



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

250655
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

(22) Přihlášeno 04 07 80
(21) [PV 3457-82]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 05 07 79
(55 126) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 18 09 86

(45) Vydáno 15 07 88

(72)

Autor vynálezu

GOEDEL DAVID V., HEYNEKER HERBERT L., BURLINGAME,
KALIFORNIE (Sp. st. a.)

(73)

Majitel patentu

GENENTECH INC., SAN FRANCISCO, KALIFORNIE (Sp. st. a.)

(54) Způsob pěstování životaschopné kultury mikroorganismu s obsahem
prostředku pro klonování

1

Vynález se týká exprese genů v mikroorganismech.

Genetická exprese

Desoxyribonukleová kyselina obsahuje kód pro bílkovinu, to znamená tak zvaný strukturální gen a současně řídicí oblasti, které zprostředkovávají expresi této informace tak, že vznikají místa pro vazbu RNA polymerázy, místa pro vazbu ribosomů a podobně. Dochází k expresi bílkoviny z odpovídajícího DNA v průběhu několikastupňového postupu, který je možno popsat následujícím způsobem:

1. Enzym RNA-polymeráza se aktivuje v řídicí oblasti a pohybuje se podél strukturálního genu, čímž dochází k transkripci kódované informace do ribonukleové kyseliny (mRNA) tak dlouho, až dojde ke konci transkripce na podkladě zvláštních kodonů, které ji zastavují. Řídicí oblast tohoto typu je také nazývána promotor.

2. Informace mRNA se přenesou ribosomem do bílkoviny, pro jejíž sled aminokyselin je kódem uvedený gen, k translaci dochází k místě signálu pro počátek translace, obvykle ATG („f-methionin“).

V souhlasu s genetickým kódem specifikuje DNA každou aminokyselinu trojicí ne-

2

boli kodonem tří sousedících nukleotidů, které se volí ze skupiny adenosin, thymidin, cytidin a guanin, zkratkami pro tyto nukleotidy jsou A, T, C nebo G. Tyto nukleotidy jsou zahrnuty v kódovém sledu DNA s dvojitým řetězcem, druhý, komplementární řetězec je tvořen bázemi, které jsou vázány vodíkovým můstkem ke komplementární bázi v kódovacím řetězci. A je komplementem pro T, C je komplementem pro G. Podrobně jsou tyto skutečnosti popsány například v publikaci Benjamin Lewin, Gene Expression 1, 2 (1974) a 3 (1977), John Wiley and Sons., N. Y.

Štěpení a vazba DNA

Pro rekombinaci DNA je možno užít řadu způsobů, podle nichž je možno zvláštním způsobem upravit jednotlivá zakončení fragmentů DNA, tak, aby vazba byla snadnější. Jde zejména o tvorbu fosfodiesterových vazeb mezi sousedními nukleotidy, nejčastěji působením enzymu T4 DNA ligázy. Tímto způsobem je možno přímo vázat jednotlivá zakončení. Je také možno postupovat tak, že fragmenty, které obsahují komplementární jednotlivé řetězce je možno doplnit. Toto doplnění je možno provést vazbou nukleotidů působením enzymu,

obecně nazývaného terminální transferáza nebo tak, že se odštěpí část zakončení enzymem — exonukleázou.

Nejčastěji se však užívá restriční endonukleázy, která štěpí fosfodiesterovou vazbu tak, že vzniká fragment 4 až 6 párů bází. Štěpení je prováděno na zcela zvláštních místech, v nichž může ke štěpení dojít. Je známa řada restričních enzymů i místa jejich působení jak bylo popsáno například v publikaci R. J. Roberts, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 123 (Nov. 1976). Působením celé řady restričních endonukleáz vznikají krátké komplementární úseky s jednoduchým řetězcem na konci dvojitých fragmentů. Tyto fragmenty je pak možno vzájemně vázat.

V případě, že se štěpí uvedeným enzymem dvě molekuly různého typu, vzniká nová molekula DNA, které je možno dodat integritu působením enzymu ligázy, čímž dojde ke spojení jednoduchých zakončení. Tímto způsobem je možno užít restričních enzymů ke štěpení DNA s dvojitým řetězcem s následnou rekombinací například působením T4 ligázy s jiným řetězcem.

Klonování s rekombinantní DNA

Prostředkem pro klonování je dvojitá DNA nechromozomální povahy, která obsahuje neporušený replikon, takže může dojít k replikaci při včlenění do jednobuněčného organismu, například mikroorganismu jeho transformací. Takový organismus se pak často nazývá transformantem. Prostředky pro klonování jsou obvykle odvozeny z virů a bakterií, nejčastěji jde o DNA bakteriálního původu s dvojitým řetězcem, čili o plasmidy.

Na základě pokroku v biochemii v posledních letech bylo možno sestavit prostředky pro klonování například takové rekombinantní prostředky, které obsahují DNA exogenního původu.

V některých případech může rekombinační DNA obsahovat heterologní DNA, to jest DNA, která je kódem pro polypeptidy, které se obvykle v organismu, který je transformován prostředkem pro klonování neprodukuje. Postupuje se tak, že se plasmidy štěpí restričním enzymem, čímž se získá lineární DNA se zakončeními, schopnými vazby. Tato zakončení se váží na exogenní gen se zakončeními, schopnými vazby, čímž vzniká biologická funkční skupina s neporušeným replikonem a s fenotypickou vlastností, kterou je možno použít při selekci transformantů. Rekombinační skupina se pak včlení do mikroorganismu transformací a transformant se izoluje a klonuje, čímž je možno získat množství organismů, které obsahují kopii exogenního genu a ve zvláštních případech může dojít k expresi bílkoviny, pro níž je gen kódem. Postupy pro tento případ a potenciální použití jsou shrnuty v publikaci Miles International

Symposium Series 10; Recombinant Molecules: Impact on Science and Society, Beers and Bosseff, eds., Raven Press, N. Y. (1977).

Expres rekombinantní DNA

Kromě použití prostředků pro klonování ke zvýšení množství genů replikací byly také prováděny pokusy k expresi bílkoviny, pro níž je uvedený gen kódem. V některých případech byly tyto pokusy úspěšné. Prvním případem byla exprese genu pro hormon somatostatin působením lac promotoru v *Escherichia coli*, jak bylo popsáno v publikaci K. Itakura a další, *Science* 198, 1056 (1977). V poslední době se podařilo dosáhnout exprese řetězce A a B lidského inzulínu stejným způsobem a tyto řetězce vázat na výsledný hormon, jak bylo popsáno v publikaci D. V. Goeddel a další, *Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA* 76, 106 (1979).

V každém z těchto případů byly geny získány v úplném stavu syntézou a v každém z těchto případů bylo užito různých enzymů a současně bylo nutno chránit produkt proti působení proteolytických enzymů, které by způsobily degradaci požadovaného produktu. Bylo tedy nutno produkt získat v konjugované formě, to znamená spolu s další bílkovinou, která způsobila ochranu proti uvedeným enzymům.

Mimo buňku pak bylo nutno tuto bílkovinu opět odštěpit k získání výsledného produktu. Tyto postupy byly popsány v následujících britských patentech č. 2 007 675, 2 007 670 A, 2 007 676 A a 2 008 123 A.

Syntetický gen bylo možno použít v několika uvedených případech, ke skutečným potížím však dochází, jakmile jde o daleko větší bílkovinné produkty, jako jsou růstový hormon, interferon a podobně, protože geny pro tyto látky jsou daleko komplikovanější a není možno je snadno syntetizovat. Současně by bylo velmi žádoucí, aby došlo k expresi těchto látek, zejména bez konjugované bílkoviny, to znamená, že je nutno zvolit vhodný organismus, který by mohl vytvářet požadovaný produkt.

Řada pracovníků se pokoušela dosáhnout exprese genu nikoliv organickou syntézou, avšak reverzní transkripcí z odpovídající mRNA, která byla získána čištěním z tkání. Tento postup je však spojen s dvojitým problémem. Reverzní transkriptáza může zastavit transkripci dříve, než je získána sestra cDNA nutná k získání úplného sledu aminokyselin. Villa-Komaroff a další například získali cDNA pro krysí proinzulín bez kodonů pro první tři aminokyseliny prekurzoru inzulínu, jak bylo popsáno v publikaci *Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA* 75, 3727 (1978).

Reverzní transkripcí mRNA pro polypeptidy, k jejichž expresi dochází působením

prekursoru byla získána cDNA pro prekursor a nikoliv pro biologicky aktivní bílkovinu, která jinak v eukaryotické buňce vzniká, v případě, že se odstraní enzymatickým způsobem řídicí sled. Až dosud nebyla prokázána podobná schopnost pro bakteriální buňku, tak, že transkripty mRNA vedly k expresi produktů, které obsahovaly řídicí sled prekursoru a nikoliv biologicky účinnou bílkovinu jako takovou. Pro kryší proinzulín byl tento postup popsán v svrchu uvedených publikaci Villa-Komaroffa a pro prekursor růstového hormonu kryší byl postup popsán v publikaci P. H. Seeburg a další. *Nature* **276**, 795 (1978).

Je tedy možno uzavřít, že až dosud pokusy o expresi lidských hormonů v bakteriích nebo v expresi prekursorů těchto hormonů na podkladě transkripce mRNA vedly náhodně pouze k produkci konjugovaných bílkovin, které bylo někdy obtížné štěpit mimo buňku, jak bylo popsáno pro případ penicilinázy ve svrchu uvedené publikaci Villa-Komaroffa a pro β -laktamázu ve svrchu uvedené publikaci Seeburgové.

Lidský růstový hormon

Lidský růstový hormon („HGH“) je vylučován podvěskem mozkovým čili hypofýzou. Sestává ze 191 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 21 500, je tedy třikrát větší než inzulin. Až dosud bylo možno lidský růstový hormon získat pouze velmi pracnou extrakcí z omezeného zdroje, kterým jsou hypofýzy ze mrtvol. Nesnadná dostupnost této látky způsobila i omezené použití při léčbě hypofyzárního trpaslivosti a nebylo možno pomýšlet na léčbu více než 50 % nejnutnějších případů.

Bylo by tedy zapotřebí navrhnout nové způsoby pro získání HGH a dalších polypeptidů ve větším množství, tato potřeba je zvláště naléhavá v případě polypeptidů, které jsou příliš velké pro organickou syntézu nebo pro mikrobiální expresi ze syntetických genů. Expresí hormonů savců pomocí transkripce mRNA by mohla pomoci odstranit obtíže, spojené se syntézou, avšak až dosud docházelo pouze k výrobě mikrobiálních biologicky neúčinných konjugátů, z nichž bylo velmi obtížné odštěpit požadovaný hormon.

Předmětem vynálezu je způsob pěstování životaschopné kultury mikroorganismu s obsahem replikovatelného prostředí pro klonování za současné exprese polypeptidu se známým sledem aminokyselin tak, že se gen, který je kódem pro polypeptid včlení do prostředí pro klonování a je řízen promotorem pro expresi, vyznačující se tím, že se reverzní transkripcí z mRNA získá první fragment genu pro expresi produktu, odlišného od uvedeného polypeptidu, přičemž tento fragment obsahuje část sledu, který je kódem pro uvedený polypeptid, první fragment obsahuje kodony, které jsou kódem

pro sled aminokyselin, odlišný od sledu v polypeptidu, tento sled se oddělí a získá se sled, který obsahuje část kódu, přičemž tento fragment však je kódem pro produkt, odlišný od uvedeného polypeptidu, načež se provede organická syntéza jednoho nebo většího počtu fragmentů genu, které jsou kódem pro zbytek sledu aminokyselin uvedeného polypeptidu a alespoň jeden z těchto fragmentů je kódem pro koncovou část aminokyselin v uvedeném polypeptidu a syntetický fragment nebo výsledný fragment se spojí v replikaceschopném prostředí při klonování ve správné fázi vzhledem k sobě navzájem zařízení promotoru pro expresi, čímž dochází ke vzniku replikaceschopného prostředí pro klonování, při jehož použití dochází k expresi sledu aminokyselin uvedeného polypeptidu, načež se prostředkem pro klonování transformuje mikroorganismus, který se pěstuje v živném prostředí s obsahem živných látek. Mikrobiální zdroje lidského růstového hormonu poprvé umožňují získání většího množství hormonu k léčbě hypofyzárního trpaslivosti a pro další použití, na němž až dosud nebylo možno pomýšlet vzhledem k omezenému množství hormonu.

Jde zejména o difúzní žaludeční krvácení, degeneraci kloubů, léčbu spálenin a jiných ran, různé typy dystrofií a kostní náhrady.

Vynález bude dále popsán v souvislosti s přiloženými výkresy, na nichž jsou znázorněna výhodná provedení způsobu podle vynálezu.

Na obr. 1 je znázorněno schéma pro konstrukci fragmentu genu, který je kódem pro prvních 24 aminokyselin lidského růstového hormonu spolu se signálem pro start ATG a s vaznými místy, jichž se užívá při klonování. Šipka v kódu, čili horním řetězcí (U) a komplementárním neboli dolním řetězcí (L) označuje oligonukleotidy, které byly spojeny za vzniku znázorněného fragmentu.

Na obr. 2 je znázorněno spojení oligonukleotidů U a L za vzniku fragmentu genu z obr. 1 a jeho včlenění do plasmidu za účelem klonování.

Na obr. 3 je znázorněn sled DNA, a to pouze kódovací řetězec po působení restrikčního enzymu Hae III na transkript mRNA hypofýzy, přičemž jsou číslovány aminokyseliny růstového hormonu, pro které je tento sled kódem. Jsou také označena místa pro působení restrikčního enzymu, například úsek DNA po kodonu, který zastaví translaci mRNA.

Na obr. 4 je znázorněna konstrukce prostředí pro klonování z fragmentu genu, který je kódem pro aminokyseliny lidského růstového hormonu a konstrukce tohoto fragmentu genu jako komplementární DNA reverzní transkripcí z mRNA, izolované z hypofýzy.

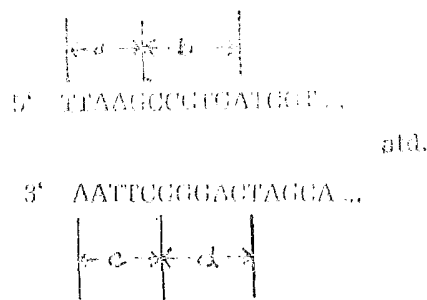
Na obr. 5 je znázorněna konstrukce plasmidu, který způsobí v bakterii expresi lidského růstového hormonu, a to počínaje plasmidy z obr. 2 a 3.

Obecným postupem vynálezu je kombinace jednoduchého prostředku pro klonování z většího počtu fragmentu genu, které jsou kódem pro expresi požadovaného produktu. Alespoň jeden fragment musí být cDNA-fragment odvozený reverzní transkripcí z mRNA, izolované z tkáně, jak bylo popsáno v publikaci A. Ullrich a další, Science 196, 1 313 (1977). Tato cDNA je podstatnou částí, s výhodou alespoň převážnou částí kodonů pro požadovaný produkt, zbývající část genu je doplněna synteticky. Syntetický fragment a fragment vzniklý transkripcí mRNA se skloupují odděleně, čímž se získá větší množství těchto fragmentů pro příští vzájemnou vazbu.

Celá řada podmínek ovlivňuje rozdělení kodonů pro výsledný produkt mezi syntetickou část a část, získanou transkripcí, jak je popsáno například při získání komplementární DNA v publikaci Maxam a Gilbert, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977). Komplementární DNA, získaná reverzní transkripcí bude vždy obsahovat kodony alespoň pro tu koncovou část požadovaného produktu, která obsahuje karboxyskupinu a další kodony pro mRNA, u níž nedošlo k translaci, a to směrem od signálu pro ukončení translace, který je nejbližší karboxylové skupině. Přítomnost DNA pro RNA, u níž nedošlo k přenosu nemá význam, i když je možno odstranit příliš dlouhé řetězce tohoto typu, například odštěpením restriktivním enzymem, aby bylo možno zachovat buněčné zdroje, užívané při replikaci a expresi DNA požadovaného produktu. Ve zvláštních případech bude cDNA obsahovat kodony pro celý požadovaný sled aminokyselin a další kodony směrem od aminokyseliny požadovaného produktu. Například převážná část polypeptidových hormonů nebo snad všechny tyto hormony se získají z prekursorů, které obsahují řídicí nebo signální sled bílkoviny, tak, jak je na tuto bílkovinu vázán například při průchodu buněčnou membránou. Při expresi z eukaryotických buněk jsou tyto sledy enzymaticky odstraňovány, takže hormon se dostává do periplazmatického prostoru ve své volné, biologicky účinné formě. Není však možno očekávat, že mikrobiální buňky splní tutéž funkci a je tedy žádoucí odstranit uvedené sledy a řídicí sledy z transkriptu mRNA. V tomto případě je však ztracen i signál pro počátek a obvykle také některé kodony pro výsledný produkt. Syntetická složka takto získaného genu tedy doplní tyto ztracené kodony i nový signál pro start, v případě, že prostředek pro přenos hybridního genu nemá signál pro start.

Odstranění řídicího sledu z cDNA prekursoru růstového hormonu je možno provést poměrně výhodným způsobem, protože ten-

to sled obsahuje místo pro působení restriktivního hormonu. Způsob podle vynálezu je však možno provádět i v případě, že se takové místo ve sledu nenachází a i bez ohledu na možnost získání takového místa dostatečně blízko aminokyseliny požadovaného polypeptidu, čímž je nutno syntetizovat větší úsek genu, který nelze odvodit od mRNA. To znamená, že v jakémkoliv kódu cDNA pro požadovaný polypeptid se může objevit i sled, který inaktivuje výsledný produkt, a to na hranici řídicího sledu a sledu pro požadovaný polypeptid. Je pak možno postupovat tak, že se gen rozdělí ve zvoleném peptidu a odstraní se nežádoucí řídicí sled nebo jiný sled. Je tedy možno štěpit danou cDNA jako:



kde konec štěpení je znázorněn šipkou, reakční podmínky pro exonukleázu je možno volit tak, aby byly odstraněny horní sledy **a** a **b**, načež **Sl** nukleáza automaticky odstraní spodní sledy **c** a **d**. Je také možno postupovat přesněji tak, že se užije DNA polymeráza za přítomnosti desoxynukleotidtrifosfátů [d (A, T, C, G) TP].

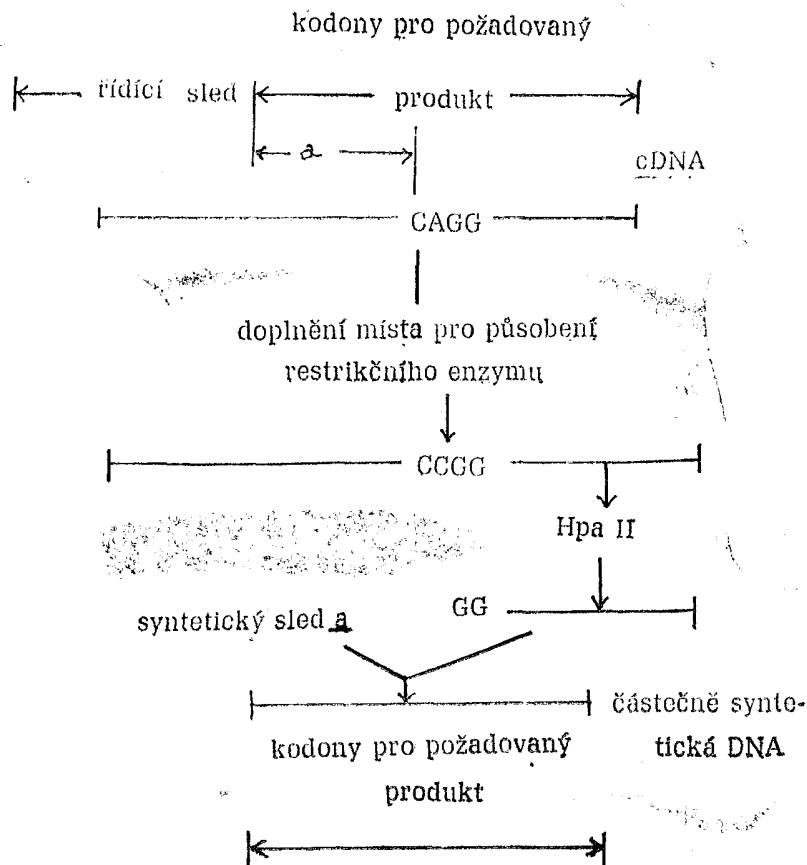
Ve svrchu uvedeném případě tedy DNA polymeráza za přítomnosti dGTP odstraní sled **c** a zastaví se u G, **Sl** nukleáza pak odštěpí sled **a**, DNA polymeráza za přítomnosti dTTP odštěpí sled **d** a zastaví se u T a **Sl** nukleáza pak odštěpí sled **b** atd. Tento způsob je popsán v publikaci A. Kornberg, DNA Synthesis, str. 87 až 88, W. H. Freeman a Co., San Francisco (1974).

S výhodou je možno jednoduchým způsobem postupovat tak, že se vytvoří místo pro působení restriktivního enzymu na vhodném místě cDNA, která je kódem pro požadovaný produkt způsobem, uvedeným v publikaci A. Razin a další, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 75, 4 268 (1978). Tímto způsobem se nahradí jedna nebo větší počet bází v existujícím sledu DNA, přičemž se užije vhodného substituentu. Alespoň sedm úseků o čtyřech párech bází je známo pro známé restriktivní enzymy, to jest AGCT (**Alu** I), CCGG (**Hpa** II), CGCG (**The** I), GATC (**Sau** 3A), GCGC (**Hha**), GGCC (**Hae** III), a TCGA (**Tag** I).

V případě, že sled cDNA obsahuje sled, který se od místa působení restriktivního en-

zymu odlišuje jedinou bázi, což je statisticky velmi pravděpodobné, je možno tuto bázi nahradit tak, že se získá cDNA, která obsahuje správnou bázi a tedy žádané místo pro působení restričního enzymu. Štěpe-

ním se pak oddělí DNA od nežádoucího řídicího sledu, načež se syntézou nahradí kodony, jichž je zapotřebí k expresi úplného polypeptidu. Postupuje se například následujícím způsobem:



Je samozřejmé, že je možno včlenit v případě potřeby i delší místa pro působení restričního enzymu nebo včlenit několik míst nebo postupně vytvořit restriční místo o čtyřech párech bází i tehdy, kdy sled obsahuje pouze dvě báze.

Může být žádoucí, aby nedošlo pouze k expresi sledu aminokyselin požadovaného produktu, nýbrž současně k expresi cizorodé, avšak specificky uspořádané bílkoviny. Jako příklad může být uvedeno několik možností. Polosyntetický gen může být například heptenem nebo jnou, z imunologického hlediska určující látkou, přičemž k imunologické reakci může dojít při spojení s další bílkovinou, čímž vznikne vakcína. Podobný způsob je popsán například v britském patentu č. 2 008 123A. Může být také žádoucí, aby došlo k expresi požadovaného produktu ve spojení s další, biologicky neúčinnou bílkovinou s následným mimobuněčným odštěpením této bílkoviny za vzniku účinné formy. Je rovněž možno postupovat tak, aby signální polypeptid předcházel požadovanému produktu, tak, aby bylo možno dosáhnout produkce i průcho-

du buněčnou membránou, pokud ovšem je signální peptid možno odštěpit. Mimoto je možno užít cizorodého konjugátu, určeného k specifickému odštěpení mimo buňku tak, aby byly chráněny produkty, které by jinak byly rozloženy endogenními proteázami mikrobiální buňky. Alespoň v posledních třech případech je možno k doplnění kodového sledu transkriptu mRNA užít kodonů pro sled aminokyselin, který je specificky odštěpitelný například působením enzymu. Trypsin nebo chymotrypsin, například specificky štěpí vazby arg—arg nebo lys—lys. jak bylo popsáno v britském patentu č. 2 008 123A.

Z toho, co bylo uvedeno je zřejmé, že ve svém nejširším významu dovoluje způsob podle vynálezu řadu možností. Je možno postupovat například následujícím způsobem:

— Užije se transkriptu mRNA, který je kódem pro podstatnou část sledu aminokyselin žádaného polypeptidu, avšak při vlastní expresi došlo k produkci odlišného polypeptidu, a to buď o něco menšího, nebo o něco menšího než požadovaný produkt.

— Odstraní se kodony pro sled aminokyselin, který se liší od sledu v požadovaném produktu.

— Organickou syntézou se získají fragmenty, které jsou kódem pro zbývající část požadovaného sledu.

— Transkript mRNA a syntetický fragment nebo fragmenty se spojí a včlení do prostředku pro klonování, pro replikaci a expresi požadovaného produktu bez konjugované bílkoviny nebo požadovaného produktu s konjugovanou bílkovinou, která je specificky odštěpitelná z výsledného produktu.

Je samozřejmé, že v každém případě bude produkt začínat aminokyselinou, pro níž je kódem signál pro start, například v případě ATG jde o f-methionin. Tato část bude patrně uvnitř buňky odstraněna nebo v každém případě neovlivňuje biologickou účinnost výsledného produktu.

Přestože způsob podle vynálezu je obecným způsobem pro výrobu cenných bílkovin včetně protilátek, enzymů a podobně, je zvláště vhodný k dosažení exprese hormonů savců typu polypeptidů a jiných látek s léčebným použitím, jako jsou glukagon, gastrointestinální inhibiční polypeptid, polypeptid ze slinivky břišní, adrenokortikotropní, β -endorfiny, interferon, urokináza, faktory, ovlivňující srážení krve, lidský albumin a podobně.

Vynález bude osvětlen následujícím příkladem, v němž je konstruován polysyntetický gen, který je kódem pro lidský růstový hormon, tento gen je klonován a dochází k jeho mikrobiální expresi.

Příklad

Konstrukce a exprese prostředku pro klonování lidského růstového hormonu

1. Klonování fragmentu po štěpení Hae III, získaného z transkriptu mRNA (obr. 3 a 4)

Polyadenylovaná mRNA pro lidský růstový hormon (HGH) byla připravena z nádorů, produkujících lidský růstový hormon způsobem, který byl popsán v publikaci A. Ullrich a další. *Science* **196**, 1313 (1977). 1,5 μ g cDNA s dvojitým řetězcem (ds) bylo připraveno z 5 μ g této RNA způsobem, popsáným v publikaci Wickens a další, *J. Biol. Chem.* **253**, 2483 (1978) s tím rozdílem, že bylo užito RNA polymerázy „Klenowův fragment“, popsané v publikaci H. Klenow, *Proc. Nat'l. Sci. USA*, **65**, 168 (1970) místo DNA polymerázy I při syntéze druhého řetězce. Místa pro působení restrikčních endonukleáz v restrikčním enzymu jsou rozložena tak, že místo pro působení Hae III je uloženo v 3' nekódovací oblasti a v kódovací oblasti pro aminokyseliny 23 a 24, jak je znázorněno na obr. 3. Při působení Hae III na ds cDNA růstového hor-

monu poskytuje fragment DNA o 551 párech bází (bp), který je kódem pro aminokyseliny 24 až 191 růstového hormonu. Tímto způsobem bylo zpracováno 90 ng cDNA enzymem Hae II, načež byla provedena elektroforéza na 8% polyakrylamidovém gelu a oblast při 550 bp byla vymyta. Tímto způsobem byl získán přibližně 1 ng cDNA.

Plasmid pBR322 byl připraven způsobem podle publikace F. Bolivar a další, *Gene* **2** (1977) str. 95 až 113 a byl užit jako prostředek pro klonování svrchu uvedené cDNA. Tento plasmid byl plně popsán v publikaci J. G. Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Symposium* **43**, 70 (1978), jde o replikaceschopný plasmid, který předává resistenci proti ampicilinu i proti tetracyklinu vzhledem ke včlenění odpovídajících genů (AP^R a Tc^R , jak je znázorněno na obr. 4), a který obsahuje místa pro působení restrikčních enzymů Pst I, EcoRI a Hind III, jak je na obr. 4 rovněž znázorněno.

Získají se štěpné produkty působením enzymu Hae III a Pst I. Pak se užije způsobu podle publikace Chang A. C. Y. a další, *Nature* **275**, 617 (1978) k doplnění získaných zakončení při štěpení uvedeného plasmidu enzymem Pst I a po působení enzymu Hae III na transkript mRNA, fragment cDNA se včlení do plasmidu pBR322 v místě po štěpení enzymem Pst I, takže se získá zpět místo pro štěpení enzymem Hae III

(GG↓CC)

v cDNA a dojde k restituci míst pro působení enzymu Pst I

(CTGCA↓G)

na každém konci včleněného sledu.

Bylo tedy užito terminální desoxynukleotidyltransferázy (TdT) k připojení přibližně 20 zbytků dC k 3'-zakončení, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Chang A. C. Y. 60 ng plasmidu pBR322 po působení enzymu Pst I bylo spojeno s přibližně 10 zbytky dG na 3'-zakončení. Po spojení ds cDNA se zbytky dC s vektorem DNA se zbytky dC, které bylo provedeno ve 130 μ l 10 mmol Tris-HCl o pH 7,5, 100 mmol NaCl, 0,25 mmol EDTA byla směs zahřívána na 70 °C, nechala se zchladnout v průběhu 12 hodin na teplotu 37 °C, pak v průběhu 6 hodin na teplotu 20 °C a pak byl materiál užit k transformaci *Escherichia coli* x1776. Analýza sledu DNA plasmidu pHGH31 klonovaného v x1776 způsobem, popsáným v

publikaci Maxam a Gilbert, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977) potvrdila kodony pro aminokyseliny 24 až 191 růstového hormonu, jak je znázorněno na obr. 3.

Escherichia coli K-12 kmen x1776 má genotyp F^- tonA53 dapD8 minA1 supE42 $\Delta 40$ (gal-uvrB) $\lambda =$ minB2 rfb-2 na 1A25 oms-2 thyA57* metC65 oms-1 $\Delta 29$ (bioH-asd) cycB2 cycA1 hsdR2. Kmen x1776 byl potvrzen National Institutes of Health jako EK2 vektor.

Kmen x1776 potřebuje ke svému růstu kyselinu diaminopimelovou (DAP) a není schopen syntetizovat mukopolysacharid kyseliny kolanovou. Dochází tedy k omezení jeho růstu nebo k jeho eliminaci v prostředí, kde se kyselina diaminopimelová nevyskytuje, avšak prostředí jinak obsahuje dostatečné množství živin pro buněčný metabolismus a růst. Kmen také vyžaduje přítomnost thyminu nebo thymidinu a dochází k rozkladu jeho DNA v případě, že živné prostředí neobsahuje thymin a thymidin, i když obsahuje dostatečné množství živin pro metabolickou účinnost. Kmen x1776 je velmi citlivý na přítomnost žluči a není schopen přežít v zažívací soustavě krysy. Tento kmen je také nesmírně citlivý na smáčedla, antibiotika a jiná léčiva chemické látky. Není schopen se zotavit po ozáření ultrafialovým světlem a je velmi citlivý na sluneční světlo, daleko citlivější než jiné typy *Escherichia coli*. Kmen x1776 je však odolný proti různým fágům, a je velmi obtížné včlenit různé plasmidy vzhledem k přítomnosti různých mutací. Tento kmen je odolný proti kyselině nalidixinové, cykloserinu a trimethoprimu. Tyto látky je tedy možno přidávat k živnému prostředí k řízení růstu tohoto kmene a k jeho ochraně proti kontaminaci jinými kmeny v průběhu transformace.

Kmen x1776 má generační dobu přibližně 59 minut v živném prostředí L nebo v prostředí Penassay při přidání 100 μ g DAP/ml a 4 μ g thymidinu/ml a dosahuje konečné hustoty 8 až 10 $\times 10^8$ buněk/ml ve stacionární fázi. Opatrné míchání a třepání kultury po dobu 1 až 2 minut zajistí rovnoměrnou suspenzi buněk, které si uchovávají 100% životnost. Další podrobnosti, týkající se kmene x1776 je možno získat v publikaci R. Curtis a další, Molecular Cloning of Recombinant DNA, 99 až 177, Scott a Werner, eds., Academic Press (N. Y. 1977). Kmen x1776 byl uložen ve sbírce American Type Culture Collection (3. července 1979, č. ATCC 31537) a je k dispozici bez omezení.

2. Konstrukce a klonování syntetického fragmentu genu (obr. 1 a 2)

Konstrukce polosyntetického genu pro lidský růstový hormon zahrnuje konstrukci syntetického fragmentu s místem pro štěpení restrikční endonukleázou tak, aby ten-

to fragment mohl být spojen s transkriptem mRNA. Jak je znázorněno na obr. 1, syntetická část genu pro prvních 24 aminokyselin lidského růstového hormonu obsahuje místo pro štěpení enzymem Hae III za aminokyselinou 23. Distální konec syntetického fragmentu je opatřen skupinou, která dovoluje jeho připojení k jednoduchému řetězci, který se získá tak, že se štěpí restrikční endonukleázou plasmid, k němuž bude připojen transkript mRNA spolu se syntetickým fragmentem.

Jak je znázorněno na obr. 1 5' zakončení dvojitého fragmentu má zakončení pro působení restrikčních endonukleáz EcoRI a Hind III, aby byla usnadněna konstrukce plasmidu. Kodon pro methionin na levém konci je zároveň místem pro počátek translace. Dvanáct různých oligonukleotidů, obsahujících 11 až 16 bází bylo syntetizováno zloženou fosfotriesterovou metodou, popsanou v publikaci Cres, R. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 73, 5765 (1978). Tyto oligonukleotidy U_1 až U_6 a L_1 až L_6 jsou označeny šipkami.

10 μ g U_2 až U_6 a L_2 až L_6 bylo fosforylováno při použití T_4 polynukleotidkinázy a (γ^{32} -P)ATP známým způsobem, popsaným v publikaci Goeddel D. V. a další, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 76, 106 (1979).

Byly provedeny tři oddělené reakce, katalyzované T_4 ligázou. 10 μ g 5'-OH fragmentu U_1 bylo spojeno s fosforylovaným U_2 , L_3 a L_6 , fosforylované U_3 , U_4 , L_3 a L_4 byly spojeny s 10 μ g 5'-OH fragmentu L_1 bylo spojeno s fosforylovaným L_2 , U_5 a U_6 . Tyto vazné reakce byly prováděny při teplotě 4 °C po dobu 6 hodin ve 300 μ l 20 mmolů Tris-HCl o pH 7,5, mmol $MgCl_2$, 10 mmolů dithiothreitolu, 0,5 mmol ATP při použití 100 jednotek T_4 ligázy. Tři reakční směsi pak byly slity, bylo přidáno 100 jednotek T_4 ligázy a reakce probíhala 12 hodin při teplotě 20 °C.

Směs byla vysrážena ethanolem a byla provedena elektroforéza na 10% polyakrylamidovém gelu. Pás, označující fragment s 84 páry bází byl vyjmut z gelu a odděleně vymýván. 1 μ g plasmidu pBR322 byl zpracován působením enzymu EcoRI a Hind III, velký fragment byl izolován elektroforézou na gelu a navázán na syntetickou DNA. Směs byla užita k transformaci *Escherichia coli*, K-12 kmen 294 (end A, thi⁻, har⁻, ham⁺). Kmen 294 byl uložen 30. října 1978 v American Type Culture Collection (ATCC č. 31446) a je k dispozici bez omezení. Při analýze sledu způsobem podle svrchu uvedené publikace Maxama a Gilberta na včleněném úseku po působení restrikčních endonukleáz EcoRI a Hind III na plasmid pGH3 potvrdila strukturu z obr. 1.

3. Konstrukce plasmidu pro bakteriální expresi lidského růstového hormonu (obr. 5)

Při použití syntetického fragmentu v pGHG3 a mENA transkriptu v pGHG31 byl konstruován replikaceschopný plasmid, který obsahoval oba fragmenty, a to při použití plasmidu pGH6, jak je znázorněno na obr. 5. Tento plasmid, který obsahuje spojené lac promotory byl poprvé konstruován následujícím způsobem. Fragment o 285 párech bází po působení endonukleázy Eco RI s obsahem 95 párů bází UV5 lac promotoru, odděleného 95 páry bází heterologního DNA fragmentu byl izolován z plasmidu pKB263 způsobem podle publikace K. Backman a další Cell, sv. 13, 65 až 71 (1978). Fragment o 285 párech bází byl včleněn do místa pro štěpení enzymem Eco RI v plasmidu pBR322 a klon pGH1 byl izolován pomocí promotoru, orientovaný správným směrem vzhledem ke genu pro odolnost proti tetracyklinu. Místo pro působení enzymu Eco RI distálně vzhledem k uvedenému genu bylo rozrušeno působením tohoto enzymu a jednoduchý řetězec s tímto zakončením byl izolován pomocí DNA polymerázy I s následným spojením vzniklých zakončení. Výsledný plasmid pGH6 obsahuje jediné místo pro působení enzymu Eco RI ve správné poloze vzhledem k promotoru, do tohoto místo je možno vložit úplný gen pro lidský růstový hormon.

K získání syntetického fragmentu pro spojení s transkriptem RNA bylo rozštěpeno 10 μ g plasmidu pGHG3 působením enzymů Eco RI a Hae III a fragment o 77 párech bází s obsahem žádaného sledu pro aminokyselinu 1 až 23 lidského růstového hormonu byl izolován na 8% polyakrylamidovém gelu.

5 μ g plasmidu pGHG31 bylo pak rozštěpeno enzymem Hae III. Sled lidského růstového hormonu o 551 párech bází a fragment po štěpení plasmidu pBR322 enzymem Hae III o 540 párech bází byly čištěny elektroforézou na gelu. Po štěpení působením enzymu Xma I byl odštěpen pouze sled pro lidský růstový hormon, který oddělil 39 párů bází od oblasti v blízkosti 3'-zakončení, která nebyla kódem pro tento hormon. Výsledný fragment o 512 párech bází byl oddělen od fragmentu o 540 párech bází, získaného z plasmidu pBR322 štěpením enzymem Hae III elektroforézou na 6% polyakrylamidovém gelu. 0,3 μ g fragmentu o 77 párech bází po štěpení enzymy Eco RI a Hae III bylo polymerováno působením T_4 ligázy v 16 μ l reakční směsi po dobu 14 hodin při teplotě 4 °C. Směs byla zahřívána na teplotu 70 °C po dobu 5 minut k inaktivaci enzymu a pak byla podrobena působení enzymu Eco RI k odštěpení fragmentů, které byly podrobeny dimerizaci na místech pro působení tohoto enzymu, a působení enzymu Sma I k rozštěpení dimerů v místě působení Sma I, čímž byl získán fragment o 591 párech bází se zakončeními, vzniklými po působení enzymu Eco RI, zakončení po působení enzymu Sma I nebyla

schopna se opět vázat. Po čištění na 6% polyakrylamidovém gelu bylo získáno přibližně 30 ng tohoto fragmentu. Je nutno uvést, že plasmid pGH6 neobahuje místo pro působení enzymu Xma I. Na druhé straně místo pro působení enzymu Sma I je totéž jako pro působení enzymu Xma I, avšak rozdělení probíhá uprostřed tohoto místa a vzniklá zakončení nejsou schopna se navzájem opět vázat. To znamená, že fragment po rozštěpení enzymem Sma I, získaný štěpením plasmidu pGHG31 je možno navázat na plasmid pGH6.

Plasmid pGH6, který obsahuje promotory lac UV5 byl postupně zpracováván působením enzymu Hind III, nukleázy S1 a Eco RI a byl čištěn elektroforézou na gelu. 50 mg výsledného vektoru, který obsahoval jedno místo pro působení enzymu Eco RI a jedno jeho zakončení bylo vázáno na 10 ng DNA lidského růstového hormonu o 591 párech bází. Tato směs byla užita k transformaci *Escherichia coli* kmene x1776. Kolonie byly izolovány s ohledem na růst na prostředí, které obsahovalo 12,5 μ g tetracyklinu/ml. Je nutno uvést, že včlenění hybridního genu pro lidský růstový hormon do plasmidu pGH6 zničí promotor pro odolnost proti tetracyklinu, avšak svrchu uvedený lac promotor dovoluje správné odečtení strukturalního genu pro odolnost proti tetracyklinu, takže tato vlastnost, umožňující správnou selekci kolonií je zachována. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 400 transformantů. Při hybridizaci podle publikace Grunstein - Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3861 (1975) bylo prokázáno 12 kolonií, které obsahovaly sled pro lidský růstový hormon. Plasmidy, izolované ze tří z těchto kolonií měly požadovaná místa pro štěpení enzymem Hae III, Pvu II a Pst I. Byl rovněž stanoven DNA sled pro jeden klon plasmidu pGHG107.

Lidský růstový hormon, k jehož expresi došlo transformanty bylo možno snadno zjistit přímou radioimunologickou zkouškou, která byla provedena na zředovacích sériích supernatantů rozrušených buněk při použití zkušební sestavy HGH PRIST (Farmacia).

Aby bylo možno prokázat, že exprese lidského růstového hormonu je řízena lac promotorem byl transformován plasmid pGHG 107 do *Escherichia coli* kmene D1 210 [lac + (i^0 + $z'y$ +)], u něhož dochází k nadprodukci lac represoru. Dosažené hladiny exprese lidského růstového hormonu není možno prokázat dříve než po přidání IPTG (isopropylthiogalaktosid).

Odstraněním místa pro působení enzymu Eco RI v plasmidu pGH107 by byl oddělen ATG signál pro start v téže vzdálenosti od kodonů, vážících ribosom lac promotoru, jako je tomu v přírodním stavu a současně signál pro start pro β -galaktosidázu. Aby bylo možno zjistit, zda by exprese byla zvý-

šena napodobením tohoto přírodního stavu, byl převeden plasmid pGH107 na plasmid pGH107-1 otevřením působením enzymu Eco RI a působením SI endonukleázy na výsledné jednoduché řetězce s obnovením kruhu působením T_4 ligázy. Přestože výsledný plasmid bylo možno použít k dosažení exprese lidského růstového hormonu, nebyla tato exprese vyšší než při použití plasmidu pGH107, jak bylo možno prokázat přímo radioimunologickou zkouškou.

Je zřejmé, že způsob podle vynálezu nemůže být omezen na uvedené výhodné provedení, nýbrž je tímto provedením pouze ilustrován. Je možno užít dalších variací, a to jak co do volby promotoru, plasmidu, tak do volby výsledného polypeptidu a podobně. Je možno například užít jiné promotory, jako jsou promotor lambda, operon pro arabinózu (ϕ 80 a ara) nebo kolicin E1, galaktózu, alkalickou fosfatázu nebo promotor pro tryptofan.

Je možno užít jiné organismy pro expresi, například z čeledi Enterobacteriaceae, například kmeny *Escherichia coli* a *Salmonella*, *Bacillaceae*, například *Bacillus subtilis*, *Pneumococcus*, *Streptococcus* a *Hemophilus influenzae*. Je samozřejmě, že volba organismu ovlivní klonování a expresi, která by měla být provedena v souladu s předpisy, vydanými National Institutes of Health Guidelines for Recombinant DNA, 43 Fed. Reg. 60 080 (1978).

Způsob podle vynálezu, tak, jak byl popsán ve svrchu uvedeném příkladu na *Escherichia coli* kmen x1 776 byl prováděn v laboratorním měřítku. Bylo by však možno jej provádět pouze v omezeném průmyslovém měřítku, vzhledem k potenciálnímu biologickému nebezpečí. Jiné mikroorganismy, například *Escherichia coli* K-12 kmen 294 a *Escherichia coli* kmen RR1, genotyp $\text{Pro}^- \text{Leu}^- \text{Thi}^- \text{R}_b^- \text{recA}^+ \text{Atr}^- \text{Lac y}^-$ by však bylo možno užít ve větším měřítku. Kmen *Escherichia coli* RR1 je odvozen od *Escherichia coli* HB101, který byl popsán v publikaci H. W. Boyer a další, J. Mol. Bio. (1969) 41, 459 až 472, spojením s kmenem *Escherichia coli* K12, kmen KL16 jako donorem Hfr, jak bylo popsáno v publikaci J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor, New York, 1972).

Kultura *Escherichia coli* RR1 byla uložena

na 30. října 1978 v American Type Culture Collection pod číslem ATCC 31 343 a je dosažitelná bez omezení. Kultura kmene x1 776 byla uložena v téže sbírce 3. července 1979 pod číslem ATCC 31 537. 3. července 1979 byl rovněž v téže sbírce uložen plasmid pGH107 pod číslem ATCC 40 011, plasmid pGH6 pod číslem ATCC 40 012, kmen x1 776, transformovaný plasmidem pGH107 pod číslem ATCC 31 538 a *Escherichia coli* K12 kmen 294, transformovaný pGH6 pod číslem ATCC 31 539.

Organismy, které je možno získat způsobem podle vynálezu, je možno užít při průmyslové fermentaci k produkci lidského růstového hormonu, čímž je možno získat množství, kterých až dosud nebylo možno dosáhnout. Transformant kultur *Escherichia coli* je například možno pěstovat ve vodných prostředích v nádobách z nerezové oceli nebo v jiných nádobách za běžného provzdušňování a míchání například při teplotě 37 °C a v blízkosti neutrálního pH, například při pH 7 ± 0,3, živné prostředí obsahuje běžné živné složky jako uhlohydráty, glycerol, zdroje dusíku jako síran amonný, zdroj draslíku jako fosforečnan amonný, stopové prvky, síran hořečnatý a podobně. Transformanty obvykle mají vlastnosti, které umožňují jejich selekci, například odolnost proti některým antibiotikům, čímž je možno tyto kmeny oddělit a zamezit růst divokých typů *Escherichia coli*. Jako příklad je možno uvést, že v případě organismů, odolných proti ampicilinu a tetracyklinu je možno přidat k živnému prostředí uvedená antibiotika k zamezení růstu divokých organismů, které odolné nejsou.

Po skončení fermentace se suspenze bakterií odstředí nebo jinak oddělí a pak se rozruší fyzikálně nebo chemicky. Buněčná drť se oddělí od supernatantu a rozpustný růstový hormon se izoluje a čistí.

Lidský růstový hormon je možno čistit buď frakcionací polyethyleniminem, nebo gelovou filtrací na gelu Sephakryt-S-200, iontoměničovou chromatografií na pryskyřici Biorex-70 nebo CM Sephadex, frakcionací síranem amonným nebo změnou pH a případně chromatografií při použití protilátke proti antiumoglobinu proti uvedenému hormonu ze senzibilizovaných zvířat nebo hybridů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob pěstování životaschopné kultury mikroorganismu s obsahem replikovatelného prostředku pro klonování za současné exprese polypeptidu se známým sledem aminokyselin tak, že se gen, který je kódem pro polypeptid včlení do prostředku pro klonování a je řízen promotorem pro expresi, vyznačující se tím, že se reverzní transkripce z mRNA získá první fragment

genu pro expresi produktu, odlišného od uvedeného polypeptidu, přičemž tento fragment obsahuje část sledu, který je kódem pro uvedený polypeptid, první fragment obsahuje kodony, které jsou kódem pro sled aminokyselin, odlišný od sledu v polypeptidu, tento sled se oddělí a získá se sled, který obsahuje část kódu, přičemž tento frag-

ment však je kódem pro produkt, odlišný od uvedeného polypeptidu, načež se provede organická syntéza jednoho nebo většího počtu fragmentů genu, které jsou kódem pro zbytek sledu aminokyselin uvedeného polypeptidu a alespoň jeden z těchto fragmentů je kódem pro koncovou část aminokyselin v uvedeném polypeptidu a syntetický fragment nebo výsledný fragment se spojí v replikaceschopném prostředí při klonování ve správné fázi vzhledem k sobě navzájem zařazení promotoru pro expresi, čímž dochází ke vzniku replikaceschopného prostředí pro klonování, při jehož použití dochází k expresi sledu aminokyselin uvedeného polypeptidu, načež se prostředkem pro klonování transformuje mikroorganismus, který se pěstuje v živném prostředí s obsahem živných látek.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako prostředí pro klonování užije bakteriálního plasmidu.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že syntetický fragment je kódem pro terminální část polypeptidu, počínaje od aminoskupiny a mimoto je kódem pro expresi specificky odštěpitelného sledu aminokyselin, přičemž fragmenty se nacházejí ve fázi s kodony, které jsou kódem pro bílkoviny, takže produkt exprese konjugovaného plasmidu je možno specificky rozštěpit za získání žádaného polypeptidu.

4. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že sled aminokyselin polypeptidu je schopen exprese i bez použití zevní bílkoviny.

5. Způsob podle bodu 4, vyznačující se tím, že první fragment obsahuje alespoň většinu sledu, který je kódem pro žádaný polypeptid.

6. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se syntetický fragment a fragment, který je transkriptem mRNA spojí před včleněním do prostředí pro klonování, opačné konce fragmentu a transkriptu mají jednoduché řetězce, aby bylo možno zajistit vazbu obou fragmentů ve správném pořadí, nutném pro expresi požadovaného polypeptidu.

7. Způsob podle bodu 5, vyznačující se tím, že se jako polypeptidu užije lidského růstového hormonu, první fragment obsahuje kodony, které jsou kódem pro sled aminokyselin, odlišný od sledu v lidském růstovém hormonu a fragment prvního úseku se získá po štěpení restričními enzymem Hae III.

8. Způsob podle bodu 7, vyznačující se tím, že se provádí zpracovávání fragmentu po působení Hae III jiným restričním enzymem, čímž dojde k odštěpení kodonu pro mRNA, u níž nedošlo k translaci a současně vzniká zakončení s jediným řetězcem na jednom konci výsledného fragmentu.

9. Způsob podle bodu 8, vyznačující se tím, že se jako druhého restričního enzymu užije Xma I.

10. Způsob podle bodu 1 pro expresi lidského růstového hormonu v mikrobiálním organismu, přičemž se včleňuje gen, který je kódem pro lidský růstový hormon do prostředí pro klonování zařazení promotoru pro expresi, vyznačující se tím, že se vytvoří první fragment genu, který obsahuje část kódu pro sled lidského růstového hormonu, avšak obsahuje pouze kód pro část sledu aminokyselin lidského růstového hormonu, načež se připraví alespoň jeden další fragment genu, který je kódem pro zbývající část sledu aminokyselin lidského růstového hormonu, a to tak, že alespoň jeden z těchto fragmentů je kódem pro terminální část lidského růstového hormonu, a tyto fragmenty se uloží ve správné vzájemné fázi do replikovatelného prostředí pro klonování za řízení promotoru pro expresi a za vzniku replikovatelného prostředí pro klonování pro expresi sledu aminokyselin lidského růstového hormonu bez zevní konjugované bílkoviny, a prostředkem pro klonování se transformuje mikroorganismus, který se pěstuje v živném prostředí s obsahem živných látek.

11. Způsob podle bodu 10, vyznačující se tím, že se volí fragmenty pro podstatnou část genu pro lidský růstový hormon s obsahem DNA nebo z materiálu po její replikaci.

12. Způsob podle bodů 2 až 11, vyznačující se tím, že se užije plasmidu, odolného alespoň proti jednomu antibiotiku.

13. Způsob podle bodu 12, vyznačující se tím, že se užije plasmidu, prostého promotoru pro odolnost proti tetracyklinu, avšak odolného proti tetracyklinu.

14. Způsob podle bodů 10 nebo 11, vyznačující se tím, že po uložení do plasmidu je gen pro lidský růstový hormon řízen lac — — promotory.

15. Způsob podle bodu 14, vyznačující se tím, že se jako plasmidu užije plasmidu pHCH107.

16. Způsob podle bodu 14, vyznačující se tím, že se jako plasmidu užije plasmidu pHCH107—1.

17. Způsob podle bodů 1 až 9, vyznačující se tím, že se kultura mikroorganismu pěstuje ve fermentační nádobě za současného míchání a provzdušňování ve vodném prostředí s obsahem živných látek, při růstu kultury za stálého provzdušňování a míchání se přidávají další živné látky, nutné k udržení prudkého růstu, výsledná buněčná hmota se oddělí od živného prostředí, buňky se rozruší k uvolnění jejich obsahu, buněčná drť se oddělí od supernatantu a polypeptid se ze supernatantu izoluje a čistí.

18. Způsob podle bodů 10 až 16, pro výrobu lidského růstového hormonu, vyznačující se tím, že se kultura mikroorganismu uloží do fermentační nádoby, opatřené prostředky pro provzdušňování a míchání do

vodného fermentačního prostředí s obsahem živných látek, a pak se tato kultura pěstuje za provzdušňování a míchání a současného dodávání dalších živin k udržení prudkého růstu, výsledný buněčný materiál se oddělí od fermentačního prostředí a buňky se rozruší k uvolnění svého obsahu, buněčná drť se izoluje od supernatantu a lidský růstový hormon, obsažený v supernatantu se izoluje a čistí.

19. Způsob podle bodů 17 a 18, vyznačující se tím, že se užije transformantu *Escherichia coli* a provádí se selekce k vyloučení růstu divokých kmenů *Escherichia coli*.

20. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se mezi funkční geny pro odolnost proti ampicilinu a tetracyklinu uloží systém lac-promotoru, orientovaný k vyvolání exprese ve směru pro gen pro odolnost proti

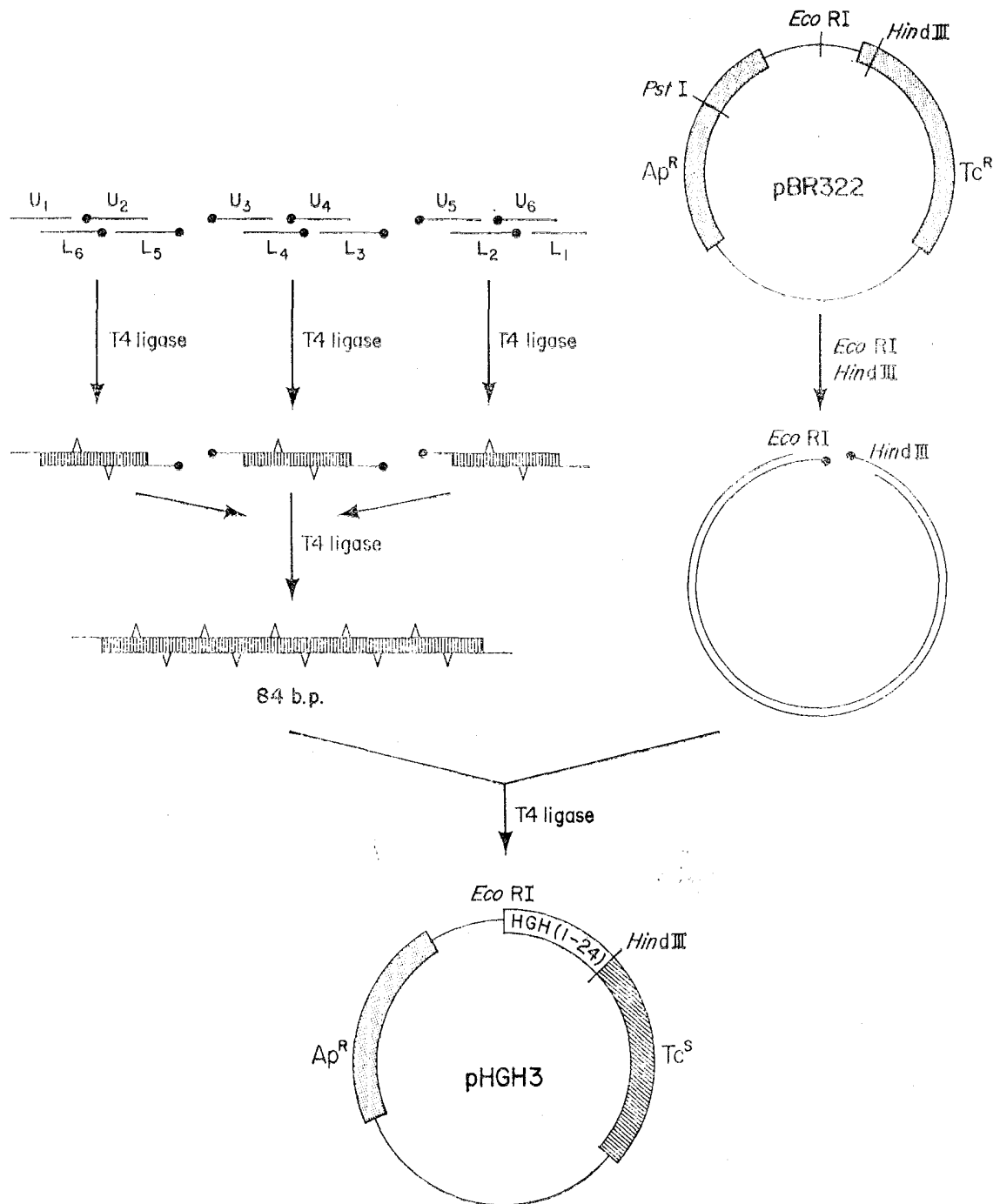
tetracyklinu, načež se směrem od tohoto systému uloží několik specifických míst pro působení restrikčních enzymů za vzniku zakončení různého typu po rozštěpení a za správného včlenění heterologní DNA do těchto míst pod řízením uvedeného systému promotoru, načež se prostředkem pro klonování transformuje mikroorganismus a transformovaný mikroorganismus se pěstuje v živném prostředí s obsahem živných látek.

21. Způsob podle bodu 20, vyznačující se tím, že se jako prostředku pro klonování užije plasmidu pGH6.

22. Způsob podle bodů 1 až 16 a 20 až 21 pro výrobu polypeptidu včetně exprese prostředku pro klonování, vyznačující se tím, že prostředek pro klonování obsahuje kód pro aminokyseliny 1 až 191 lidského růstového hormonu.

2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
 fmet phe pro thr lie pro leu bet arg leu phe asp asn ala met leu arg ala his arg leu ala
 AATCTAAGTTCGCAACTATACGACTATCTCTGCTATCTCTCTCATGGTCTTTCATCAGCTGGCTTA
 GAACAAAGGTTCTATATGGTGAATAGACCAAGCAATAGAGCTATGGGATAGCAAGCAGGAGTAGCAGACCGGATTCG
 EcoRI $\overline{U_1}$ $\overline{U_2}$ $\overline{U_3}$ $\overline{U_4}$ $\overline{U_5}$ $\overline{U_6}$ Hind III
 Hae III



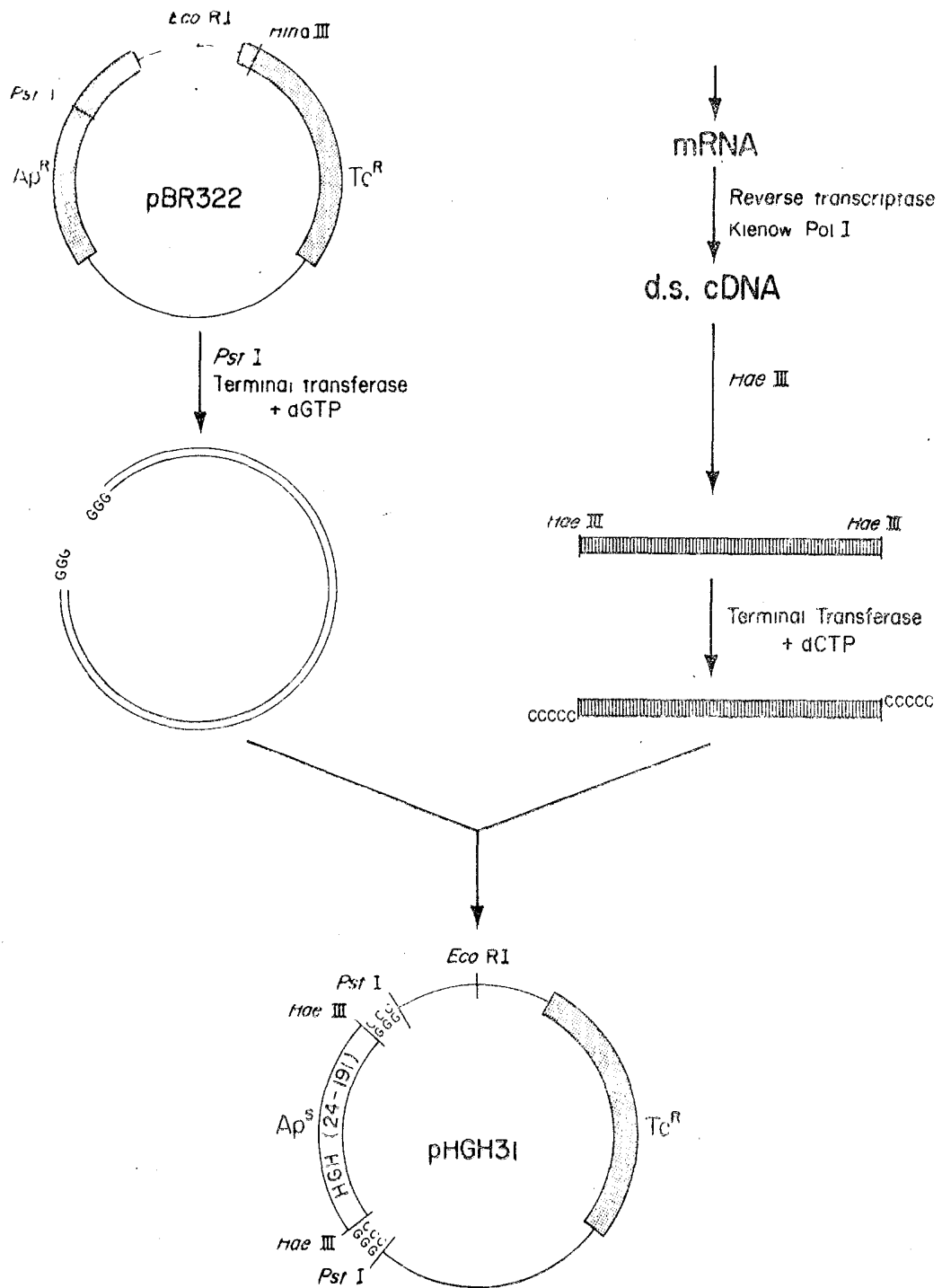
24
 Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser
 5'...G GCC UUU GAC ACC UAC CAG GAG UUU GAA GAA GGC UAU AUC CCA AAG GAA CAG AAG UAU UCA UUC CUG CAG AAC CCC CAG ACC UCC
Pst I

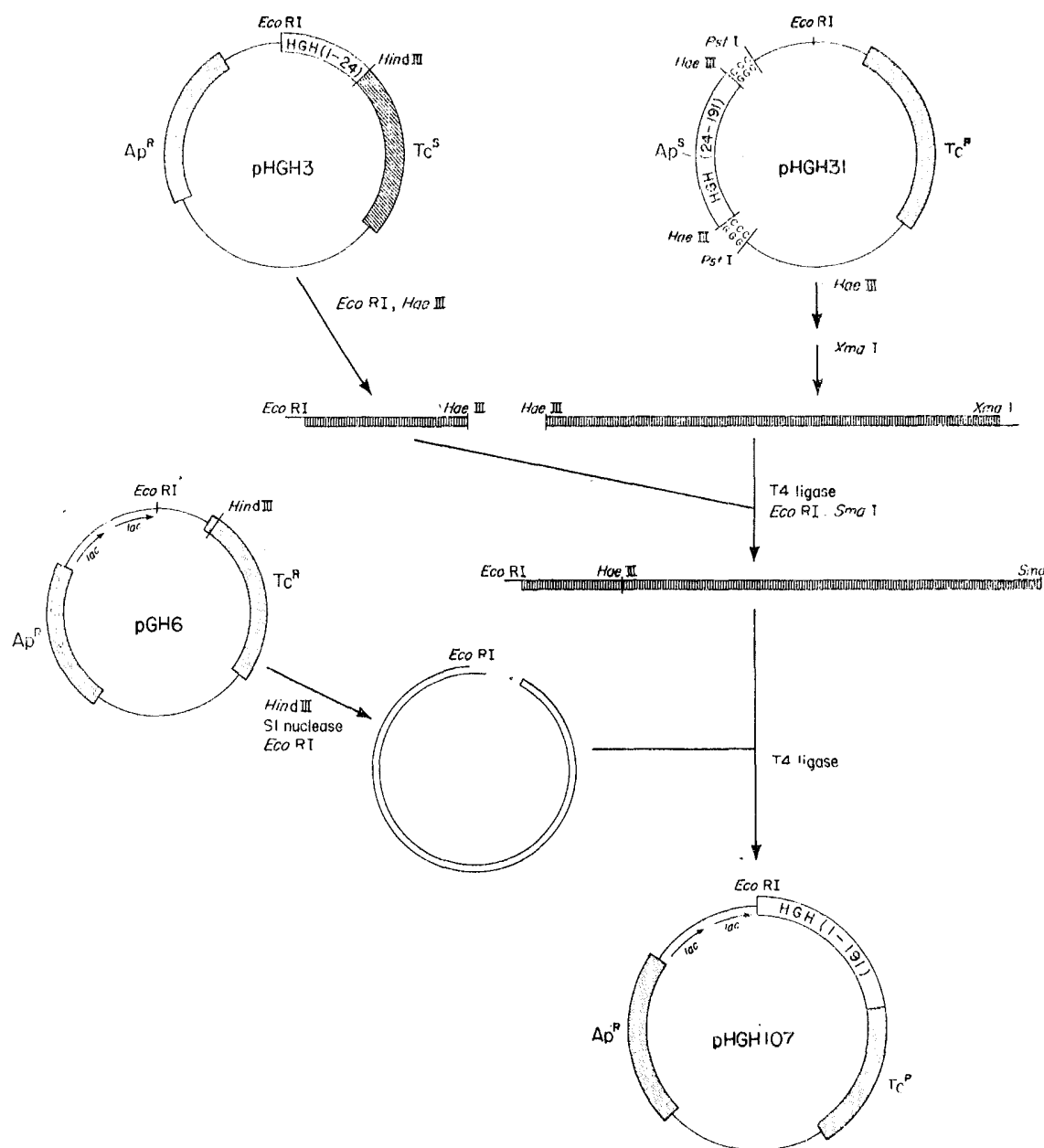
40
 Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Arg Ile Ser Leu Leu
 CUC UGU UUC UCA GAG UCU AUU CCG ACA CCC UCC AAC AGG GAG GAA ACA CAA CAG AAA UCC AAC CUA GAG CUC GCG CCG AUC UCC CUG CUG
 60
 Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr
 CUC AUC CAG UCG UGG CUG GAG CCC GCG CAG UUC CUC AGG AGU GUC UUC GCC AAC AGC CUA GUG UAC GGC GGC UCU GAC AGC AAC CUC UAU
 80
 Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln
 GAC CUC CUA AAG GAC CUA GAG GAA GGC AUC CAA AGC CUG AUG GCG AGC CUG CAA GAU GGC AGC CCC GCG ACU GGC CAG AUC UUC AAG GAG
Bgl II

120
 Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Arg
 ACC UAC AGC AAG UUC GAC ACA AAC UCA CAC AAC GAA GAU GAC GCA CUA CUC AAG AAG UAC GGG CUG CUC UAC UCC UUC AGG AAG GAC AUG GAC
 140
 Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Stop
 AAG GUC GAG ACA UUC CUG CCG AUC GUG CCG UCU GUG GAG GCG AGC UCU GGC UUC UAG CUGCCCGGUGGCAUCCCUUGACCCCUCCCGCAGU
Pvu II Sma I
Xba I

180
 GCCUUCUUGGCC...3'
Hae III

191
 3.





5.