

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

254973
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

- (22) Přihlášeno 04 07 80
(21) {PV 2708-84}
(32) (31) (33) Právo přednosti od 05 07 79
(55126) Spojené státy americké
(40) Zveřejněno 16 07 87
(45) Vydáno 15 11 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 konstrukce replikovatelného prostředku pro klonování

1

2

Řešení se týká způsobu konstrukce replikovatelného prostředku pro klonování pro expresi lidského růstového organismu v mikrobiálním organismu, přičemž se včleňuje gen, který je kódem pro lidský růstový hormon do prostředku pro klonování za řízení 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, která obsahuje volnou aminokyselinu a tyto fragmenty se uloží ve správné vzájemné fázi do replikovatelného prostředku pro klonování za řízení promotoru pro expresi a za vzniku replikovatelného prostředku pro klonování pro expresi sledu aminokyselin lidského růstového hormonu bez zevní konjugované bílkoviny.

Vynález se týká způsobu získání životaschopné kultury replikovatelného prostředí pro klonování.

Genetická exprese

Desoxyribonukleová kyselina obsahuje kód pro bílkovinu, to znamená takzvaný 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 odpovídající 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 přenese ribosomem do bílkoviny, pro jejíž sled aminokyselin je kódem uvedený gen, k translaci dochází v místě signálu pro počátek translace, obvykle ATG („f-methionin“).

V souhlasu s genetickým kódem specifikuje DNA každou aminokyselinu trojicí nebo-li 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 jednotlivé 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 restriktivní endonukleázy, která štěpí fosfodiesterovou vaz-

bu 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 restriktivních enzymů i místo jejich působení, jak bylo popsáno například v publikaci R. J. Roberts, *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 123 (Nov. 1976). Působením celé řady restriktivních 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 restriktivních 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 plazmidy.

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 rekombinantní DNA obsahovat heterologní DNA, to jest DNA, které je kódem pro polypeptidy, které se obvykle v organismu, který je transformován prostředkem pro klonování neprodukuje. Postupuje se tak, že se plazmidy štěpí restriktivním 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.

Rekombinanční 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 s 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).

Expresie 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 somatostatín 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 insulínu 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 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 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 číslo:

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.

Rada 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 dvojím problémem. Reverzní transkriptáza může zastavit transkripci dříve, než je získána sestava cDNA nutná k získání úplného sledu aminokyselin. Villa-Komaroff a další například získali cDNA pro kryší proinzulín bez kodonů pro první tři aminokyseliny prekursoru inzulínu, jak bylo popsáno v publikaci *Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA* **75**, 3727 (1978).

Reverzní transkripcí mRNA pro polypep-

tidy, 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, takže 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 ve svrchu uvedené publikaci Villa-Komaroffa a pro prekursor růstového hormonu krysy 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 produkcí konjugovaných bílkovin, které bylo někdy obtížně štěpit mimo buňku, jak bylo opsáno pro případ penicilinázy ve svrchu uvedené publikaci Villa-Komaroffa a pro β -laktamázu ve svrchu uvedené publikaci Seeburgově.

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 inzulín. Až dosud bylo možno lidský růstový hormon získat pouze velmi pracnou extrakcí z omezeného zdroje, kterým jsou hypofýzy z mrtvol. Nesnadná dostupnost této látky způsobila i omezené použití při léčbě hypofyzárního trpaslictví 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. Expresie 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.

Vynález se týká způsobů a prostředků k expresi genů, jejichž podstatná část je získána reverzní transkripcí kódového sledu bez pracné konstrukce celého syntetického genu, syntéza zbytku kódové sekvence pak vede k získání úplného genu, který je schopen exprese požadovaného polypeptidu, který není doprovázen řídicím sledem, který by způsoboval jeho biologickou inaktivaci ani další cizorodou bílkovinu. Tím je možno získat konjugát, odolný proti proteolýze, dovolující extracelulární odštěpení cizorodé

bílkoviny ze získání biologicky účinné formy.

Způsobem podle vynálezu je tedy možno mikrobiální produkci získat četné materiály, které bylo možno až dosud získat jen v omezeném množství nákladnou extrakcí tkání bez možnosti získání většího množství.

Způsob podle vynálezu znamená první případ, v němž bylo možno polypeptidový hormon, důležitý z lékařského hlediska, to jest lidský růstový hormon, získat bakteriální expresí, aniž by došlo k nitrobuněčné proteolýze nebo k nutnosti doplnění biologicky účinné formy cizorodou bílkovinou, kterou by pak bylo nutno odštěpit.

Mikrobiální zdroje lidského růstového hormonu poprvé umožňují získání většího množství hormonu k léčbě hypofyzárního trpaslivství a pro další použití, na něž 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 příloženými 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 řetězci (U) a komplementárním nebo-li dolním řetězci (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 plazmidu za účelem klonování.

Na obr. 3 je znázorněn sled DNA, a to pouze kódovací řetězec po působení restričního 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 restričního enzymu, například úsek DNA po kodonu, který zastaví translaci mRNA.

Na obr. 4 je znázorněna konstrukce prostředku 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 plazmidu, který způsobí v bakterií expresi lidského růstového hormonu, a to počínaje plazmidy 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, vzniklý transkripcí mRNA se skloňují odděleně, čímž se získají 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 Maxem 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 restričním 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 prekursoru, 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.

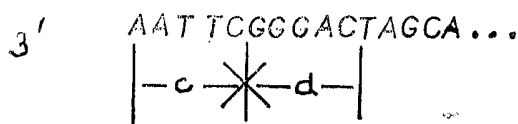
V tomto případě je však ztracen i signál pro začátek a obvykle také některé kodony pro výsledný produkt. Syntetická složka takto získaného genu tedy doplní tyto ztracené kodony i nový signál pro start, v případě, že prostředek pro přenos hybridního genu nemá signál pro start.

Odstranění řídicího sledu z cDNA prekursoru růstového hormonu je možno provést poměrně výhodným způsobem, protože tento sled obsahuje místo pro působení restričního enzymu. 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:



atd.



kde konec štěpení je znázorněn šipkou, reakční podmínky pro exonukleázu je možno volit tak, aby byly odstraněny horní sledy **a** a **b**, načež S1 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

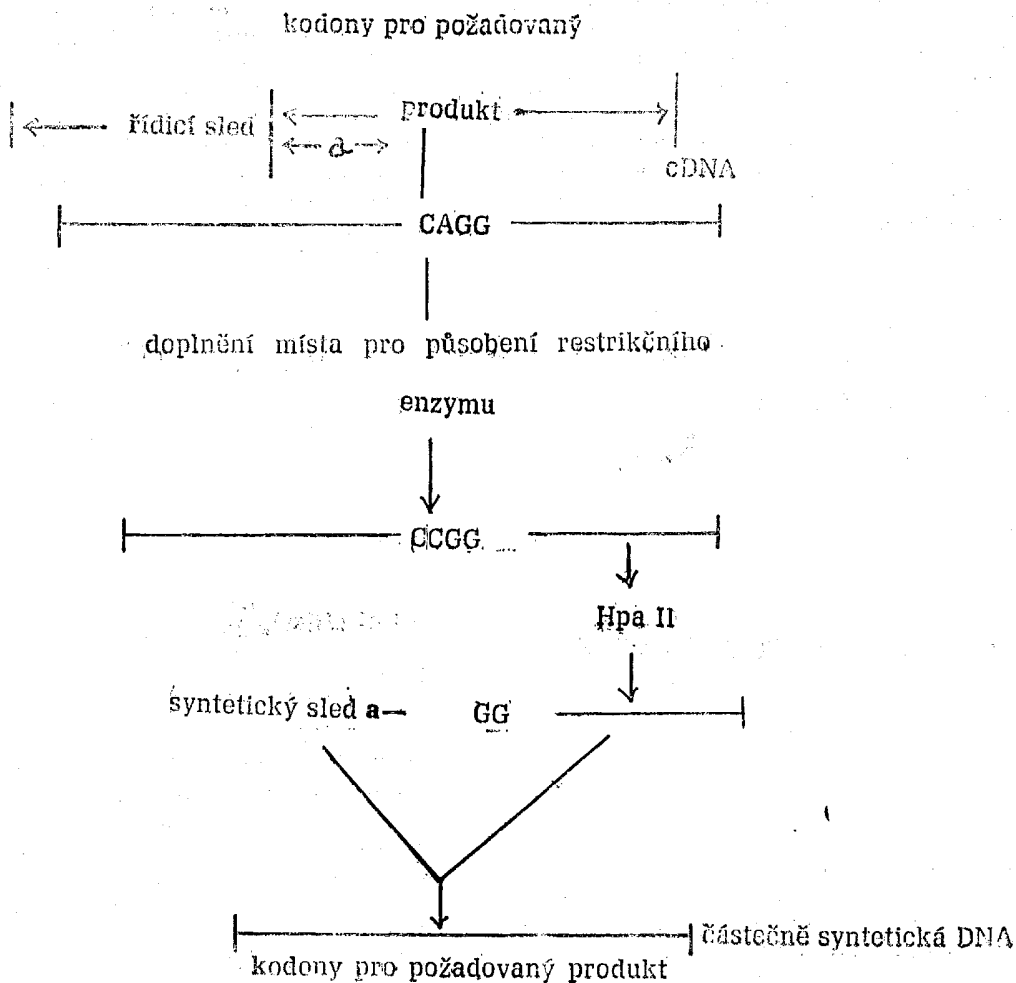
polymeráza za přítomnosti dGTP odstraní sled **c** a zastaví se u G, S1 nukleáza pak odštěpí sled **a**, DNA polymeráza za přítomnosti dTT P odštěpí sled **d** a zastaví se u T a S1 nukleáza pak odštěpí sled **b** atd. Tento způsob je popsán v publikaci A. Kornberg, DNA Synthesis, str. 87 až 88, W. H. Freeman a Co., San Francisco (1974).

S výhodou je možno jednoduchým způsobem postupovat tak, že se vytvoří místo pro působení restrikčního 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**, 4268 (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 restrikční 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 restrikčního enzymu odlišuje jedinou bází, což je staticky velmi pravděpodobné, je možno tuto bázi nahradit tak, že se získá cDNA, která obsahuje správnou bázi a tedy žádané místo pro působení restrikčního enzymu. Štěpením 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 restriktivního enzymu nebo včlenit několik míst nebo postupně vytvořit restriktivní 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 jinou, 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 průchodu 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 kódového 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 žadaného polypeptidu, avšak při vlastní expresi by 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:

glukoson,
gastrointestineální inhibiční polypeptid,
polypeptid ze slinivky břišní,
adrenokortikotropní hormon,
 β -endorfiny,
interferon,
urokináza,
faktory, ovlivňující srážení krve,
lidský albumín 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 dvojíým řetězcem („ds“) bylo připraveno z 5 μ g této RNA způsobem, popsáným v publikaci Wickens a další, *J. Biol.* **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 restričních endonukleáz v restričním 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 hormonu poskytuje fragment DNA o 551 bází (bp), který je kódem pro aminokyseliny 24 až 191 růstového hormonu. Tímto způsobem bylo zpracováno 90 ng cDNA enzymem Hae III, načež byla provedena elektroforéza na 8% polyakrylamidovém gelu a oblast při 550 bp byla vymyta. Tímto způsobem byl získán přibližně 1 ng cDNA.

Plazmid pBR 322 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 plazmid byl plně popsán v publikaci J. G. Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Symposium* **43**, 70 (1978), jde o replikace-schopný plazmid, 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 restričních 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 plazmidu enzymem Pst I a po působení enzymu Hae III na transkript mRNA, fragment cDNA se včlení do plazmidu pBR 322 v místě po štěpení enzymů 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 desoxynukleotidytransferázy (TdT) k připojení přibližně 20 zbytků dC k 3'-zakončení, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Chang A. C. Y. 60 ng plazmidu pBR 322 po působení enzymu Pst I bylo spojeno s přibližně 10 zbytky dC s vektorem DNA se zbytky dC, které bylo provedeno ve 130 μ l 10 mmolů Tris-HCl s pH 7,5, 100 mmolů NaCl, 0,25 mmolů EDTA byla směs zahřívána na 70 stupňů Celsia, nechala se vychladnout 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 plazmidu

pHGH 31, klonovaného v x 1776 způsobem, popsaným v publikaci Maxam a Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977). Potvrdila kodony pro aminokyseliny 24, až 191. růstového hormonu, jak je znázorněno na obr. 3. 1. klonování v Escherichia coli

Escherichia coli K-12 kmen x 1776 má genotyp: E^- tonA53, dapB8, minA1, supE42, Δ 40 (gal-uvrB) λ^- minB2, rfb-2, nalA25, oms-2, thyA57*, metC65, oms-1, Δ 29, (bioH, sad) cysB2, cycA1, hsdR2. Kmen x 1776 byl poskytnut National Institutes of Health jako EK2 vektor.

Kmen x 1776 potřebuje ke svému růstu kyselinu diaminopimelovou (DAP) a není schopen syntetizovat mukopolysacharid, kyselinu kolonovou, dochází tedy k omezení jeho růstu nebo k jeho eliminaci v prostředí, kde se kyselina diaminopimelová nevyskytuje, avšak prostředí jinak obsahující dostatečné množství živin pro buněčný metabolismus a růst. Kmen také vyžaduje přítomnost thyminu nebo thymidinu a dochází k rozkladu jeho DNA v případě, že živině prostředí neposahuje thymin a thymidin, i když obsahuje dostatečné množství živin pro metabolickou účinnost. Kmen x 1776 je velmi citlivý na přítomnost žluči a není schopen přežít v zažívací soustavě krysy. Tento kmen je také nesmírně citlivý na smáčedla, antibiotika a jiné láčiva 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 x 1776 je však odolný proti různým fágům a je velmi obtížné včlenit různé plazmidy vzhledem k přítomnosti různých mutací. Tento kmen je odolný proti kyselině nalidixinové, cykloserinu a trimethoprimu. Tyto látky se tedy mohou přidávat k živnému prostředí k řízení růstu tohoto kmene a k jeho ochraně proti kontaminaci jinými kmeny v průběhu transformace.

Kmen x 1776 má generační dobu přibližně 50 minut v živném prostředí. Lze ho v prostředí Penassay při přidání 100 μ g DAP/ml a 1 μ g thymidinu/ml a dosahuje konečné hustoty 8 až 10 $\times 10^8$ buněk/ml ve statické nádobě, fázi. Opatrné míchání a třepání kultury po dobu 1 až 2 minut zajistí rovnoměrnou suspenzi buněk, která si uchovává 100% životnost. Další podrobnosti týkající se kmene x 1776 je možno získat v publikaci R. Curtis a další, Molecular Cloning of Recombinant DNA, 99 až 177, Scott a Qermer, eds, Academic Press (N.Y. 1977). Kmen x 1776 byl uložen ve sbírce American Type Culture Collection (3. července 1979, ATCC 31 537) a je k dispozici bez omezení.

2. Konstrukce a klonování syntetického fragmentu genu (obr. 1 a 2). Abychom mohli klonovat syntetický fragment genu pro první 24 aminokyselin lidského růstového hormonu obsahuje místo pro štěpení enzymem Hae III za aminokyselinou 23. Distální konce syntetického fragmentu je opatřen skupinou, která dovoluje jeho připojení k jednoduchému řetězci, který se získá tím, že se štěpí restrikční endonukleázou plazmid, kterémuž bude připojen transkript mRNA spolu se syntetickým fragmentem, obr. 3.

Jak je znázorněno na obr. 4, zakončení dvojitého fragmentu má zakončení pro působení restrikčních endonukleáz (Eco RI a Hind III), aby byla usnadněna konstrukce plazmidu. Kodon pro methionin na levém konci je zároveň místem pro počátek translace. Dvanáct různých oligonukleotidů, obsahujících 11 až 16 bází, bylo syntetizováno zlepšenou fosfortriesterovou metodou, popsanou v publikaci Crea, R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 51765 (1978). Tyto oligonukleotidy U4 až U6 a L1 až L4 jsou označeny šipkami, které indikují místo, kde byla fosforylována při použití T4 polynukleotidkinázy a (γ - 32 P)ATP známým způsobem popsaným v publikaci Goeddel, D. V. a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1065 (1979) metodou myn. Byly provedeny tři oddělené reakce, katalyzované T4 ligázou (10 μ g 5'-OH fragmentu U1 bylo spojeno s fosforylovaným U2, U3 a L6, fosforylovaná U3, U4, L3 a L4 byly spojeny a 10 μ g 5'-OH fragmentu L1 bylo spojeno s fosforylovaným L2, U5 a U6. Tyto vazné reakce byly prováděny při teplotě 4 °C po dobu 6 hodin ve 800 μ l 20 mmol/l Tris-HCl o pH 7,5, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l dithiothreitolu, 0,5 mmol ATP při použití 100 jednotek T4 ligázy. Tři reakční směsi pak byly slity, bylo přidáno 100 jednotek T4 ligázy a reakce probíhala 12 hodin při teplotě 20 °C. Směs byla vysrážena ethanollem a byla provedena elektroforéza na 10 procentním polyakrylamidovém gelu. Páry označující fragmenty s 84 páry bází byly vymyty z gelu a oddělené vymýváním 1 μ g plazmidu pBR 322 byl zpracován působením enzymu Eco RI 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, thr⁺, his⁺, trp⁺, hsr⁺, hsm⁺). Kmen 294 byl uložen 30. října 1978 v American Type Culture Collection (ATCC č. 31 446) a je k dispozici bez omezení. Při analýze sledu způsobem podle svrhu uvedené publikace Maxama a Gilberta včleněného úseku po působení restrikčních endonukleáz Eco RI a Hind III na plazmid pHGH 31 potvrdila strukturu z obr. 1 a 2.

3. Konstrukce plazmidu v pro bakteriální (SV40) vektor. Abychom mohli klonovat syntetický fragment genu pro první 24 aminokyselin lidského růstového hormonu obsahuje místo pro štěpení enzymem Hae III za aminokyselinou 23. Distální konce syntetického fragmentu je opatřen skupinou, která dovoluje jeho připojení k jednoduchému řetězci, který se získá tím, že se štěpí restrikční endonukleázou plazmid, kterémuž bude připojen transkript mRNA spolu se syntetickým fragmentem, obr. 3. Jak je znázorněno na obr. 4, zakončení dvojitého fragmentu má zakončení pro působení restrikčních endonukleáz (Eco RI a Hind III), aby byla usnadněna konstrukce plazmidu. Kodon pro methionin na levém konci je zároveň místem pro počátek translace. Dvanáct různých oligonukleotidů, obsahujících 11 až 16 bází, bylo syntetizováno zlepšenou fosfortriesterovou metodou, popsanou v publikaci Crea, R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 51765 (1978). Tyto oligonukleotidy U4 až U6 a L1 až L4 jsou označeny šipkami, které indikují místo, kde byla fosforylována při použití T4 polynukleotidkinázy a (γ - 32 P)ATP známým způsobem popsaným v publikaci Goeddel, D. V. a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1065 (1979) metodou myn. Byly provedeny tři oddělené reakce, katalyzované T4 ligázou (10 μ g 5'-OH fragmentu U1 bylo spojeno s fosforylovaným U2, U3 a L6, fosforylovaná U3, U4, L3 a L4 byly spojeny a 10 μ g 5'-OH fragmentu L1 bylo spojeno s fosforylovaným L2, U5 a U6. Tyto vazné reakce byly prováděny při teplotě 4 °C po dobu 6 hodin ve 800 μ l 20 mmol/l Tris-HCl o pH 7,5, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l dithiothreitolu, 0,5 mmol ATP při použití 100 jednotek T4 ligázy. Tři reakční směsi pak byly slity, bylo přidáno 100 jednotek T4 ligázy a reakce probíhala 12 hodin při teplotě 20 °C. Směs byla vysrážena ethanollem a byla provedena elektroforéza na 10 procentním polyakrylamidovém gelu. Páry označující fragmenty s 84 páry bází byly vymyty z gelu a oddělené vymýváním 1 μ g plazmidu pBR 322 byl zpracován působením enzymu Eco RI 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, thr⁺, his⁺, trp⁺, hsr⁺, hsm⁺). Kmen 294 byl uložen 30. října 1978 v American Type Culture Collection (ATCC č. 31 446) a je k dispozici bez omezení. Při analýze sledu způsobem podle svrhu uvedené publikace Maxama a Gilberta včleněného úseku po působení restrikčních endonukleáz Eco RI a Hind III na plazmid pHGH 31 potvrdila strukturu z obr. 1 a 2.

nt) expresi lidského růstového hormonu (obr. 5) a v tomto případě (obr. 6) zhotovili v roce 1971 v Escherichia coli kulturu (SVT) pro použití syntetického fragmentu pGH 13 a: MRN antisériptur v pGH 81 byl konstruován replikace schopný plazmid, který obsahoval oba fragmenty, ale pGH pozůstal plazmid pGH 6, jak je znázorněno na obr. 5. Tento plazmid, který obsahuje spojebné lacio-promotory byl podroben konstruování následujícího způsobem. Fragment o 283 párech bází po působení endonukleázy Eco RI obsahem 95 pářů bází UV5 lacio-promotory, oddělených 95 pářů bází tetrahydro-DNA fragmentu byl izolován z plazmidu pK8268 způsobem podle publikace Kovacka a další: Cell, sv. 13, 65, v. 1, 171 (1978). Fragment o 285 párech bází byl vložen do místa pro štěpení enzymem Eco RI v plazmidu pBR322 a klon pGH byl izolován pomocí promotoru a odlišovaným správným směrem vzhledem ke genu pro odolnost proti tetracyklinu. Místo pro působení enzymu Eco RI v místě štěpení vzhledem ke genu bylo v tomto případě na 540 pářů bází po působení enzymu Eco RI fragment byl izolován pomocí DNA polymerazy. Následným spojením vzniklých zakončení. Výsledný plazmid pGH 6 obsahující jedině místo pro působení enzymu Eco RI v místě štěpení podle vzhledem ke promotoru, což toto místo je možné vložit úplný gen pro lidský růstový hormonový hormon. K získání syntetického fragmentu bylo spojení s antisériptem RNA bylo rozštěpeno 110 µg plazmidu pGH 13 působením enzymu Eco RI a Haen III a fragment o 77 pářů bází obsahující lidského růstového hormonu byl izolován na 6% polyakrylamidovém gelu. Vykoupeno od 500 µg fragmentu 15 µg plazmidu pGH 13 bylo rozštěpeno enzymem Haen III. Sled lidského růstového hormonu o 551 pářů bází a fragment po štěpení plazmidu pBR322 enzymem Haen III o 540 pářů bází byly čištěny elektroforézou na gelu. Po štěpení působením enzymu Xma I byl odštěpen buze sled lidského růstového hormonu, který odštěpil 39 pářů bází od oblasti blízkosti zakončení, který rábnebyla odštěpeno od hormonu. Všechny fragmenty o 512 pářů bází byly odděleny od fragmentu o 540 pářů bází, odštěpaného z plazmidu pBR322 štěpením enzymu Haen III elektroforézou na 6% polyakrylamidovém gelu. 0,3 µg fragmentu o 77 pářů bází po štěpení enzymy Eco RI a Haen III bylo polymerováno působením T4 ligázy v 16 µl 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 frag-

ment o 591 pářů bází se zakončeními vzniklými po působení enzymu Eco RI zakončení po působení enzymu Sma I měla byla schopna se opět vázat na čištění na 6% polyakrylamidovém gelu, bylo získáno přibližně 130 µg tohoto fragmentu. Jednotlivé plazmidy pGH 6 neobsahují místo pro působení enzymu Xma I a druhé straně místo pro působení enzymu Sma I je totéž jako pro působení enzymu Xma I, avšak rozdělení probíhá v prostředí tohoto místa a vzniklá zakončení nejsou schopna se navzájem opět vázat. Toto znamená, že fragment po rozštěpení enzymem Sma I získaný štěpením plazmidu pGH 13 je možno navázat na plazmid pGH 6, čímž vznikne plazmid pGH 6, který obsahuje promotory lacio-UV5 byl postupně zpracováván působením enzymu Hind III, nukleázy S1 a Eco RI a byl čištěn elektroforézou na gelu, 500 µg výsledného vektoru, který obsahoval jedno místo pro působení enzymu Eco RI a jedno zakončení bylo vázáno na 0,1 µg DNA lidského růstového hormonu o 591 pářů bází. Tato směs byla použita k transformaci Escherichia coli kmene x1 776. Kolonie byly izolovány s ohledem na růst na prostředí, které obsahovalo 12,5 µg tetracyklinu/ml. Je nutno uvést, že včlenění hybridního genu pro lidský růstový hormon do plazmidu pGH 6 zničilo promotory pro odolnost proti tetracyklinu, avšak svrchu uvedený lacio-promotor dává správné odečtení strukturalního genu pro odolnost proti tetracyklinu, takže tato vlastnost umožňuje správnou selekci kolonií je zachována. Tímto způsobem bylo získáno přibližně 400 transformantů. Při hybridizaci podle publikace Gmunstein a Hogness, (Proc Natl Acad Sci USA, 72, 13, 961 (1975)) bylo prokazáno 12 kolonií, které obsahovaly sled pro lidský růstový hormon. Plazmidy, izolované ze všech těchto kolonií, měly požadované místo pro štěpení enzymem Haen III. Byly rovněž stanoveny DNA sledy pro jeden klon plazmidu pGH 107 pro lidský růstový hormon, k jehož expresi došlo transformantů, bylo možno snadno zjistit v přímu, radioimunologickou zkouškou, která byla provedena na vředovacích sériích supernatantů rozrušených buněk při použití zkoušky sestavy pGH-PRIST (Farmacia) v důsledku toho, že pGH byl v A by bylo možno prokázat, že exprese lidského růstového hormonu je řízena lac promotorem, byl transformován plazmid pGH 107 do Escherichia coli kmene D1210 [lac+(10+z'y+)], u něhož dochází k nadprodukcí lac represoru. Dosažené hladiny exprese lidského růstového hormonu není možno prokázat dříve než po přidání IPTC (isopropylthiogalaktosid).

Odstraněním místa pro působení enzymu Eco RI v plazmidu pGH 107 byl oddělen ATG signál pro start v téže vzdálenosti od kodonů, vážících ribosom 1 lac promotoru.

ru, jako je tomu v přírodním stavu a současně signál pro start pro β -galaktosidázu. Aby bylo možno zjistit, zda by exprese byla zvýšena napodobením tohoto přírodního stavu, byl převeden plazmid pGH 107 na plazmid pGH107-1 otevřením působením enzymu Eco RI a působením S1 endonukleázy na výsledné jednoduché řetězce s obnovou kruhu působením T4 ligázy. Přestože výsledný plazmid bylo možno použít k dosažení exprese lidského růstového hormonu, nebyla tato exprese vyšší než při použití plazmidu pGH 107, jak bylo možno prokázat přímou 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, plazmidu, tak do volby výsledného polypeptidu a podobně. Je možno například užít jiné promotory, jako jsou promotor 1 ambda, operon pro arabinózu (ϕ 80 d 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 *Haemophilus influenzae*. Je samozřejmé, 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 x 1776 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 Pro⁻Leu⁻Thi⁻R_B⁻-recA⁺-Str^r 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* K 12, 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 30. října 1978 v American Type Culture Collection pod číslem ATCC 31 343 a je dosažitelná bez omezení. Kultura kmene x 1776 byla uložena v téže sbírce 3. července 1979 pod číslem ATCC 31 537. 3. července 1979 byl rovněž v téže sbírce uložen plazmid pGH107 pod číslem ATCC 31 538 a *Escherichia coli* K12 kmen 294, transformovaný pGHG 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 $\pm$ 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 růstu 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 polyethylaninem, nebo gelovou filtrací na gelu Sephakryl S-200, iontoměničovou chromatografií na pryskyřici Biorex-70 nebo GM Sephadex, frakcionací síranem amonným nebo změnou pH a popřípadě chromatografií při použití protilátka proti antiimunoglobulinu proti uvedenému hormonu ze senzibilizovaných zvířat nebo hybridů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob konstrukce replikovatelného prostředku pro klonování pro expresi lidského růstového organismu v mikrobiálním organismu, přičemž se včleňuje gen, který je kódem pro lidský růstový hormon do prostředku pro klonování za řízení 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, která obsahuje volnou aminokyselinu a tyto fragmenty se uloží ve správné vzájemné fázi do replikovatelného prostředku pro klonování za řízení promotoru pro expresi a za vzniku replikovatelného prostředku pro klonování pro expresi sledu aminokyselin lidského růstového hormonu bez zevní konjugované bílkoviny.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se volí fragmenty pro podstatnou část genu pro lidský růstový hormon s obsahem DKA nebo z materiálu po její replikaci.

3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se užije plazmidu, odolného alespoň proti jednomu antibiotiku.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že se užije plazmidu, prostého promotoru pro odolnost proti tetracyklinu, avšak odolného proti tetracyklinu.

5. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že po uložení do plazmidu je gen pro lidský růstový hormon řízen lac-promotory.

6. Způsob podle bodu 5, vyznačující se tím, že se jako plazmidu užije plazmidu pGH107.

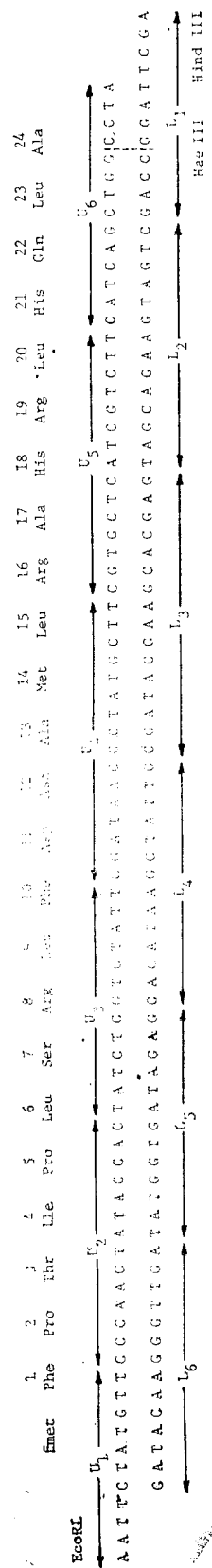
7. Způsob podle bodu 5, vyznačující se tím, že se jako plazmidu užije plazmidu pGH107-1.

8. Způsob konstrukce replikovatelného prostředku pro klonování, 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 restričních enzymů za vzniku zakončení různého typu po rozštěpení a za správného včlenění heterologní DNA do těchto míst pod řízením uvedeného systému promotoru.

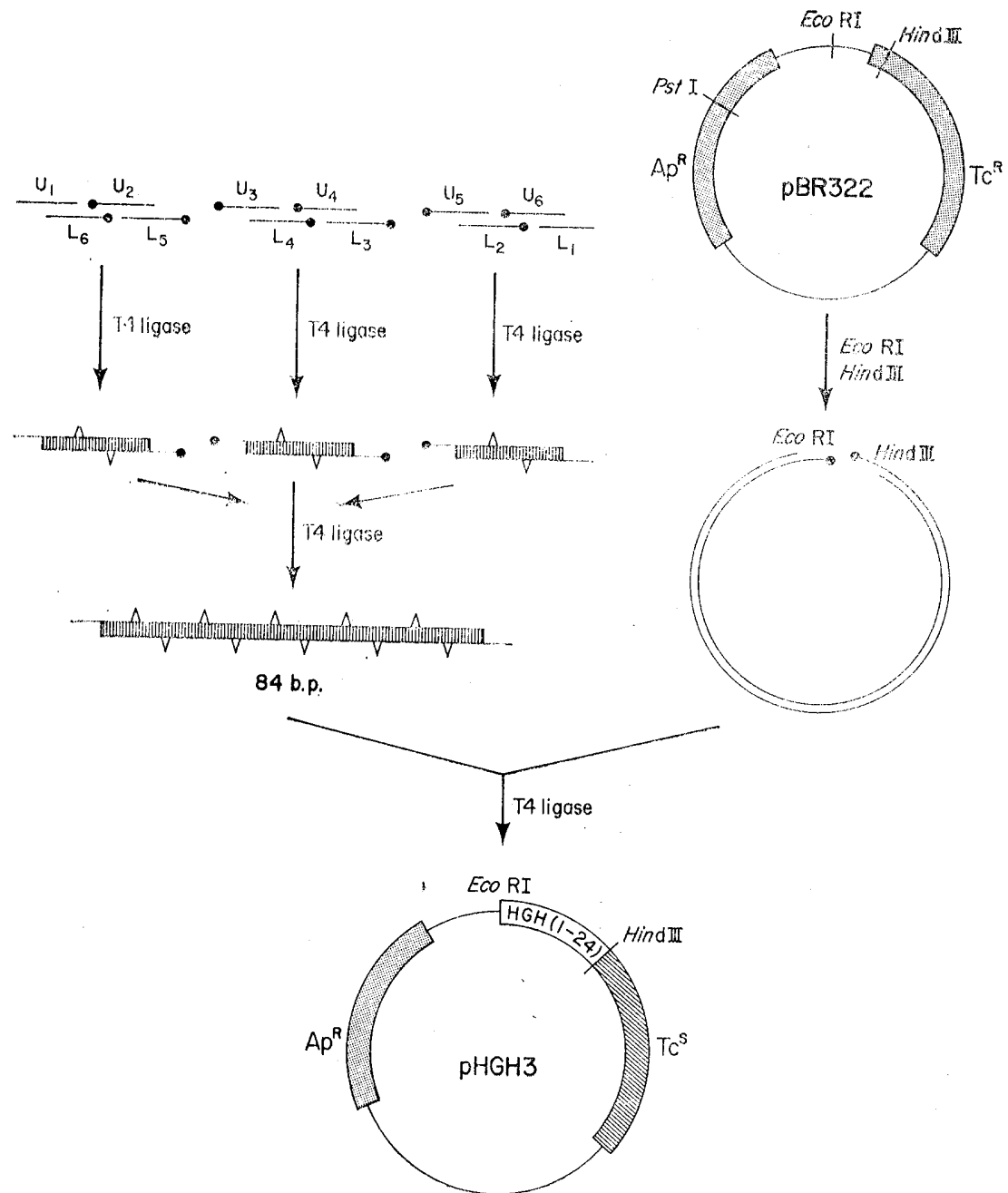
9. Způsob podle bodu 8, vyznačující se tím, že se jako prostředku pro klonování užije plazmidu pGH6.

5 listů výkresů

HGH (1-24)



Obr. 1.



24
 Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Gln Phe Gln Ala Tyr Ile Pro Lys Gln Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser
 5'...G GGC UUU GAC ACC UAC CAG CAG UUU GAA GAA GAA CCA AAG CAG AAG UAU UCA UUC CUC CAG AAC CCC CAG ACC UCC
 Pst I
 80

Leu Cys Phe Ser Gln Ser Ile Pro Thr Pro Ser Arg Arg Gln Gln Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Gln Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu
 CCC UGU UUC UCA GAG UCU AUC CCG ACA CCG UCC UCC UCC GAG GAA ACA CAA CAG AAA UCC AAC CUA GAC CUC CUC CCC AUG UCC CUC GUG
 100

Leu Ile Gln Ser Trp Leu Gln 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 UCG CUG CAG CCC GUG CAG UUC CUC AGG AGU GUC UUC GCC AAC AGC CUA GUG UAC GGC GCC UCU GAC AGC AAC GUC UAU
 120

Asp Leu Leu Lys Asp Leu Gln Gln Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Gln Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln
 GAC CUC CUA AAG GAC CUA GAG GAA GGC AUC CAA ACC CUG AUG GCG AGG CUG GAA GAU CCG ACC CCG ACC GGG CAG AUC UUC AAG CAG
 140

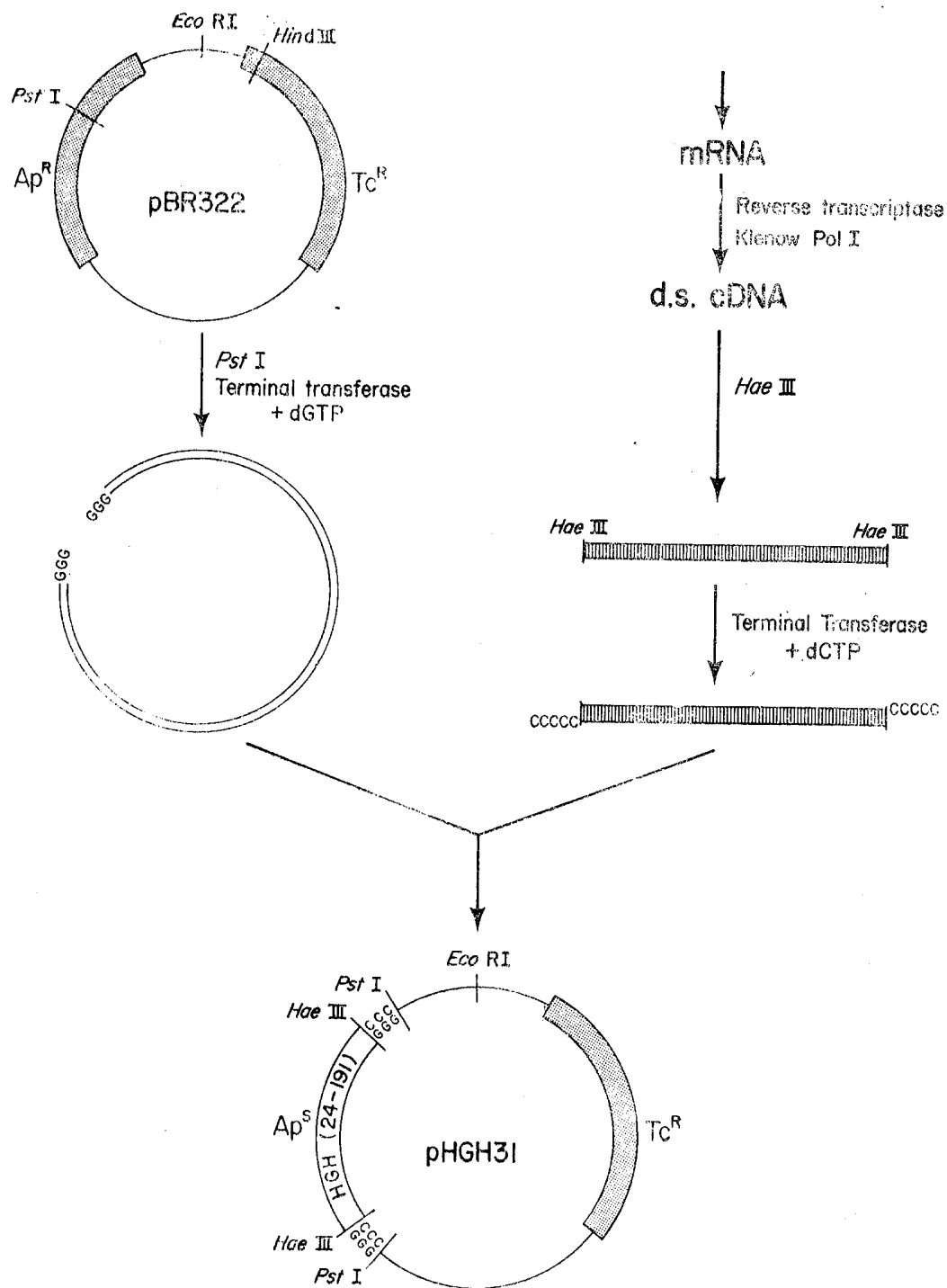
Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp
 ACC UAC ACC AAG UUC GAC ACA AAC UCA CAC AAC GAA GAC CCA CUA CUC AAG AAC UAC GCG CUG CUC UAC UCC UUC AGG AAG GAC AUG GAC
 160

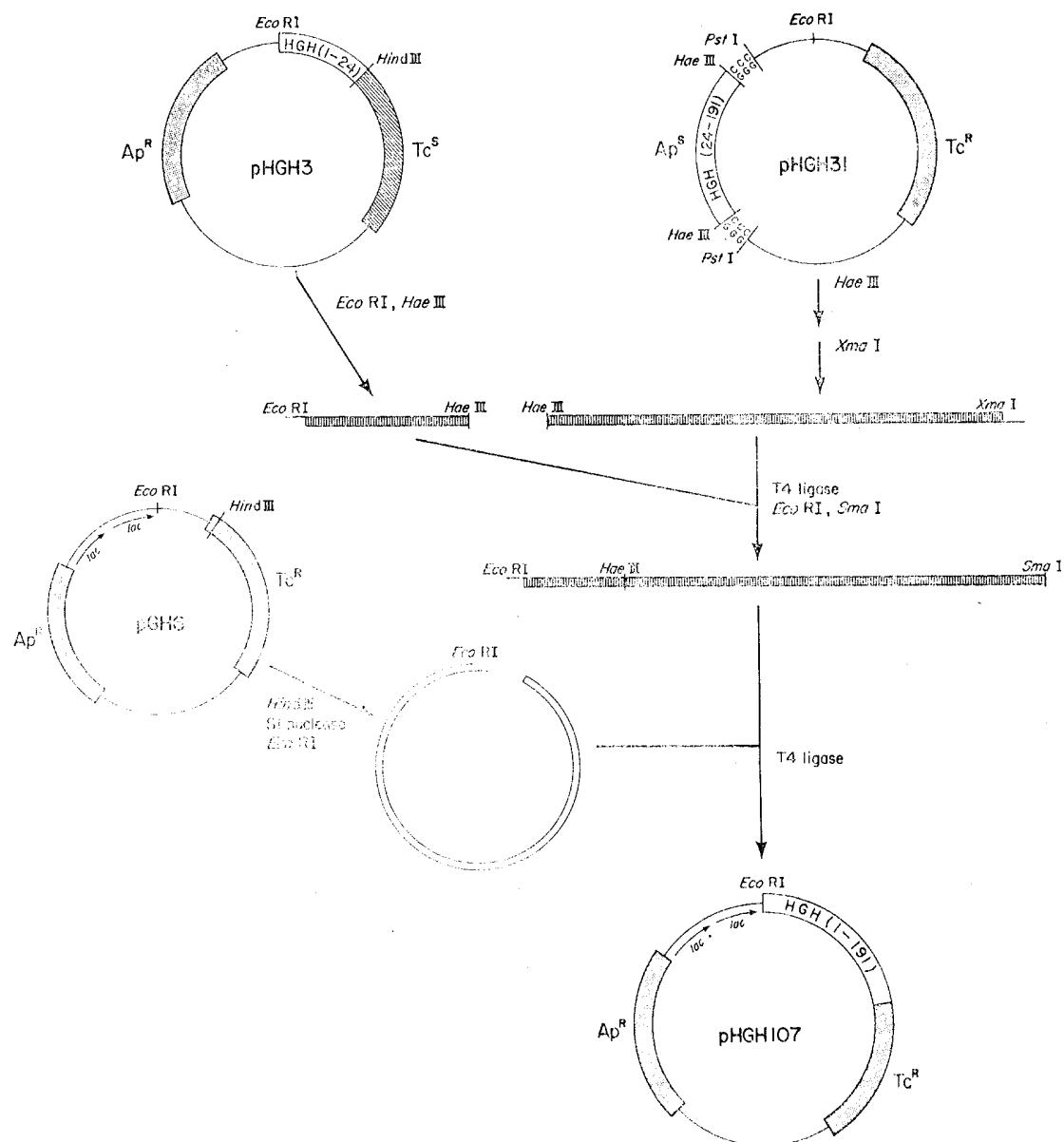
Lys Val Gln Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Gln Gly Ser Cys Gly Phe Stop
 AAG GUC GAG ACA UUC UUG CGC AUC CUG CAG UGC CGC UCU GUG GAC CGC ACC UGU GGC UUC UAG CUGCCCGGUGCCAUCCUUGUGACCCUCCCCAGU
 Pvu II
 180

191
 Sma I
 Xba I

GGCUCUCUUGGCC....3'
 Hae III

Oct. 3.





Obr. 5.