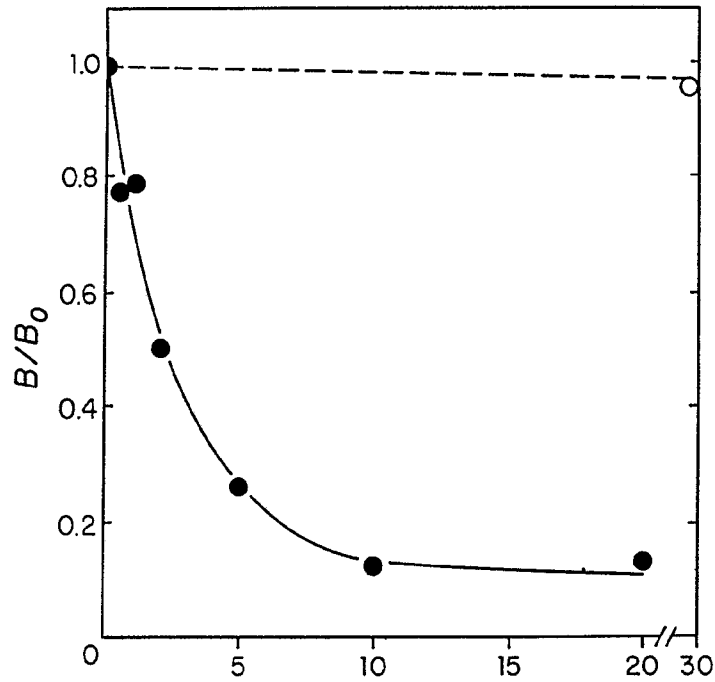


FIG. 6.

ESCALA VARIABLE
 Madrid, 6 noviembre 1978
 BERNARDO UNGRIA
 D.P.

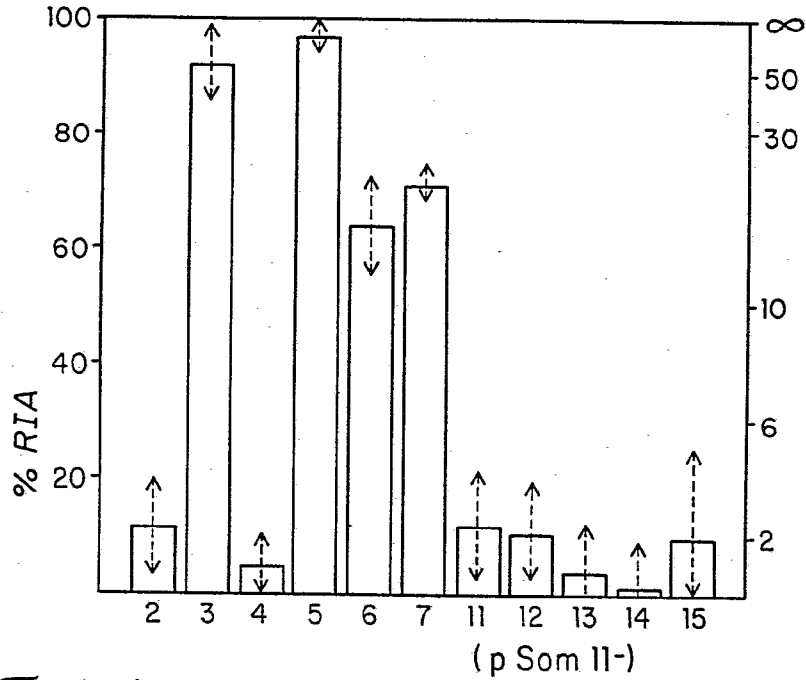


FIG. 7

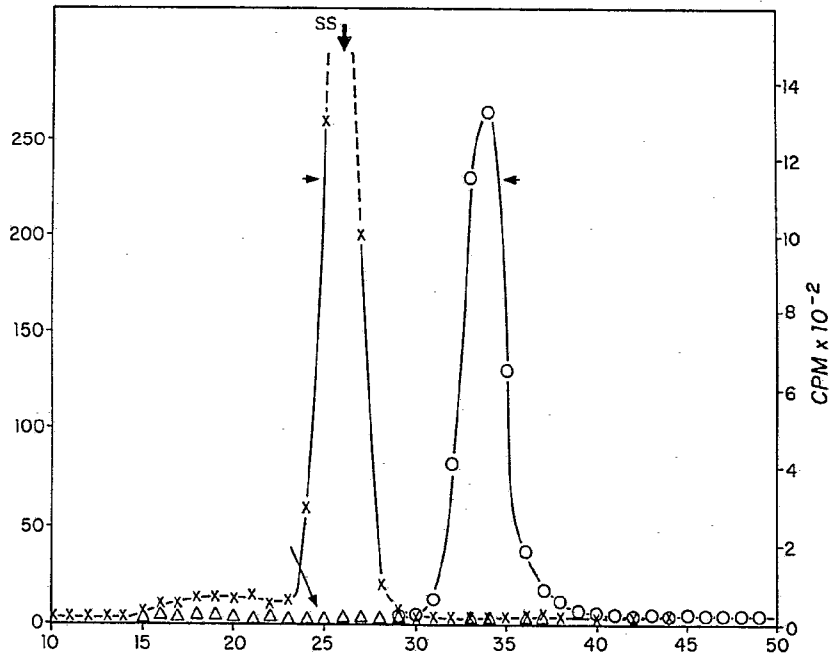


FIG. 8.

ESCALA VARIABLE
Madrid, 6 noviembre 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.D.

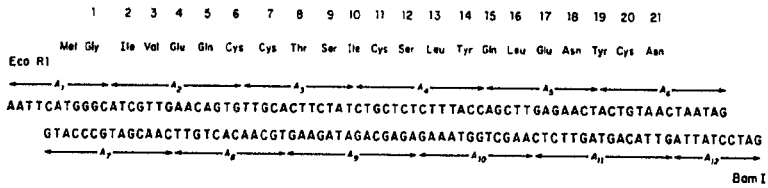
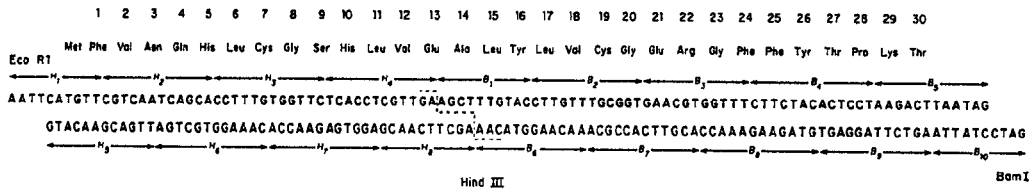


FIG. 9.

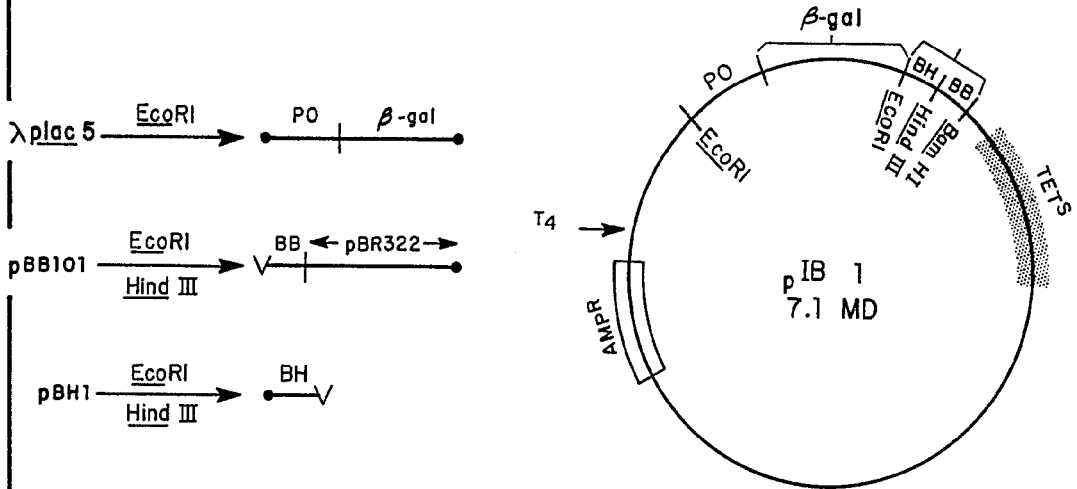


FIG. 10. ESCALA VARIABLE
 Madrid, 6 noviembre 1.978
 BERNARDO UNGRIA

p.p.