



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

238612

(11)

(B2)

(22) Přihlášeno 23 03 81

(21) (PV 2106-81)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 24 03 80
(133296) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 16 01 85

(45) Vydáno 15 05 87

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00
C 07 K 7/04
(C 07 K 7/04,
7/26, 7/40)
//A 61 K 37/24

(72)

Autor vynálezu

KLEID DENNIS G., SAN MATEO, YANSURA DANIEL G., SAN FRANCISCO,
HEYNEKER HERBERT L., BURLINGAME (Sp. st. a.),
MIOZZARI GIUSEPPE F., AUGARTEN-RHEINFELDER (Švýcarsko)

(73)

Majitel patentu

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

(54) Způsob výroby polypeptidického produktu

1

Nástup technologie využívající rekombinované kyseliny desoxyribonukleové (=DNA) umožnil kontrolovanou bakteriální produkci enormní řady užitečných polypeptidů. V současné době jsou již k dispozici bakterie modifikované touto technologií, které umožňují výrobu takových polypeptidických produktů, jako jsou somatostatin [viz K. Itakura a spolupracovníci, Science 198, 1056 (1977)], komponenty A a B řetězců lidského insulínu [viz D. V. Goeddel a spolupracovníci, Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA 76, 106 (1979)] a lidský růstový hormon [viz D. V. Goeddel a spolupracovníci, Nature 281, 544 (1979)]. Nověji bylo rekombinačních DNA technologií použito k bakteriální produkci thymosinu alfa 1, imunopotenciální substance produkované thymem [publikovaná přihláška evropského patentu č. 0 035 454].

Význam této technologie je tak velký, že bakteriálně lze skutečně vyrábět každý potřebný polypeptid, přičemž je v dosahu kontrolovaná výroba hormonů, enzymů, protilátek a vakcín proti nejrůznějším onemocněním. Citované publikace, ve kterých jsou podrobněji popsány shora uvedené typické příklady bakteriální výroby polypeptidů, jsou na tomto místě uváděny, stejně tak jako další níže uvedené publikace, za účelem bližšího objasnění podstaty vynálezu.

2

Výkonným útvarem rekombinační DNA technologie je plasmid, chromosomů prostá smyčka dvouvláknové DNA nalezená v bakteriích, často v mnohonásobných kopiích v jedné bakteriální buňce. V informaci zakódované v plasmidické DNA jest včleněna informace potřebná k reprodukci plasmidu do dceřinné buňky (tzv. „replikón“) a obvykle jedna nebo více selekčních charakteristik, jako je rezistence vůči antibiotikům, které umožňují, že klony hostitelské buňky obsahující plasmid, který je předmětem našeho zájmu, mohou být rozpoznány, selektivně vybrány a přednostně pěstovány v selektivním růstovém prostředí.

Užitečnost bakteriálních plasmidů spočívá ve skutečnosti, že lze specificky štěpit jednou nebo druhou restriční endonukleázou neboli „restričním enzymem“, přičemž každá z těchto endonukleáz rozpoznává na plasmidické DNA odlišné místo. Po rozštěpení lze vpravit do plasmidu heterologické geny nebo fragmenty genů buď přímým připojením v místě rozštěpení, nebo připojením na rekonstruovaných koncích sousedících s místem rozštěpení. Pod pojme „heterologický“ používaným v popisu vynálezu se rozumí gen, který se obvykle nenachází v bakteriích E. coli, nebo polypeptidická sekvence, která není těmito bakteriemi obvykle produková-

na, zatímco pojem „homologický“ se vztahuje na gen nebo polypeptid, který je produkován divoce rostoucím typem bakterií *E. coli*. Rekombinace DNA se provádí vně bakterií, ale vzniklý „rekombinovaný“ plasmid lze zavést do bakterií postupem známým jako transformace a kultivací získaného transformantu lze připravit velká množství rekombinovaného plasmidu obsahujícího heterologický gen. Kromě toho, podle toho kam se gen vhodně zavede vzhledem k částem plasmidu, které řídí transkripci („přepis“) a translaci („překlad“) zakódovaných DNA informací, lze získaný vylučovací prostředek použít k aktuální produkci polypeptické sekvence, pro kterou je vestavěný gen kódován; tento postup se v popisu vynálezu označuje jako vylučovací (exprese).

Expresce je iniciována v oblasti známé jako promotor, která se vyznačuje tím, že je místem připojení RNA-polymerázy. V některých případech, jako v níže diskutovaném případě tryptofanového (*trp*) operónu, jsou oblasti promotoru překryty oblastmi „operátoru“ a vytváří se kombinovaný promotor-operátor. Operátory jsou sekvence DNA, které lze rozpoznat přítomností tak zvaných represorových proteinů, které slouží k regulování frekvence iniciace transkripce u specifického promotoru. Polymeráza se pohybuje podél řetězce DNA, transkribuje informace obsažené v kódovacím vlákně DNA z jeho 5' místa na 3' konec informační kyseliny ribonukleové (m-RNA) a tyto informace ihned překládá do polypeptidické sekvence, která má takové pořadí aminokyselin, které je v DNA zakódované. Každá aminokyselina je zakódována jediným tripletem nukleotidů, neboli „kodónem“, pro který je v popisu vynálezu používán termín „strukturální gen“ a označuje tu část DNA, ve které je zakódována sekvence aminokyselin vyloučeného peptidického produktu. Poté, co se RNA-polymeráza naváže na promotor, transkribuje nejprve nukleotidy kódování na ribozómové vazebné místo, pak dojde k iniciaci translace neboli k signálu „start“ (obvykle kodónem ATG, který se ve vzniklé informační RNA stane AUG) a poté k translaci nukleotidických kodónů do samotného strukturálního genu. Na konec strukturálního genu se transkribují tak zvané stop-kodóny a polymeráza může poté vytvářet další sekvenci informační RNA, která vzhledem k přítomnosti stop-signálu zůstává nepřenesena do ribozómů.

Ribozómy se naváží na vazebné místo připravené na informační RNA, v bakteriích obvykle poté, co se mRNA vytvoří, a samy produkují polypeptidy podle zakódované sekvence, počínaje start signálem translace a konče zmíněným stop signálem. Žádaný produkt se tvoří jen tehdy, když jsou sekvence kódující vazebné místo ribozómů umístěny správně vzhledem k AUG iniciačnímu kodónu a když všechny zbývající kodóny následují za iniciačním kodónem ve fázi. Vzniklý

produkt lze získat lýzou hostitelské buňky a jeho oddělením od ostatních bílkovin vhodnou čisticí metodou.

Polypeptidy získané expresí za použití rekombinační DNA technologie mohou být zcela heterologické, jako v případě přímého vylučování lidského růstového hormonu, nebo se alternativně mohou skládat z heterologického polypeptidu, na který je navázána (fúována) alespoň část aminokyselinové sekvence homologického peptidu, jako v případě přípravy meziproduktů pro somatostatín a složek lidského insulinu. V posléze uvedeném případě obsahuje například homologický peptid navázanou část aminokyselinové sekvence pro betagalaktosidázu. V takových případech je žádaný bioaktivní produkt biologicky inaktivován navázaným homologickým polypeptidem do té doby, dokud není posléze uvedený peptid odštěpen působením extracelulárních prostředků. Fúované bílkoviny, jako ty, které byly zmíněny výše, lze pokládat za prekursory žádaných bílkovin, které se z nich dají získat vysoce specifickým štěpením, jako například působením bromkyanu, obsahují-li methionin, nebo alternativně enzymatickým štěpením; viz například britský patent č. 2 007 676 A.

Má-li rekombinační DNA technologie splnit očekávané naděje, musí se nalézt systémy, které optimalizují expresi vložených genů a umožňují získávat žádané polypeptidické produkty ve vysokých výtěžcích. Beta-laktamázové a laktózoové promotor-operátorové systémy, kterých se v minulosti nejběžněji používalo, poněvadž byly užitečné, nevyužívaly plně kapacitu technologie z hlediska výtěžků. Bylo třeba nalézt prostředek pro bakteriální vylučování peptidů, který by umožňoval kontrolovatelnou expresi žádaných polypeptidických produktů ve vysokých výtěžcích.

Tryptofan je aminokyselina produkovaná bakteriemi a používaná jimi jako komponenta homologických polypeptidů. Biosyntéza probíhá následujícím způsobem: kyselina chorismová → kyselina antranilová → kyselina fosforibosylantranilová → CDRP (enol-1-(o-karboxyfenylamino)-1-desoxy-D-ribulosa-5-fosfát) → indol-3-glycerolfosfát a posléze samotný tryptofan. Enzymatické reakce této biosyntézy jsou katalyzovány produkty tryptofanového operónu, což je polycistrónový úsek DNA, který je transkribován pod řízením *trp*-promotorového-operátorového systému. Vzniklá polycistrónová informační RNA kóduje tak zvané hlavní tryptofanové sekvence a pak, v níže uvedeném pořadí, polypeptidy označované zde jako *trp* E, *trp* D, *trp* C, *trp* B a *trp* A. Tyto polypeptidy v různé míře katalyzují a kontrolují individuální stupně biosyntézy tryptofanu z kyseliny chorismové.

V divokém typu bakterií *E. coli* je tryptofanový operón pod vlivem alespoň tří různých forem regulačních kontrol. V případě

represe promotoru-operátoru působí sám tryptofan jako korepresor, váže se na svůj aporepresor a vytváří aktivní represorový komplex, který se ihned poté váže na operátor a ukončuje biosyntézu v jejím celku. Za druhé, mechanismem inhibice zpětné vazby, se tryptofan váže na komplex trp E a trp D polypeptidů a zamezuje tím jejich účast na biosyntéze. Posléze se provádí regulace mechanismem, známým jako útlumový faktor, pod kontrolou „útlumové oblasti“ genu, oblasti, která je uvnitř hlavní trp-sekvence. Viz obecně G. F. Miozzari a spolupracovníci v časopise *J. Bacteriology* 133, 1457 (1978); monografie „The Operon“, str. 263 až 302, vydavatelé Miller a Reznikoff, Cold Spring Harbor Laboratory (1978); F. Lee a spolupracovníci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4365 (1977); a K. Bertrand a spolupracovníci, *J. Mol. Biol.* 103, 319 (1976). Zdá se, že stupeň útlumu je ovládán intracelulární koncentrací tryptofanu, a u divokého typu bakterií *E. coli* ukončuje útlumový článek expresi přibližně v devíti z desíti případů, pravděpodobně vytvářením sekundární struktury neboli „terminační smyčky“ v informační RNA, což má za následek, že se RNA-polymeráza předčasně vyprostí z připojení k DNA.

Jiní pracovníci použili trp-operon za účelem, aby získali nějaké měřítko pro expresi heterologických peptidů. Tento pracovní směr se pokouší řešit problémy represe a útlumu přidáváním kyseliny indolylakrylové, induktoru a analogu, který soutěží s tryptofanem a trp-represory v molekule, a směřují k vyvolání deprese pomocí kompetitivní inhibice. Induktor zmenšuje současně útlum inhibicí enzymatické konverze indolu na tryptofan, a tak účinně zbavuje buňky tryptofanu. Výsledkem je, že více polymeráz úspěšně transkribuje přes útlumový článek. Tento přístup se však zdá problematický z hlediska důsledného dokončení translace a provedení ve vysokém výtěžku, neboť syntéza bílkovinné sekvence obsahující tryptofan se předčasně ukončí v důsledku nedostatku využitelného tryptofanu. Účinné snížení útlumu při tomto přístupu jest ovšem úplně závislé na silném tryptofanovém hladovění.

Vynález se věnuje problémům spojeným s represí a útlumem biosyntézy tryptofanu odlišným způsobem.

Předmětem vynálezu je

- 1) způsob získávání plasmidických vylučovacích prostředků určených pro přímou expresi heterologických genů z trp-promotoru-operátoru,
- 2) způsoby získávání plasmidických vylučovacích prostředků určených pro expresi, z tryptofanového operátoru-promotoru, specificky štěpitelných polypeptidů kódovaných fúzemi homologických a heterologických genů a

- 3) způsob výroby heterologických polypeptidů bakteriální expresí, vyznačující se tím, že ho lze provádět kontrolovatelně, účinně a ve vysokých výtěžcích, a způsob výroby potřebných prostředků.

Podle vynálezu se provádí způsob výroby polypeptidického produktu, zcela heterologického nebo fúzované bílkoviny obsahující heterologický polypeptid, bakteriálním vylučováním strukturálního genu kódující zmíněný polypeptid, přičemž se připraví bakteriální inokulant transformovaný replikace schopným plasmidickým vylučovacím prostředkem a transformovaný inokulant se přenesle do fermentační nádoby a kultivuje se do dosažení předem určené hladiny.

Podstata způsobu podle vynálezu pak spočívá v tom, že se k transformaci bakteriálního inokulantu použije plasmidického vylučovacího dvojvláknového DNA a obsahujícího ve fázi od prvního 5' konce ke druhému 3' konci kódujícího vlákna bakteriální tryptofanový promotorový-operátorový systém, nukleotidy kódující na ribozómové vazebné místo pro translaci strukturálního genu kódujícího aminokyselinovou sekvenci heterologického polypeptidu a nukleotidy kódující startovací translační signál pro zahájení translace strukturálního genu kódujícího aminokyselinovou sekvenci heterologického polypeptidu, přičemž uvedená sekvence neobsahuje ani oblast pro trp útlumovou schopnost ani nukleotidy kódující na trp E ribozómové vazebné místo, a po kultivaci inokulantu v živném prostředí obsahujícím přídatný tryptofan v množství dostatečném k potlačení shora uvedeného promotorového-operátorového systému se získaná kultura bakterií zbaví přídatného tryptofanu a vyloučí se polypeptidický produkt.

Buňky se transformují přidáním plasmidů připravených způsobem podle vynálezu a obsahujících trp-promotor-operátor, kterým však chybí útlumový článek, a kultivují se v přítomnosti záměrně přidaného tryptofanu. Použití živného prostředí bohatého na tryptofan umožňuje, aby dostatek tryptofanu v podstatě úplně potlačil interakce trp promotor-operátoru s trp-represorem, takže růst buňek může postupovat bez inhibice předčasným vylučováním velkých množství heterologických polypeptidů zakódovaných ve vloženém genu, jinak pod kontrolou trp promotorového-operátorového systému. Když se rekombinovaná kultura vypěstuje na úroveň vhodnou pro průmyslovou produkci polypeptidu, vnější zdroj tryptofanu se naopak odstraní a buňky se nechají odkázány pouze na tryptofan, který mohou samy produkovat. Výsledkem je slabé omezení tryptofanu, v důsledku toho je potlačena biosyntéza a dojde k vysoce účinnému vylučování vloženého heterologického genu, nebráněné útlumem, protože útlumová oblast je ze systému vypuštěna. Tímto způsobem nejsou buňky nik-

dy příliš zbaveny tryptofanu a všechny bílkoviny, ať obsahují tryptofan nebo ne, mohou být produkovány ve vysokých výtěžcích.

Vynález rovněž zahrnuje způsoby štěpení dvojvláknové DNA vhodnými prostředky v kterémkoliv žádaném místě, dokonce i v nepřítomnosti restriktivního enzymového místa; uvedená pracovní technika jest vhodná, mimo jiné, k sestrojení trp-operonů majících deletovaný útlumový článek, a to jiným způsobem než byly získávány dříve selekcí mutantů.

Posléze vynález umožňuje výrobu různých užitečných meziproduktů a konečných produktů, včetně specificky štěpitelných heterologicky-homologických fúzovaných bílkovin, které jsou stabilizovány vůči odbourávání za podmínek vylučování.

Způsob podle vynálezu, jeho podstata a výhody jsou blíže objasněny v následujícím podrobném popisu a na přiložených výkresech na obr. 1 až 13.

Obr. 1 a 2 ilustrují výhodné schéma přípravy plasmidů schopných exprese heterologických genů ve formě fúzí s částí trp D polypeptidu; z těchto fúzovaných bílkovin je lze později specificky odštěpit.

Obr. 3 znázorňuje výsledek dělení buněčné bílkoviny obsahující homologické (trp D') a heterologické (somatostatin nebo thymosin α 1) fúzované bílkoviny, za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

Obr. 4, 5 a 6 znázorňují postupně stupně výhodného schématu pro sestrojení plasmidu schopného přímého vylučování heterologického genu (lidského růstového hormonu-HGH-gen) za kontroly trp promotorového-operátorového systému.

Obr. 7 znázorňuje výsledek dělení buněčné bílkoviny obsahující lidský růstový hormon (HGH) přímo vylučovaný za kontroly trp promotorového-operátorového systému, za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

Obr. 8, 9 (a až b) a 10 znázorňují postupně stupně výhodného schématu pro sestrojení plasmidů schopných vylučování heterologických genů (ve znázorněném případě somatostatinu) ve formě fúzí s částí trp E polypeptidu; z těchto fúzovaných bílkovin

lze heterologické peptidy později specificky odštěpit. Na obr. 9a (a) znamená 5' → 3' digesti komplementárního vlákna LE' strukturního genu lambda-exonukleázou, (b) znamená připojení oligonukleotidu 26, ³²pCCTGTGCATGAT na vzdálenější konec LE' kódujícího vlákna a (c) znamená Klenowovu polymerázu I (5' → 3' — polymeráza) + 4 dNTP (a 3' → 5' exonukleáza).

Obr. 11 znázorňuje výsledky dělení buněčné bílkoviny obsahující homologické (trp E) a heterologické fúzované bílkoviny vhodné pro produkci například somatostatinu, thymosinu alfa 1, lidského proinsulinu a A a B řetězců lidského insulinu, za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

Obr. 12 a 13 znázorňují postupně stupně způsobu, při kterém plasmid vytvořený postupem znázorněným na obr. 8 až 10 včetně je zpracován tak, aby vytvořil systém, ve kterém se mohou zaměnitelně vylučovat jiné heterologické geny ve formě fúzí s polypeptidickými sekvencemi trp E peptidu.

Na uvedených obrázcích jsou z důvodu jasnosti ilustrace zobrazeny ve většině případů jen kódovací řetězce dvojvláknového plasmidu a lineárních DNA. Geny kódující resistenci vůči antibiotikům jsou označeny ap^R (resistence vůči ampicilinu) a tc^R (resistence vůči tetracyklinu). Označení tc^S znamená gen pro tetracyklinovou resistenci, který není pod kontrolou promotorového-operátorového systému, takže plasmidy obsahující tento gen nemohou být nikdy citlivé na tetracyklin. Legenda „ap^S“ značí amplicilinovou citlivost vzniklou vynecháním části genu kódující amplicilinovou citlivost. Plasmidické promotory a operátory jsou označeny „p“ a „o“. Písmena A, T, G a C označují nukleotidy obsahující báze ademin, thymín, guanin a popřípadě cytosin. Význam dalších legend uvedených v obrázcích bude vysvětlen v následujícím textu.

Výhodná provedení způsobu podle vynálezu popsána níže zahrnují použití řady běžně dostupných restriktivních endonukleáz identifikovaných v dalším popisu; jejich odpovídající rozpoznávací sekvence a vzory štěpení (místa štěpení jsou označena šipkami) jsou znázorněny níže:

Označení endonukleázy	nukleotidové sekvence a místo štěpení	Označení endonukleázy	nukleotidové sekvence a místo štěpení
XbaI	↓ TCTAGA	TaqI	↓ TCGA
EcoRI	AGATCT ↑ ↓ GAATTC CTTAAG ↑	HindIII	AGCT ↓ ↑ AAGCTT TTCGAA ↑
BglII	↓ AGATCT	HpaI	↓ GTTAAC
PvuII	TCTAGA ↓ ↑ GAGCTG	PstI	CAATTG ↑ ↓ CTGCAG
BamHI	GTCGAC ↓ ↑ GGATCC CCTAGG ↑		GACGTC ↑

Když jsou body štěpení prostorově umístěny odděleně na příslušných řetězcích, jsou rozštěpené konce „lepivé“ (záchytné), tj. schopné opětovně anelace (uzavření kruhu) nebo schopné připojení na jiné komplementární DNA zakončené lepivým koncem, podle Watsonova-Crickova principu párování bází (A s T a G s C) na principu drážky a čepu. Některé restriční enzymy, jako shora uvedený HpaI a PvuII štěpí řetězec DNA za vzniku „otupených“ konců.

Shora uvedené nukleotidové sekvence jsou znázorněny v soulase s běžnými konvencemi: vrchní řetězec je řetězec kódující bílkoviny a při postupu z leva do prava po zmíněném řetězci jde o pohyb z jeho 5'-konce na 3'-konec, tj. ve směru transkripce od „blížešího“ ke „vzdálenějšímu“ bodu.

Posléze v soulase s konvencemi, symbol „Δ“ značí delecí (vynechání určité sekvence). Tak například označení plasmidu „ΔEcoRI-XbaI“ popisuje plasmid, ze kterého byla odstraněna nukleotidická sekvence mezi místy působení restričních enzymů EcoRI a XbaI digescí těmito enzymy. Pro lepší názornost jsou některé delecce označeny čísly. Tak například, počínaje prvním párem bází („bp“) rozpoznávacího místa enzymu EcoRI, který předchází genu pro tetracyklinovou resistenci v rodičovském plasmidu pBR322, značí „Δ1“ vynechání párů bp 1 až 30 (tj. ΔEcoRI až HindIII) a z toho vyplývající eliminaci tetracyklinového promotorového-operátorového systému; „Δ2“ značí delecí bp 1 až 375 (tj. ΔEcoRI až BamHI) a z toho vyplývající odstranění jak tetracyklinového

promotoru-operátoru, tak strukturálního genu, který kóduje tetracyklinovou resistenci; a „Δ3“ značí vynechání sledu bp 3611 až 4353 (tj. ΔPstI až EcoRI) a v důsledku toho eliminaci ampicilinové resistance. Symbolu „Δ4“ se používá k označení odstranění sekvence bp ~900 až ~1500 z trp operonového fragmentu 5 (viz obr. 1) a v důsledku toho eliminaci strukturálního genu pro polypeptid trp D.

Hlavní trp sekvence je vytvářena páry bází (bp) 1 až 162, počínaje od výchozího bodu pro trp mRNA. Čtrnáct aminokyselin uvedeného hlavního trp polypeptidu je zakódováno páry bp 27 až 71, následujících za ATG nukleotidy, které kódují startovní signál pro translaci. Oblast trp útlumového článku zahrnuje postupně GC-bohaté a AT-bohaté nukleotidové sekvence, ležící mezi bp 114 až 156, a útlum je zřejmě způsobován mRNA nukleotidy zakódovanými páry ~134 až 141 hlavní sekvence. Aby došlo k expresi heterologického polypeptidu za řízení trp hlavním ribozómovým vazebným místem a současně aby se zamezilo útlumu, musí být sledována následující kritéria:

1. páry bází 134 až 141 nebo ještě následující musí být vynechány;
2. ATG kodón vloženého genu musí být umístěn ve správné relaci vzhledem k ribozómovému vazebnému místu, jak je popsáno v literatuře [viz například kapitulu J. A. Steitze „Genetické signály a nukleotidické sekvence v informační RNA“ v monogra-

fii „Biological Regulation and Control“ (vydavatel R. Goldberger), Plenum Press, N. Y. (1978)];

3. mají-li být produkovány homologicko-heterologické fúzované bílkoviny, musí zůstat dostupný startovní signál pro translaci homologické polypeptidické sekvence, a kodóny pro homologickou část fúzované bílkoviny musí být včleněny ve fázi, aniž by zasahovaly do stop-signálu pro translaci.

Tak například vynecháním všech párů bází uvnitř hlavní sekvence, vzdálenějších od bp 70, se odstraní oblast útlumu, ponechá se ATG kodón, který kóduje startovní signál pro translaci a eliminuje se mezi nimi ležící stop-signál pro translaci kódovaný sekvencí TCA (bp 69 až 71), eliminací nukleotidu A a následujících nukleotidů. Vynechání takové sekvence má za následek expresi fúzovaných bílkovin začínajících hlavním polypeptidem a končících proteinem zakódovaným příslušnou heterologickou vložkou, a včetně vzdálenější oblasti jednoho z polypeptidů za vedoucím trp-operonem, určeného rozsahem vynechání sekvence ve směru k 3'-konci. Tak například vynechání zasahující do E genu vede k expresi homologického prekursoru obsahujícího sekvenci L a vzdálenější oblast sekvence E (za konečným bodem vynechané sekvence), fúzovaných se sekvencí kódovanou následující vložkou, a tak dále.

Dva zvláště vhodné plasmidy, ze kterých byla odstraněna oblast útlumu, jsou plasmidy pGM1 a pGM3; viz publikaci G. F. Mozziho a spolupracovníků v časopise J. Bacteriology 133, 1 457 (1978). Tyto plasmidy mají popřípadě delece trp Δ LE 1 413 a trp Δ LE 1 417 a vylučují (za kontroly trp-promotoru-operátoru) polypeptidy obsahující přibližně

prvních šest aminokyselin hlavní trp sekvence a a vzdálenější oblasti polypeptidu E.

V nejvýhodnějším případě, u plasmidu pGM1, je vylučována pouze asi poslední třetina polypeptidu E, zatímco plasmid pGM3 vylučuje téměř celou vzdálenější polovinu kodónů polypeptidu E. Bakterie E. coli K-12, kmen W 3 110 tna 2⁻trp⁻ 102 obsahující plasmid pGM1 jsou uloženy v americké sbírce typových kultur (American Type Culture Collection) pod označením ATCC číslo 31 622. Plasmid pGM1 se může z uvedeného kmene odstranit obvyklým způsobem a lze ho pak používat v níže popsanych postupech.

Alternativně lze delece některých sekvencí provádět způsoby podle vynálezu, které umožňují specifické štěpení dvojvláknového DNA na kterémkoliv žádaném místě. Jeden příklad této štěpicí pracovní techniky je zřejmý z příkladu 4 uvedeného níže. Tak například se dvojvláknová DNA rozdělí na jednotlivá vlákna DNA v okolí oblasti zamýšleného místa štěpení, například reakcí s lambda-exonukleázou. K takto předem vytvořené jednovláknové části DNA se pak hybridizuje syntetický nebo jiný jednovláknový DNA primér, pomocí Watsonova-Crickova principu párování bází, přičemž sekvence priméru musí být účelně taková, aby zaručovala, že jeho 5'-konec bude koterminální s nukleotidem na prvním vlákně DNA právě před určeným bodem štěpení. Primér se pak prodlouží směrem k 3'-konci reakcí s DNA polymerázou, a tak se znovu sestaví ta část původní dvouvláknové DNA, která je před určeným místem štěpení a která byla v prvním stupni ztracena. Současně nebo poté se část prvního vlákna DNA za určeným místem štěpení odstraní digescí vhodným enzymem. Postup je shrnut graficky v následujícím schématu, ve kterém „v“ označuje určené místo štěpení DNA:

- a) v určené místo štěpení řetězce DNA „v“
- b) v vytvoření jednovláknové DNA v okolí „v“
- c) v hybridizace priméru
- d) v prodloužení priméru
- e) v digesce jednovláknové DNA za místem štěpení „v“.

Při výhodném způsobu provedení se stupně d) a e) znázorněného postupu provádějí současně, za použití polymerázy, která současně digeruje vyčnívající jednovláknový konec DNA ve směru $3' \rightarrow 5'$ a prodlužuje primér ve směru $5' \rightarrow 3'$ (v přítomnosti dATP, dGTP, dTTP a dCTP). Vhodným materiálem pro uvedený účel je Klenowova polymeráza I, tj. fragment získaný proteolytickým štěpením DNA polymerázy I, který vykazuje $5' \rightarrow 3'$ polymerizační účinnost a $3' \rightarrow 5'$ exonukleolytickou aktivitu rodičovského enzymu, ale kterému chybí její $5' \rightarrow 3'$ exonukleolytická účinnost; viz A. Kornberg v monografii „DNA Synthesis“, str. 98, W. H. Freeman and Co., SFO (1974).

Za použití právě popsaného postupu lze provádět delecí útlumové oblasti z plasmidu obsahujícím trp-operón, po jeho předchozí linearizaci, např. štěpením v místě žádané restrikce, položeném níže od bodu, ve kterém má být molekula zakončena otupěným koncem (viz shora uvedené „v“). Opětovné uvedení plasmidu do kruhového tvaru následující po odstranění útlumové oblasti lze uskutečnit například navázáním „tupého“ konce molekuly nebo jinými způsoby, které jsou odborníkům známé.

Ačkoliv způsob podle vynálezu zahrnuje přímé vylučování heterologických polypeptidů za řízení trp-promotorem-operátorem, týká se přednostní způsob jeho provedení vylučování fúzovaných bílkovin obsahujících jak homologické, tak heterologické sekvenční, přičemž posléze uvedené polypeptidy se s výhodou dají odštěpit od prvních v extracelulárních prostředcích. Zvláště výhodnými jsou takové fúze bílkovin, ve kterých se homologická část skládá z jedné nebo více aminokyselin z trp hlavního polypeptidu a asi z jedné třetiny nebo více trp E aminokyselinové sekvenční (ze vzdálenějšího konce). Takto získané fúze bílkovin se jeví podstatně stálější vůči degradaci za podmínek exprese.

Bakterii *E. coli* K-12, kmene W 3110 tna 2^{-} trp $^{-}$ $\Delta 102$ (pGM1), ATCC číslo 31622, lze používat k rozšiřování kmenů plasmidu pGM1, kterých se podle vynálezu s výhodou používá k sestrojování trp-promotorových-operátorových systémů zbavených útlumové oblasti. Tento kmen je v přítomnosti anthranilátu fenotypicky trp $^{+}$ a lze ho pěstovat na minimální živné půdě, jako například na půdě LB doplněné 50 μ g/ml anthranilátu.

Všechny bakteriální kmeny používané při expresi řízené trp promotorem-operátorem podle vynálezu jsou trp represory $^{+}$ („trp R $^{+}$ “) jako v případě divokého typu bakterie *E. coli*, čímž je zajištěna represe až do doby zamýšleného heterologického vylučování.

Při výhodném způsobu provedení se rekombinace DNA provádí v bakteriích *E. coli* K-12, kmenu 294 (zakončení A, thi $^{-}$, hsr $^{-}$, hsm $_{k}^{+}$), ATCC číslo 31446, což je bakteriální kmen, jehož membránové charakteristiky

usnadňují transformace. Plasmidy produkující heterologické polypeptidy, vypěstované v kultuře kmene 294, se běžným způsobem extrahují a uchovávají v prostředí vhodného roztoku [např. v roztoku 10 mmol tris(=tris/hydroxymethyl/aminomethan) a 1 mmol EDTD (= kyselina ethylendiamintetraoctová), pH 8] při teplotě v rozmezí asi od -20 do 4°C .

Na druhé straně, pro expresi peptidů za průmyslových podmínek, se podle vynálezu dává přednost odolnějšímu kmenu, tj. kmenu *E. coli* K-12 λ^{-} F $^{-}$ RV str $^{+}$, gal 308 $^{-}$, označenému ATCC číslem 31608. Kmen RV 308 jest nutričně divokým typem, roste dobře na minimální půdě a syntetizuje všechny nezbytné makromolekuly z běžných směsí amonných, fosforečnanových a hořečnatých solí, stop kovů a glukózy. Po transformaci kultury RV 308 plasmidem odvozeným z kmene 294 se kultura pěstuje na agarových deskách v prostředí selektivním pro znak nesený plasmidem (jako je například resistance vůči antibiotikům) a kolonie transformantů se vyberou a kultivují v baňkách. Alikvotní díly posléze uvedené baňkové kultury v 10% roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo glycerolu (ve sterilních lékovkách) se rychle zmrazí v lázni z ethanolu a suchého ledu a uchovávají se při -80°C . Za účelem produkce zakódovaného heterologického polypeptidu se vzorky takto uložené kultury pěstují v prostředí obsahujícím tryptofan, čímž se potlačí trp-promotor-operátor, pak se systém zbaví přídatného tryptofanu a tím dojde k vylučování peptidu.

Pro první stupeň kultivace se dá použít například LB živného prostředí (viz J. H. Miller v monografii „Experiments in Molecular Genetics“, str. 433, Gold Spring Harbor Laboratory 1972), které obsahuje na každý litr roztoku 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu a 10 g chloridu sodného. Inokulant se s výhodou kultivuje do optické hustoty (dále označované zkratkou „o. d.“) o hodnotě 10 nebo více (při 550 nm), výhodněji do o. d. 20 a nejvýhodněji do o. d. 30 nebo více, nicméně na o. d. menší, než má stacionární fáze.

Za účelem dereprese a exprese polypeptidických produktů se inokulant poté kultivuje za podmínek, které zbavují buňky přidaného tryptofanu. Jedno z vhodných živných prostředí pro tento druh kultivace je půda M9 (viz J. H. Miller, shora uvedená monografie, str. 431), připravená následujícím způsobem (uvedeno množství substancí na jeden litr roztoku):

dihydrogenfosforečnan draselný	3 g
hydrogenfosforečnan sodný	6 g
chlorid sodný	0,5 g
chlorid amonný	1 g

Roztok se autoklávuje a pak se přidá:

10 ml 0,01 M roztoku bezvodého chloridu vápenatého

1 ml 1 M roztoku bezvodého síranu hořečnatého

10 ml 20% roztoku glukózy

1 µg/ml vitaminu B₁

40 µg/ml kaseinového aminokyselinového hydrolyzátu.

Posléze uvedený aminokyselinový dodatek živné půdy je hydrolyzát kaseinu prostý tryptofanu.

Aby se dosáhlo vylučování heterologického polypeptidu, zředí se inokulant vypěstovaný na živné půdě bohaté na tryptofan, například větším objemem prostředí neobsahujícím další tryptofan [například 2- až 10násobné zředění], a pěstuje se až do dosažení žádané hladiny (výhodně krátce po stacionární fázi růstu); žádaný produkt se získá běžným způsobem lýzou, centrifugací a dalším čištěním. Ve fázi kultivace, při které se buňky zbavují tryptofanu, se buňky pěstují s výhodou do stupně o. d. vyšší než 10, ještě výhodněji do o. d. vyšší než 20 a nejvýhodněji do o. d. 30, nebo vyšší (měřeno při 550 nm) a pak se izoluje žádaný produkt.

Všechny rekombinace DNA popsané v následujících příkladech byly provedeny v souladu se směrnicemi Národních zdravotnických ústavů pro výzkum rekombinovaných DNA.

Příklad 1

Expresí bílkoviny fúzované s trp D polypeptidem

Výhodný způsob vylučování fúzovaných bílkovin obsahujících žádané polypeptidy a na ně navázanou část aminokyselinové sekvence trp D polypeptidu, kterou lze oddělit in vitro prostřednictvím aminokyseliny methioninu, specificky citlivé na štěpení bromkyanem, je popsán ve vztahu k obr. 1 až 3.

A. Konstrukce plasmidu pBRHtrp

Plasmid pGM1 (1 na obr. 1) nese tryptofanový operón *E. coli*, mající vynechanou oblast ΔLE1413 [viz G. F. Miozzari a spolupracovníci, časopis *J. Bacteriology* (1978), 1457 až 1466] a proto vylučuje fúzovanou bílkovinu obsahující prvních 6 aminokyselin hlavní trp sekvence a přibližně poslední třetinu trp E polypeptidu (dále označovanou jako LE') a rovněž trp D polypeptid ve svém celku, vše pod kontrolou promotorového-operátorového systému. Plasmid (20 µg) se digeruje restriktčním enzymem PvuII, který

štěpí plasmid na pěti místech. Fragmenty 2 genu se poté kombinují s EcoRI články (obsahujícími vlastní komplementární oligonukleotid 3 o sekvenci pCATGAATTCATG), čímž se umožní zapojit EcoRI místo štěpení posléze uvedeného fragmentu a vytvořit plasmid obsahující oblast EcoRI (20). Na 20 µg DNA-fragmentů 2 získaných z pGM1 shora uvedeným způsobem se nechá působit 10 jednotek T₄ DNA-ligázy v přítomnosti 200 pmol syntetického 5'-fosforylovaného oligonukleotidu pCATGAATTCATG (3) a 20 µl T₄ DNA ligázového pufru (20 mmol tris o pH 7,6, 0,5 mmol ATP, 10 mmol bezvodého chloridu hořečnatého a 5 mmol dithiothreitolu) při teplotě 4 °C přes noc. Roztok se pak 10 minut zahřívá na 70 °C, aby se přerušilo spojování. Získané konjugáty se poté rozštěpí digescí s restriktčním enzymem EcoRI a fragmenty, obsahující nyní EcoRI konce, se izolují za použití elektroforézy na 5% polyakrylamidovém gelu (tento postup je v dalším popisu označován jako „PAGE-elektroforéza“). Tři největší fragmenty se z gelu izolují, po předchozím obarvení ethidiumbromidem a určení jejich polohy v ultrafialovém světle, vyříznutím příslušných částí gelové vrstvy obsahujících žádané produkty. Každý vyříznutý fragment gelové vrstvy se umístí spolu s 300 µl 0,1×TBE pufru do dialyzační komory a podrobí se elektroforéze při 100 V po dobu 1 hodiny v 0,1×TBE pufru (TBE pufr obsahuje 10,8 g tris-báze, 5,5 g kyseliny borité, 0,09 gramu Na₂EDTA v 1 litru vody). Vodný roztok z dialyzační komory se spojí, extrahuje se fenolem a chloroformem, pak se upraví chloridem sodným na 0,2 M roztok a žádaný fragment DNA se získá po vysrážení ethanollem ve vodném roztoku. (Všechny izolace DNA fragmentů popsané dále byly pomocí PAGE-elektroforézy a následující elektroelucí právě uvedeným způsobem). Získaný gen obsahující trp-promotor-operátor a EcoRI „lepivé“ konce 5 byl identifikován dále popsaným postupem, který spočívá v zavedení zmíněných fragmentů do plasmidu 6 citlivého na tetracyklin, který se po uvedeném včlenění promotoru-operátoru stane rezistentním vůči tetracyklinu.

B. Sestrojení plasmidu pBRHtrp vylučujícího rezistenci vůči tetracyklinu za kontroly trp-promotoru-operátoru a identifikace a rozmnožení DNA fragmentu obsahujícího trp-promotor-operátor, který byl izolován shora popsaným způsobem [A].

Plasmid pBRH1 6 [viz R. I. Rodriguez a spolupracovníci v časopise *Nucleic Acids Research* 6, 3267 až 3287 (1978)] vylučuje rezistenci vůči ampicilinu a obsahuje gen pro rezistenci vůči tetracyklinu, který však, poněvadž není připojen na promotor, nevylučuje posléze zmíněnou rezistenci. Plasmid je proto citlivý vůči tetracyklinu. Zavedením promotorového-operátorového systému při-

tomného v EcoRI oblasti se plasmid může stát rezistentním vůči tetracyklinu.

Plasmid pBRH1 se digeruje restriční enzymem EcoRI, enzym se odstraní fenolovou extrakcí a následující extrakcí chloroformem a po vysrážení ethanolom se DNA získá ve vodném prostředí. Vzniklá molekula DNA 7 se pomocí T4 DNA ligázy váže shora popsaným způsobem, v oddělených reakčních směsích, s každým ze tří jednotlivých DNA fragmentů, získaných postupem uvedeným výše v části A. Rekombinovaná DNA, přítomná v reakční směsi, se použije k transformaci příslušných bakterií *E. coli* K-12, kmene 294, popsaných K. Backmanem a spolupracovníky v časopisu *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 73, 4174 až 4198 (1976) a označených ATCC číslem 31448, standardní pracovní technikou; bakterie se naočkují na misky s agarem s minimální LB půdou obsahující 20 µg/ml ampicilinu a 5 µg/ml tetracyklinu. Vyrostlé tetracyklin-rezistentní kolonie se vyberou, plasmidická DNA se vyizoluje a přítomnost žádaného fragmentu se potvrdí restriční enzymatickou analýzou.

Získaný plasmid 8, označený pBRHtrp, vylučuje β-laktamázu, která mu uděluje rezistenci vůči ampicilinu, a obsahuje fragment DNA zahrnující trp-promotor-operátor a kódující první bílkovinu složenou z prvních šesti aminokyselin hlavní trp sekvence fúzovaných s přibližně poslední třetinou trp E polypeptidu (tato část polypeptidu je označena LE'), a druhou bílkovinu odpovídající přibližně první polovině trp D polypeptidu (tato část polypeptidu je označena D'), a třetí bílkovinu kódovanou pro tetracyklinovou rezistenci genu.

C. Začlenění genů pro různé konečné polypeptidické produkty a vylučování posléze uvedených produktů ve formě fúzovaných bílkovin složených z konečného polypeptidu a specificky odštěpitelného trp D polypeptidického prekurzoru (obr. 2).

Z plasmidu pBRHtrp se získá fragment DNA obsahující trp-promotor-operátor a kódon pro LE' a D' polypeptidy, který se vloží do plasmidu obsahujícího strukturální geny pro tvorbu různých žádaných polypeptidů, jak je dále ukázáno na příkladu somatostatinu (viz obr. 2).

Plasmid pBRHtrp se digeruje restričním enzymem EcoRI a získaný fragment 5 se izoluje za použití PAGE-elektroforézy a elektroeluce. Produkt 10, získaný EcoRI digescí plasmidu pSom 11 9 [viz K. Itakura a spolupracovníci v časopisu *Science* 198, 1056 (1977)]; britský patent č. 2 007 676 A], se kombinuje s fragmentem 5. Na směs se působí T4 DNA ligázou, jak bylo popsáno výše, a získanou DNA se transformují shora uvedeným způsobem bakterie *E. coli* K-12, kmene 294. Selektce transformovaných bakterií se provede na agarových deskách obsahujících ampicilin. Získané, vůči ampicilinu rezistentní

kolonie se hybridizují sloupcovou technikou [viz M. Gruenstein a spolupracovníci v časopise *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 72, 3951 až 3965 (1975)], za použití vzorku fragmentu 5 obsahujícího trp-promotor-operátor, izolované z pBRHtrp, který byl radioaktivně značen fosforem P³². Proveďte se selektce kolonií, které jsou pozitivní při sloupcové hybridizaci, plasmidická DNA se izoluje a umístění vložených fragmentů se stanoví restriční analýzou za použití restričních enzymů BglII a BamHI při dvojité digesci. Bacterie *E. coli* 294 obsahující plasmid označený pSOM7A2 11, který obsahuje trp-promotorový-operátorový fragment v žádané orientaci, se kultivují v živné půdě LB obsahující 10 µg/ml ampicilinu. Buňky se pěstují do dosažení hustoty o. d. 1 (při 550 nm), pak se odcentrifugují a suspendují se znovu v desetinasobném zředění do živné půdy M9. Buňky se kultivují 2 až 3 hodiny, opět do optické hustoty 1, pak se lyzují a celková buněčná bílkovina se analyzuje za použití elektroforézy na PAGE obsahující 15 % SDS-močoviny (SDS = dodecylsulfát sodný) [viz J. V. Maizel a spolupracovníci v časopisu *Meth. Viral* 5, 180 až 246 (1971)].

Na obr. 3 je znázorněna gelová analýza bílkovin, při které byla celková bílkovina získaná z různých kultur, rozdělena na jednotlivé složky. Hustota jednotlivých pásů je měřítkem množství, ve kterém jsou jednotlivé bílkoviny přítomny. Na uvedeném obrázku představují dráhy 1 a 7 kontrolní vzorky zahrnující různé bílkoviny s předem stanovenou polohou, které slouží jako body pro srovnávání. Dráhy 2 a 3 znázorňují dělení celulární bílkoviny získané z kolonií *E. coli* 294 transformovaných plasmidem pSom7A2, kultivovaných jednak na živné půdě LB (dráha 2), jednak na půdě M9 (dráha 3). Dráhy 4 a 5 znázorňují dělení celulární bílkoviny získané z analogických buněk *E. coli* 294 transformovaných plasmidem pThα7A2, tj. plasmidem vylučujícím thymosin; uvedený plasmid se získá v podstatě stejnými postupy, jak již bylo popsáno výše, počínaje plasmidem pThα1 (viz publikovaná přihláška evropského patentu č. 0 035 454). Dráha 4 znázorňuje dělení buněčné bílkoviny získané z bakterií *E. coli* 294/pThα7A2 kultivovaných na živné LB půdě, a dráha 5 znázorňuje dělení buněčné bílkoviny získané ze stejného transformanta kultivovaného na půdě M9. Dráha 6 jest další kontrola a znázorňuje rozdělení rodičovské bílkoviny z bakterií *E. coli* 294/pBR322, pěstované na LB půdě.

Ze srovnání s kontrolami vyplývá, že nejvyšší ze dvou největších párů v každé z drah 3 a 5 patří předpokládaným polohám bílkovin vylučovaných ve formě fúzovaného proteinu skládajícího se z D'polypeptidu a somatostatinu, popřípadě thymosinu (další hlavní pásy představují LE'polypeptid vznikající vynecháním útlumové oblasti). Ob. 3 potvrzuje, že exprese je v živné půdě bohaté

na tryptofan potlačena, ale naopak uvolněna za podmínek s nedostatkem tryptofanu v půdě.

D. Štěpení bílkovin bromkyanem a radioimunostanovení hormonálního produktu

V obou případech, jak u bílkoviny obsahující thymosin, tak u bílkoviny obsahující somatostatin, byla celková buněčná bílkovina rozštěpena bromkyanem, rozštěpený produkt izolován a po vysušení suspendován v pufru a analyzován radioimunometodou; bylo potvrzeno, že získané produkty jsou imunologicky identické se somatostatinem, popřípadě thymosinem. Štěpení bromkyanem je popsáno D. V. Goeddelem a spolupracovníky v časopise *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 76 str. 106 až 110 (1979).

Příklad 2

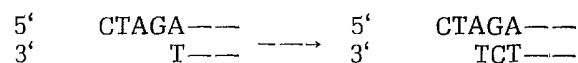
Konstrukce plasmidů pro přímé vylučování heterologických genů za kontroly trp-promotorového-operátorového systému

Pro strategii přímého vylučování je nezbytné sestavit plasmid obsahující jediné restrikční místo vzdálené od všech kontrolních prvků trp-operonu, do kterého mohou být začleněny heterologické geny místo hlavní trp-sekvence a ve vhodné prostorové relaci k ribozómovému vazebnému místu pro hlavní trp polypeptid. Přístup k dosažení přímého vylučování heterologických peptidů jest v dalším popsán na příkladu vylučování lidského růstového hormonu.

Plasmid pSom7 Δ2 (10 μg) se rozštěpí restrikčním enzymem EcoRI a DNA fragment 5, obsahující tryptofanové genetické prvky, se izoluje pomocí PAGE-elektroforézy a elektroeluce. Získaný fragment (2 μg) se digeruje 10 minut při 37 °C dvěma jednotkami restrikčními endonukleázami Taq I tak, aby se v každé molekule rozštěpilo v průměru pouze jedno z přibližně pěti Taq I restrikčních míst. Získaná směs rozštěpených fragmentů se rozdělí PAGE-elektroforézou a fragment 12 (viz obr. 4), který obsahuje přibližně 300 párů bází, jeden EcoRI konec a jeden Taq I konec, se izoluje elektroelucí. Příslušné Taq I restrikční místo jest umístěno mezi místy pro start transkripce a pro start translace a je o 5 nukleotidů vzdálené od ATG kodónu hlavního trp peptidu. DNA sekvence okolo tohoto místa je znázorněna na obr. 4. Uvedeným postupem lze izolovat fragment obsahující všechny kontrolní prvky trp-operonu, tj. promotorový-operátorový systém, signál pro iniciaci transkripce a trp-hlavní ribozómové vazebné místo.

Zbytek Taq I na konci 3' získaného fragmentu, sousedící se signálem pro start translace pro hlavní trp-sekvenci, se poté převede do Xba I místa plasmidu pHS32 s vynechanou sekvencí EcoRI — Xba I, způsobem znázor-

něným na obr. 5. Tato operace se provede navázáním fragmentu 12, získaného shora uvedeným postupem, na plasmid obsahující jediné (to znamená jen jedno) EcoRI a jediné Xba I restrikční místo. Pro tento účel lze používat v podstatě jakéhokoliv plasmidu obsahujícího, v následujícím pořadí, replikón, selektivní znak, jako rezistenci vůči antibiotikům, a EcoRI, Xba I a BamHI restrikční místa. Tak například lze Xba I restrikční místo zavést mezi EcoRI a BamHI místa plasmidu pBR322 [viz F. Bolivar se spolupracovníky v časopise *Gene* 2, 95 až 119 (1977)], například rozštěpením plasmidu v jeho jediném Hind III restrikčním místě pomocí enzymu Hind III, následující digescí vzniklých „leptvých“ konců specifickou jednovláknovou nukleázou a navázáním „tupých“ konců samoanelujícího dvouvláknového syntetického nukleotidu obsahujícího žádané rozpoznávací místo, jako sekvenci CCTCTAGAGG. Alternativně lze použít DNA fragmentů získaných z přirozených plasmidů, jak je tomu v dále popsaném případě, které obsahují jediné Xba I restrikční místo mezi EcoRI a BamHI štěpnými zbytky. Tak např. digescí virového genómu hepatitidy B enzymy EcoRI a BamHI se obvyklým způsobem získá produkt, který se začlení do EcoRI a BamHI restrikčních míst plasmidu pGH6 [viz D. V. Goeddel a spolupracovníci v časopise *Nature* 281, 544 (1979)] za vzniku plasmidu pHS32. Získaný plasmid pHS32 se rozštěpí enzymem Xba I, směs se extrahuje fenolem, pak se extrahuje chloroformem a soli se vysráží ethanolem. Na rozštěpený plasmid se působí 1 μl *E. coli* polymerázy I, Klenowovým fragmentem v prostředí 30 μl polymerázového pufru (tj. 50 mmol fosforečnanu draselného o pH 7,4, 7 mmol chloridu hořečnatého bezv. a 1 mmol β-merkapt ethanolu) obsahujícího 0,1 mmol dTTP a 0,1 mmol dCTP, po dobu 30 minut při 0 °C a pak 2 hodin při 37 °C. Při této reakci se doplní dva ze 4 nukleotidů, komplementárních k 5' vyčnívajícímu konci Xba I štěpičímu místu:

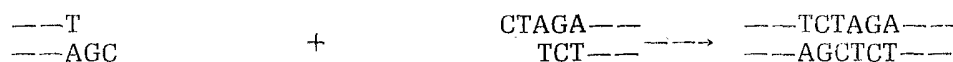


Inkorporují se dva nukleotidy, dC a dT, a vznikne konec se dvěma 5' vyčnívajícími nukleotidy. Tento lineární zbytek plasmidu pHS32 (izolovaný po extrakci fenolem, extrakci chloroformem a vysrážení ethanolem ve vodném prostředí) se štěpí restrikčním enzymem EcoRI.

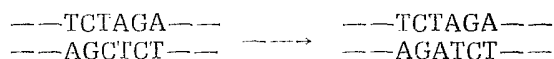
Velký plasmidický fragment 13 se odělí od menšího EcoRI — Xba I fragmentu PAGE-elektroforézou a izoluje se elektroelucí. Tento DNA-fragment plasmidu pHS32 (0,2 μg) se naváže, za podmínek podobných těm, které byly popsány výše, na shora uvedeným způsobem získaný EcoRI — Taq I fragment tryptofanového operonu 12 (~0,01 μg), jak je znázorněno na obr. 5. Při tomto po-

stupu se *TaqI* vyčnívající konec naváže na *XbaI* zbývající vyčnívající konec, i když jeho

báze nejsou kompletně spárovány podle Watsonova a Crickova principu:



Části takto získané reakční směsi ligantů se transformují buňky bakterií *E. coli* 294 stejným způsobem, jak bylo popsáno výše v příkladu 1, pak se na kulturu působí teplem a přeočkuje se na agarové desky s LB půdou obsahující ampicilin. Selekcí se získá 24 kolonií rezistenčních vůči ampicilinu, které se kultivují ve 3 ml LB půdy a plasmid se izoluje. Šest z těchto plasmidů má *XbaI* místo regenerované cestou bakteriemi *E. coli* katalyzovaným přepárováním a replikací DNA:



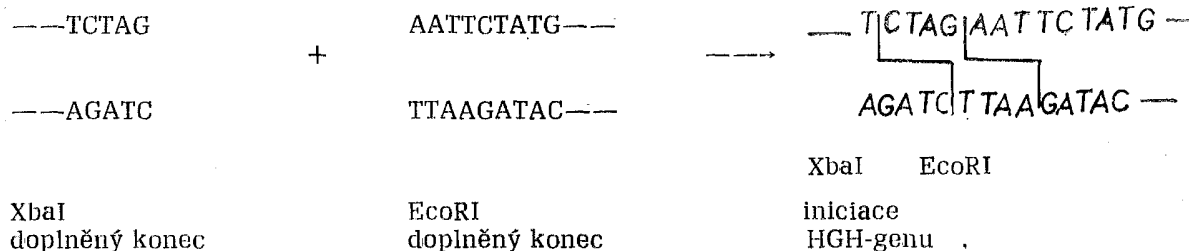
Bylo rovněž nalezeno, že se tyto plasmidy štěpí jak restrikcí enzymem *EcoRI*, tak *HpaI*, a poskytují očekávané štěpné fragmenty. Jednoho z těchto plasmidů **14**, označeného pTrp 14, lze použít pro vylučování heterologických pelyptidů, jak je popsáno dále.

Plasmid pHGH 107 **18** na obr. 6; [viz publikaci D. V. Goeddel a spolupracovníků v časopisu *Nature* 281, 544 (1979)] obsahuje gen pro lidský růstový hormon, složený z 23 aminokyselinových kodónů produkovaných ze syntetických DNA fragmentů, a ze 163 aminokyselinových kodónů získaných z komplementární DNA vytvořené cestou reverzní transkripce informační RNA pro lidský růstový hormon. Tento gen **21**, i když mu schází kodóny předcházející sekvence („pre“-sekvence) lidského růstového hormonu, obsahuje ATG kodón pro iniciaci translace. Gen se izoluje z 10 μ g plasmidu pHOH 107 nejprve působením restrikcí enzymu *EcoRI* a poté připojením dTTP a dATP na získaný fragment působením Klenowovy *E. coli* polymerázy I, jak bylo již popsáno výše (viz obr. 6). Vzniklý plasmid se extrahuje fenolem, pak chloroformem a soli se vysráží ethanolem a poté se rozštěpí enzymem *BamHI* (viz obr. 6). Vzniklý fragment **21**, obsahující gen pro

lidský růstový hormon („HGH“) se izoluje PAGE-elektroforézou a následující elektroelucí. Výsledný DNA-fragment obsahuje rovněž prvních 350 nukleotidů strukturálního genu pro rezistenci vůči tetracyklinu, ale chybí mu tetracyklinový promotorový-opeátorový systém, takže, když se v následujícím postupu začlení do plasmidu, který je schopný exprese, lze plasmidy obsahující tuto vložku určit podle obnovení tetracyklinové rezistence. Protože *EcoRI* zakončení fragmentu **21** je doplněno postupem za použití Klenowovy polymerázy I, má zmíněný fragment jeden „tupý“ a jeden „lepivý“ konec, což mu zajišťuje správnou orientaci, když je později včleněn do plasmidu schopného exprese; viz obr. 6.

V dalším se upraví plasmid pTrp 14 schopný exprese tak, aby mohl přijmout shora uvedeným způsobem připravený fragment **21** obsahující HGH-gen. Plasmid pTrp 14 se za tím účelem digeruje enzymem *XbaI* a získané „lepivé“ konce fragmentu doplní za použití postupu s Klenowovou polymerázou I a trifosfátů dATP, dTTP, dGTP a dCTP. Po extrakci reakční směsi fenolem, extrakci chloroformem a vysrážení ethanolem se na získanou DNA **16** působí enzymem *BamHI* a vzniklý velký fragment plasmidu **17** se izoluje PAGE-elektroforézou a elektroelucí. Uvedený fragment **17** odvozený od pTrp 14 má jeden „tupý“ a jeden „lepivý“ konec, které mu zajišťují správnou orientaci při rekombinaci s fragmentem **21** obsahujícím HGH-gen a popsaným výše.

Fragment **21** obsahující HGH-gen a fragment **17** pTrp14 Δ Xba-BamHI se zkombinují a navzájem naváží za podmínek podobných těm, které byly popsány výše. Doplněné *XbaI* a *EcoRI* konce se naváží spolu s tupými konci za obnovení obou *XbaI* a *EcoRI* štěpicích míst:



Touto konstrukcí se rovněž obnoví rezistence genu vůči tetracyklinu. Jelikož plasmid pHGH 107 vylučuje tetracyklinovou rezistenci z promotoru ležícího dále od HGH-genu (lac promotor), umožňuje výsledná konstrukce plasmidu **22**, označená jako pHGH 207, vylučování genu pro tetracyklinovou rezistenci za kontroly tryptofanového promotoru-operátoru. Směsí ligantů, produktů rekombinace, se transformují bakterie *E. coli* 294 a provede se selekce rezistentních kolonií na agarových deskách s LB půdou obsahující 5 $\mu\text{g/ml}$ tetracyklinu.

Aby se potvrdilo přímé vylučování lidského růstového hormonu plasmidem pHGH 207, byla celková buněčná bílkovina, která byla získána z bakterií *E. coli* 294/pHGH 207, které byly kultivovány do optické hustoty 1 na LB půdě obsahující 10 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu, zředěny 1:10 do M9 půdy a kultivovány opět do o. d. 1, podrobena SDS-gelové elektroforéze jako ve shora uvedeném příkladu 1, a získaná data srovnána s analogickými výsledky elektroforézy lidského růstového hormonu, získaného již dříve expresí postupem podle jiných autorů [D. V. Goeddel se spolupracovníky, časopis *Nature* 281, 544 (1979)]. Na obr. 7 je uvedena fotografie získané, obarvené gelové vrstvy po PAGE-elektroforéze: Dráhy 1 a 7 obsahují standardy bílkovin o různých známých polohách na elektrogramu. Dráha 2 je kontrola a znázorňuje rozdělení celkové buněčné bílkoviny z bakterií *E. coli*, kmene 294 pBR322; dráha 3 znázorňuje rozdělení bílkovin z bakterií *E. coli* 294/pHGH 107, kultivovaných na LB půdě; dráha 4 ukazuje dělení bílkovin z bakterií *E. coli* 294/pHGH 107 kultivovaných na M9 půdě; dráha 5 znázorňuje dělení bílkovin z bakterií *E. coli* 294/pHGH 207 pěstovaných na LB půdě; a dráha 6 znázorňuje rozdělení bílkovin z bakterií *E. coli* 294/pHGH 207 kultivovaných na M9 půdě. Hustý pás v dráze 6 je lidský růstový hormon, jak je zřejmé ze srovnání s podobnými pásy v dráhách 2 až 4. Jak je podle vynálezu předpokládáno, produkují mikroorganismy *E. coli* 294/pHGH 207 při kultivaci na LB půdě bohaté na tryptofan méně lidského růstového hormonu z důvodu interakcí tryptofanového represoru s trp-operátorem, a při kultivaci na M9 půdě produkují podstatně více zmíněného HGH než bakterie *E. coli* 294/pHGH 107 vzhledem k indukci silnějšího tryptofanového-promotorového-operátorového systému vůči lac-promotorového-operátorového systému v pHGH 107.

Příklad 3

Sestavení plasmidu s obecnou expresí pro přímé vylučování heterologických genů pod kontrolou tryptofanového promotoru-operátoru

Plasmid pHGH 207 sestavený v předcházejícím příkladu 2 se v dalším použije k získání

fragmentu DNA obsahujícího kontrolní prvky tryptofanového operonu (s vynechanou útlumovou oblastí) a k sestrojení plasmidického „vylučovacího vektoru“ vhodného pro přímou expresi genových vložek o různé struktuře. Strategie pro sestavení plasmidu s obecnou expresí zahrnuje odstranění tryptofanové kontrolní oblasti z plasmidu pHGH 207 digescí restrikčním enzymem EcoRI a vsunutí získaného fragmentu do enzymem EcoRI digerovaného plasmidu pBRH1, používaného výše v příkladu 1. Plasmid pBRH1 je, jak již bylo uvedeno, plasmidem rezistentním vůči ampicilinu a obsahujícím gen pro tetracyklinovou rezistenci, ale je vůči tetracyklinu citlivý, neboť není přítomen vhodný promotorový-operátorový systém. Výsledný plasmid pHKY 1, jehož zkonstruování je podrobněji popsáno níže a znázorněno na obr. 8, je rezistentní jak vůči ampicilinu, tak vůči tetracyklinu, obsahuje tryptofanový promotorový-operátorový systém, chybí mu tryptofanový útlumový článek a obsahuje jediné XbaI restrikční místo vzdálené od tryptofanového promotoru-operátoru. Tryptofanový promotor-operátor a jediné XbaI místo jsou vázány mezi dvěma EcoRI štěpicími místy, takže uvedený fragment obsahující trp-promotor-operátor-XbaI místo lze odstranit a vsunout do plasmidů obsahujících jiné strukturální geny.

Alternativně lze do tohoto plasmidu vsunout další heterologické strukturální geny, buď do XbaI štěpicího místa, nebo (pa parciální digesci enzymem EcoRI) do EcoRI restrikčního místa vzdálenějšího od tryptofanové kontrolní oblasti, v každém případě tak, aby přišel pod kontrolu tryptofanového promotorového-operátorového systému.

Plasmid pHGH 207 se digeruje restrikčním enzymem EcoRI a získaný trp promotorový fragment **23** obsahující EcoRI štěpicí místo se izoluje za použití PAGE-elektroforézy a následující elektroeluci.

Plasmid pBRH1 se digeruje restrikčním enzymem EcoRI a z konců rozštěpené molekuly se působením bakteriální alkalické fosfatázy („BAP“) (1 μg , v prostředí 50 mmol tris-pufu o pH 8 a 10 mmol bezvodého chloridu hořečnatého, po dobu 30 minut při 65 stupních Celsia) odstraní fosfátové skupiny na vyčnívající EcoRI koncích. Přebytek bakteriální alkalické fosfatázy se odstraní extrakcí fenolem a extrakcí chloroformem a soli se vysráží ethanolem. Získá se lineární DNA **7**, které chybí fosfátové skupiny na vyčnívajících koncích a která přijímá a váže pouze vložky, jejichž komplementární „lepivé“ konce jsou fosforylovány, ale sama se neuzavírá do kruhového tvaru a dovoluje proto snadnější zkoušení plasmidů obsahujících různé vložené části. Fragment **23**, získaný z plasmidu pHGH 207 a obsahující EcoRI, a lineární DNA získaná z plasmidu pBRH1 **7a**, se zkombinují a vzájemně naváží v přítomnosti T₄ ligázy, způsobem popsaným vý-

še. Části získané směsi se transformují bakterie *E. coli* kmene 294, analogicky jak je popsáno výše, a mikroorganismy se kultivují na agarových deskách s LB půdou obsahující 5 µg/ml tetracyklinu a touto selekcí se získá 12 kolonií rezistentních na tetracyklin. Z každé kolonie se izoluje plasmid a hodnotí se na přítomnost vsunutého fragmentu DNA restrikční endonukleázovou analýzou za použití štěpících enzymů EcoRI a XbaI. Jeden z takto získaných plasmidů obsahujících žádanou vložku byl označen jako plasmid pHKY1.

Příklad 4

Sestrojení plasmidu obsahujícího tryptofanový operon, schopného exprese specificky štěpitelné fúzané bílkoviny obsahující 6 aminokyselin hlavního trp-peptidu, poslední třetinu trp E polypeptidu (označenou LE') a heterologický strukturální gen

Strategie pro sestrojení plasmidu vylučujícího fúzanou bílkovinu s LE' polypeptidem zahrnuje následující stupně:

- a) Zajištění genového fragmentu obsahujícího kodóny pro vzdálenou oblast LE' polypeptidu a majícího Bgl II, popřípadě EcoRI záchytné konce na 5' a 3' koncích kódujícího vlákna;
- e) Eliminace kodónů ze vzdálené oblasti LE' genového fragmentu a kodónů pro trp D gen z plasmidu SOM 7 Δ2, vsunutí fragmentu získaného ve stupni a) o obnovení LE' kodónové sekvence bezprostředně za sekvencí heterologického genu pro somatostatatin.

Jak je znázorněno na obr. 9a, plasmid pSom 7 Δ2 se digeruje enzymem Hind III a pak se digeruje lambda-exonukleázou (5' → 3' exonukleáza) za podmínek zvolených tak, aby štěpení probíhalo za Bgl II restrikčním místem s LE' kódující oblastí; 20 µg plasmidu pSom 7 Δ2 digerovaného enzymem Hind III se rozpustí v pufru (20 mmol glycinového pufru o pH 9,6, 1 mmol bezvodého chloridu hořečnatého a 1 mmol β-merkaptioethanolu) a na směs se působí 60 minut při teplotě místnosti 5 jednotkami lambda-exonukleázy. Získaná reakční směs se extrahuje fenolem, pak se extrahuje chloroformem a vysráží ethanolem.

Aby se posléze vytvořil EcoRI zbytek na vzdálenějším konci LE' genového fragmentu, syntetizuje se zlepšenou fosfortriesterovou metodou [viz R. Crea se spolupracovníky, časopis Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 75, 5765 (1979)] primér o složení ³²pCCTGTGCATGAT a hybridizuje se s jednovláknovým koncem LE' genového fragmentu, získaným digescí lambda-exonukleázou. Hybridizace se provádí níže popsáným způsobem.

20 µg fragmentu, získaného působením

lambda-exonukleázy na produkt digesce plasmidu pSom 7 Δ2 enzymem Hind III, se rozpustí ve 20 µl vody a k roztoku se přidá 6 µl roztoku obsahujícího asi 80 pmol shora popsaného 5'-fosforylovaného oligonukleotidu. Syntetický fragment se hybridizuje na 3' konec LE' kódující sekvence a zbývající jednovláknová část LE' fragmentu se doplní výše popsáním postupem s Klenowovou polymerázou I, za použití trifosfátů dATP, dTTP, dGTP a dCTP.

Reakční směs se zahřeje na 50 °C a pak se nechá zvolna vychladnout na 10 °C; poté se přidá Klenowova polymeráza. Po 15 minutách inkubace při teplotě místnosti a následujících 30 minutách inkubace při 37 °C se reakce zastaví přidáním 5 µl 0,25 M EDTA. Reakční směs se vyextrahuje fenolem, pak se extrahuje chloroformem a vysráží se ethanolem. Získaná DNA **28** se poté štěpí restrikčním enzymem Bgl II a fragmenty se rozdělí PAGE-elektroforézou. Pomocí autoradiogramu gelové vrstvy se zjistí poloha ³²P-značeného fragmentu o očekávané délce řetězce přibližně 470 bp, a tento fragment se izoluje elektroelucí. Jak již bylo nastíněno výše, tento fragment LE' (d) má Bgl II konec a druhý konec „tupý“, koincidující se začátkem priméru.

Plasmid pTha1 popsáný výše v příkladu 1, části C, nese strukturální gen pro thymosin alfa jedna, zakódovaný svým 5' koncem kódujícího vlákna do EcoRI místa a svým 3' koncem do BAMHI místa. Jak je znázorněno na obr. 9b, obsahuje thymosinový gen rovněž Bgl II štěpicí místo. Plasmid pTha1 obsahuje též gen specifikující rezistenci vůči ampicilinu. Za účelem sestrojení plasmidu schopného přijmout shora uvedeným způsobem připravený fragment LE' (d) **29**, se pTha1 digeruje restrikčním enzymem EcoRI a pak se provede reakce s trifosfáty dTTP a dATP v přítomnosti Klenowovy polymerázy, aby se „otupily“ EcoRI zbytky. Digestí získaného produktu enzymem Bgl II se získá lineární DNA fragment **33** obsahující gen pro ampicilinovou rezistenci a na opačném konci „lepivý“ Bgl II zbytek a na bližším konci „tupý“ zakončení. Vzniklý produkt se dá znovu uzavřít do kruhu reakcí s LE' (d) fragmentem **29** obsahujícím Bgl II záchytný konec a „tupý“ konec, v přítomnosti T₄ DNA-ligázy, a získá se plasmid pTrp 24 (**34** viz obr. 9b). Při tom se znovu vytvoří EcoRI štěpné místo v té poloze, kde dojde k vazbě s „tupým“ koncem.

Jak je znázorněno na obr. 10, postupná digesce plasmidu pTrp 24 restrikčními enzymy Bgl II a EcoRI a následující izolace produktu, za použití PAGE-elektroforézy a elektroeluce, poskytne fragment mající kodóny pro LE' (d) polypeptid s Bgl II „lepivým koncem a EcoRI „lepivým“ koncem sousedícím s jeho 3' kódujícím zakončením. Získaný LE' (d) fragment **38** se dá začlenit do Bgl II místa plasmidu pSom 7 Δ2 za vytvoření fúzané

bílkoviny složené z LE' polypeptidu a somatostatinu, která je vylučována za kontroly tryptofanového promotoru-operátoru, jak je znázorněno na obr. 10.

Aby se shora popsané začlenění fragmentu **38** dalo provést, je třeba 1) částečně digerovat enzymem EcoRI plasmid pSom 7 Δ2 za účelem jeho rozštěpení v EcoRI místě vzdálenějším od tryptofanového promotoru-operátoru, jak je znázorněno na obr. 10, a 2) vhodně zvolit sekvenci priméru (viz obr. 9a), za účelem udržení správné translační stavby kodónu, a znovu sestavit plasmid v EcoRI štěpném místě.

Tak například se 16 μg plasmidu pSom 7 Δ2 zředí do 200 μl pufru obsahujícího 20 mmol tris o pH 7,5, 5 mmol bezvodého chloridu hořečnatého, 0,02 mmol detergentu NP 40 a 100 mmol chloridu sodného, a působí se na něj 0,5 jednotkami restriktivního enzymu EcoRI. Po 15 minutách působení při 37 °C se reakční směs vyextrahuje fenolem, extrahuje chloroformem a vysráží ethanolem a produkt se poté digeruje enzymem Bgl II.

Vzniklý větší fragment **36** se izoluje za použití PAGE-elektroforézy a elektroeluce. Tento fragment obsahuje kodóny LE' (p) pro bližší konec LE' polypeptidu, tj. kodóny, které leží za Bgl II štěpicím místem. Fragment **36** se pak naváže na fragment **38** v přítomnosti T₄ DNA ligázy za vzniku plasmidu pSom 7 Δ2Δ4, kterým se pak transformují bakterie E. coli kmene 294 způsobem popsaným výše, a účinně se tak produkuje, pod kontrolou tryptofanového promotoru-operátoru, fúzovaná bílkovina skládající se z plně rekonstituovaného LE' polypeptidu a ze somatostatinu. Fúzovaná bílkovina, ze které může být somatostatin specificky odštěpen vzhledem k přítomnosti methioninu na 5' konci somatostatinové sekvence, se oddělí shora popsaným způsobem, za použití elektroforézy na sodiumdodecylsulfát-polyakrylamidovém gelu. Na obr. **11** je fúzovaný protein patrný jako nejzřetelnější pás v dráze 6 (bližší podrobnosti k obr. 11 jsou uvedeny v níže uvedeném příkladu 5).

Příklad 5

Sestrojení systému pro vylučování trp LE' polypeptidických fúzí, ve kterých je umístěna rezistence vůči tetracyklinu, za kontroly tryptofanového promotoru-operátoru

Strategie pro sestrojení vylučovacího prostředku schopného přijímat rozličné heterologické polypeptidické geny pro expresi odpovídajících bílkovin ve formě fúzí s trp-LE' polypeptidem pod kontrolou tryptofanového operónu, zahrnuje zkonstruování plasmidu majícího následující charakteristiky:

- 1) Rezistenci vůči tetracyklinu, která se však může ztratit v případě, že se odstraní promotorový-operátorový systém kon-

trolující geny specifikuující takovou rezistenci;

- 2) Odstranění promotorového-operátorového systému, který kontroluje rezistenci vůči tetracyklinu, a opětovné uzavření získaného lineárního fragmentu do kruhového tvaru navázáním zvoleného heterologického genu a tryptofanového promotorového-operátorového systému ve vhodné translační fázi vzhledem k němu, čímž se obnoví rezistence vůči tetracyklinu a v důsledku toho se umožní identifikace plasmidu obsahující vložený heterologický gen.

Ve stručnosti lze shrnout, že v soulase s povahou uvažovaných vložených sekvencí je účelem sestavit lineární část DNA mající Pst zbytek na svém 3' konci a Bgl II zbytek na svém 5' konci a vázající gen specificky schopný vytvářet rezistenci vůči tetracyklinu, když se uvede pod kontrolu promotorového-operátorového systému.

Tak například, jak je znázorněno na obr. 12, se plasmid pBR322 digeruje enzymem Hind III a vyčnívající Hind III konce se poté digerují S1 nukleázou. Posléze uvedená digesce spočívá v tom, že se na 10 μg plasmidu pBR 322 rozštěpeného enzymem Hind III působí v prostředí 30 μl pufru S1 (0,3 mol chloridu sodného, 1 mmol bezvodého chloridu zinečnatého, 25 mmol octanu sodného, pH 4,5) 300 jednotkami nukleázy S1 po dobu 30 minut při 15 °C. Reakce se zastaví přidáním 1 μl 30 X S1 přerušovacího roztoku pro S1 nukleázu (0,8 mol tris-báze a 50 mmol EDTA), směs se vyextrahuje fenolem, pak se extrahuje chloroformem a vysráží ethanolem. Získaný produkt **45** se digeruje výše popsaným způsobem štěpicím enzymem EcoRI a ze vzniklé směsi štěpí se velký fragment **46** izoluje PAGE-elektroforézou a elektroelucí.

Takto získaný fragment má jeden EcoRI „lepivý“ konec a druhý „tupý“ konec, jehož kódovací vlákno začíná nukleotidem thymidinem. Jak bude ukázáno v dalším popisu, může se S1 digerovaný Hind III zbytek začínající thymidinem připojit na Bgl II zbytek vzniklý působením Klenowovy polymerázy I a po navázání rekonstituovat Bgl II restriktivní místo.

Plasmid pSom 7 Δ2, připravený způsobem popsaným výše v příkladu 1, se digeruje enzymem Bgl II a získaný fragment s Bgl II záchytnými konci se převede postupem s Klenowovou polymerázou I, za použití všech čtyř desoxynukleotidtrifosfátů, na dvouvláknový. Vzniklý produkt se rozštěpí enzymem EcoRI a následující izolací menšího fragmentu **42** pomocí PAGE-elektroforézy a elektroeluce se získá lineární část DNA obsahující tryptofanový promotor-operátor a kodóny nejbližší LE' sekvence za Bgl II štěpicím místem [„LE' (p)“]. Tento lineární

fragment má jednak EcoRI konec a jednak „tupý“ konec vzniklý doplněním v Bgl II místě. Bgl II místo se však rekonstruuje navázáním „tupého“ konce fragmentu 42 na „tupý“ konec fragmentu 46. Oba posléze zmíněné fragmenty se uvedeným způsobem naváží v přítomnosti T₄ DNA ligázy za vzniku znovu do kruhu uzavřeného plasmidu pHKY 10 (viz obr. 12), kterým se transformují buňky bakterií *E. coli* kmene 294. Vypěstované, vůči tetracyklinu rezistentní buňky nesoucí rekombinovaný plasmid pHKY 10 se vyisolují, plasmidická DNA se vyextrahuje a poté se postupně digeruje restrikcími enzymy Bgl II a Pst, velký fragment získaný štěpením se izoluje PAGE-elektroforézou a elektroelucí. Získá se lineární část DNA mající Pst a Bgl II záchytné konce. Tento DNA fragment 49 obsahuje počáteční replikaci a je proto vhodný jako první komponenta pro konstrukci plasmidů, ve kterých oba geny, gen kódující bílkovinu fúzovanou s trp LE' polypeptidem a gen kódující rezistenci vůči tetracyklinu, jsou kontrolovány trp-promotorem-operátorem.

Plasmid pSom 7 Δ2Δ4, připravený způsobem popsaným v příkladu 4, lze zpracovat tak, aby poskytl druhou komponentu potřebnou pro sestavení systému schopného přijímat rozličné heterologické strukturální geny. Jak je uvedeno na obr. 13, podrobí se zmíněný plasmid částečné digesti restrikcíním enzymem EcoRI (viz příklad 4) a pak digesti enzymem Pst, a fragment 51 obsahující trp-promotor-operátor se izoluje PAGE-elektroforézou a následující elektroelucí. Parciální digeste enzymem EcoRI se musí provádět proto, aby se získal fragment rozštěpený v sousedství 5' konce somatostatinného genu, ale nerozštěpený v EcoRI místě přítomnému mezi genem pro ampicilinovou rezistenci a trp promotorem-operátorem. Ampicilinová rezistence ztracená štěpením enzymem Pst I v ap^R genu se dá znovu obnovit po vazbě s fragmentem 51.

Jako první ukázka třetí komponenty potřebné pro konstrukci nového plasmidu je uveden strukturální gen pro thymosin alfa jedna. Připraví se tak, že se plasmid pThα1 podrobí digesti enzymem EcoRI a BamHI a získaný fragment 52 se čistí PAGE-elektroforézou a elektroelucí.

Uvedené tři genové fragmenty 49, 51 a 52 se navzájem naváží ve správné orientaci, jak je znázorněno na obr. 13, za vzniku plasmidu pThα7 Δ1Δ4, který lze při kultivaci vybrat na základě jeho obnovené ampicilinové a tetracyklinové rezistence. Po transformaci bakterií *E. coli* kmene 294 a po kultivaci buněk za podmínek analogických těm, které byly popsány v příkladu 1, se získá plasmid

vylučující fúzovanou bílkovinu s trp-poly-peptidem LE', ze kterého lze specificky odštěpit thymosin alfa jedna působením bromkyanu.

Když se podobným způsobem naváží jiné strukturální heterologické geny mající EcoRI a BamHI zakončení s komponentami odvozenými z plasmidů pHKY 10 a pSom 7 Δ2-Δ4, získají se analogicky účinně fúzované bílkoviny s trp-LE' polypeptidem, obsahující polypeptidy, pro které jsou příslušné heterologické geny kódovány.

Na obr. 11 jsou znázorněny výsledky dělení celkové buněčné bílkoviny získané z transformantů *E. coli* kmene 294, elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu, přičemž nejintenzivnější pásy v každém z uvedených případů představují produkty fúzovaných bílkovin vzniklé pod kontrolou tryptofanového promotorového-operátorového systému. Na dráze 1 obr. 11 je pro kontrolu znázorněno rozdělení celkové buněčné bílkoviny získané z bakterií *E. coli* 294/pBR 322. Dráha 2 znázorňuje rozdělení fúzovaného produktu obsahujícího somatostatin, získaného z plasmidu pSom 7 Δ2Δ4 připraveného způsobem popsaným v příkladu 4. Dráha 3 znázorňuje rozdělení produktu vylučování z plasmidu pSom 7 Δ1Δ4, obsahujícího somatostatin. Dráha 4 znázorňuje rozdělení produktu exprese z plasmidu pThα7 Δ1Δ4, a dráha 5 znázorňuje rozdělení produktu vylučovaného z plasmidu získaného spojením shora popsaných fragmentů odvozených z plasmidů pHKY 10 a pSom 7 Δ2Δ4 se strukturálním genem kódujícím lidský proinsulin, zakončeným EcoRI a BamHI konci a připraveným částečně jedním z autorů tohoto vynálezu. Dráhy 6 a 7 znázorňují, jako nejintenzivnější pás, bílkovinu fúzovanou s trp-LE' polypeptidem, ze které lze specificky odštěpit B a A řetězce lidského insulínu. Strukturální geny pro insulin B a A se získají digestí plasmidů pIB1, popřípadě pIAl1, restrikcími enzymy EcoRI a BamHI; konstrukci uvedených plasmidů popsali D. V. Goeddel se spolupracovníky v časopisu Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 76, 106 (1979). V dráze 8 je znázorněna poloha standardů.

Ačkoliv je způsob podle vynálezu popsán v jeho nejvýhodnějším provedení za použití bakterií *E. coli*, lze jako hostitelských buněk pro vylučování a jako zdrojů pro trp-operóny použít i jiných enterobakterií, ze kterých lze uvést například *Salmonella typhimurium* a *Serratia marcescens*. Způsob podle vynálezu není proto omezen na popsané výhodné provedení, ale jen na právní rozsah vyplývající z následujících bodů předmětu vynálezu.

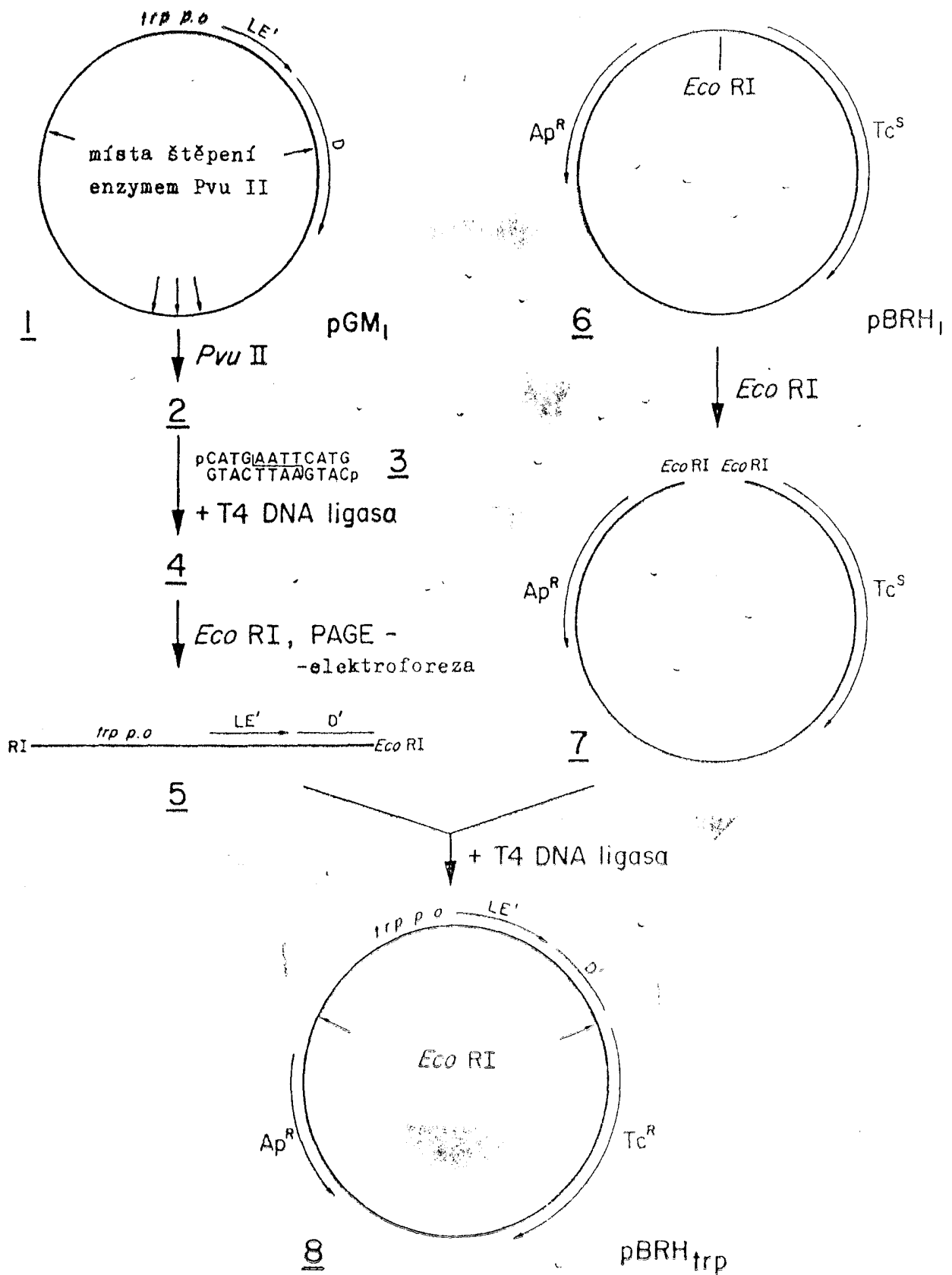
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby polypeptidického produktu, zcela heterologického nebo fúzované bílkoviny obsahující heterologický polypeptid, bakteriální expresí strukturálního genu kódujícího zmíněný polypeptid, přičemž se připraví bakteriální inokulant transformovaný replikace schopným plasmidickým vylučovacím prostředkem a transformovaný inokulant se přenese do fermentační nádoby a kultivuje se do dosažení předem určené hladiny, vyznačující se tím, že se k transformaci bakteriálního inokulantu použije plasmidického vylučovacího prostředku se sekvencí dvojvláknové DNA a obsahujícího ve fázi od prvního 5' konce ke druhému 3' konci kódujícího vlákna bakteriální tryptofanový promotorový-operátorový systém, nukleotidy kódující na ribozómové vazebné místo pro translaci strukturálního genu kódujícího aminokyselinovou sekvenci hetero-

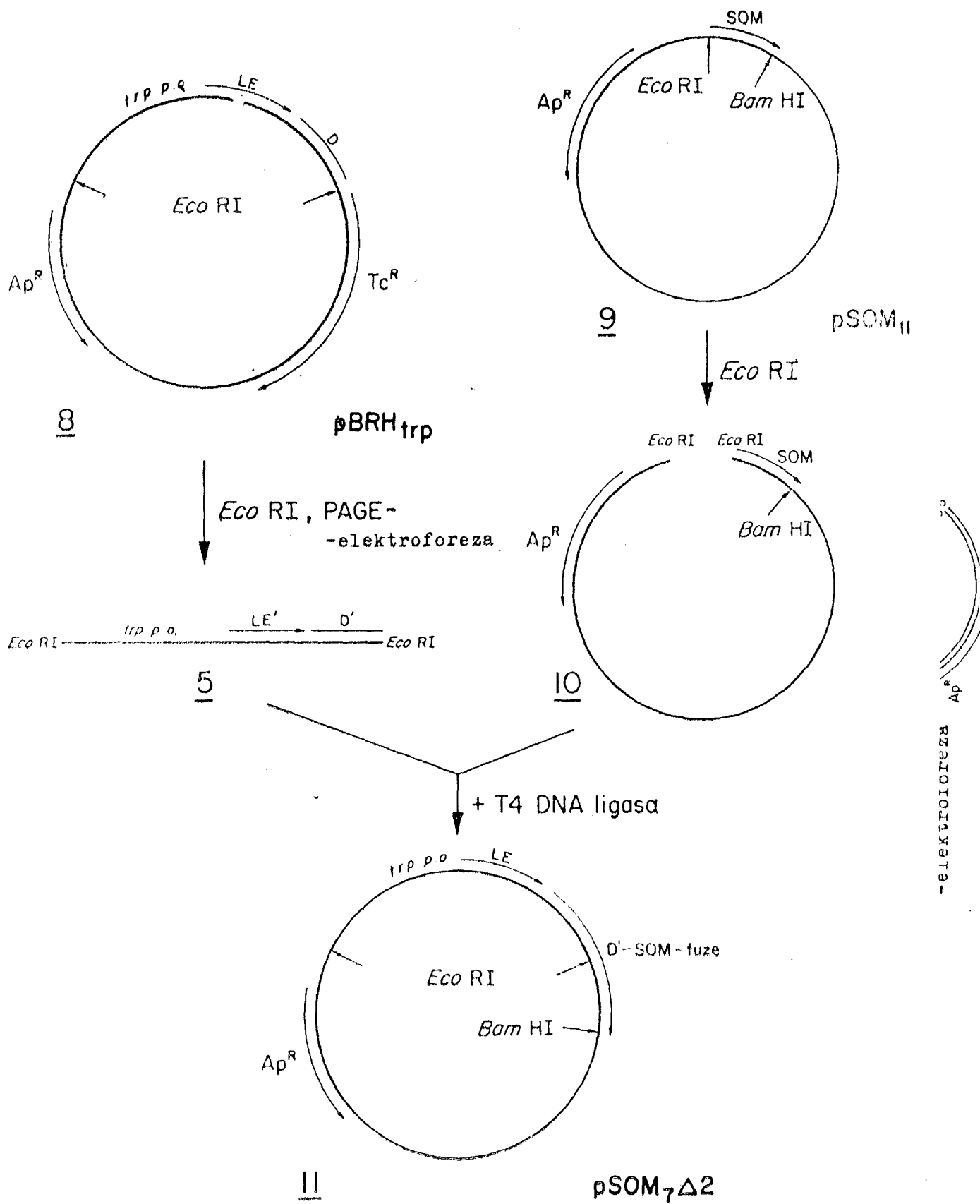
logického polypeptidu a nukleotidy kódující startovací translační signál pro zahájení translace strukturálního genu kódujícího aminokyselinovou sekvenci heterologického polypeptidu, přičemž uvedená sekvence neobsahuje ani oblast pro trp útlumovou schopnost ani nukleotidy kódující na trp E ribozómové vazebné místo, a po kultivaci inokulantu v živném prostředí obsahujícím přídatný tryptofan v množství dostatečném k potlačení shora uvedeného promotorového-operátorového systému se získaná kultura bakterií zbaví přídatného tryptofanu a vyloučí se polypeptidický produkt.

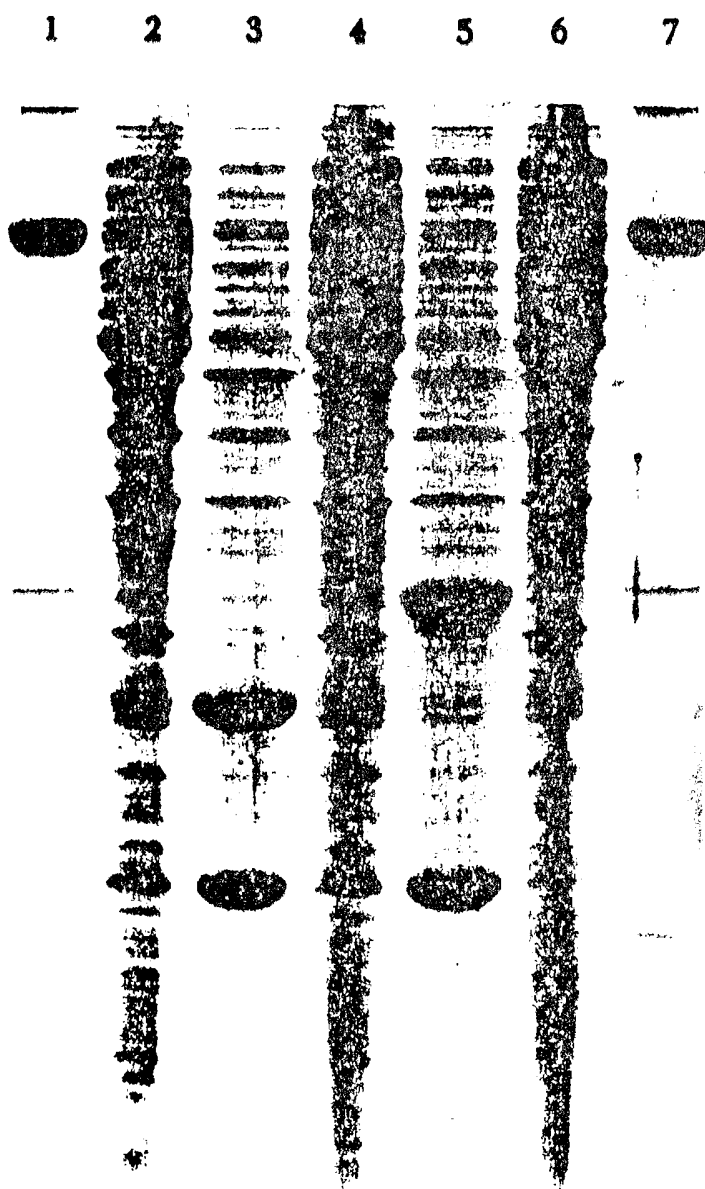
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se živné prostředí zbaví tryptofanu přerušením jeho přidávání, přičemž se fermentační prostředí, ve kterém se inokulant poprvé kultivuje, zředí.

14 listů výkresů

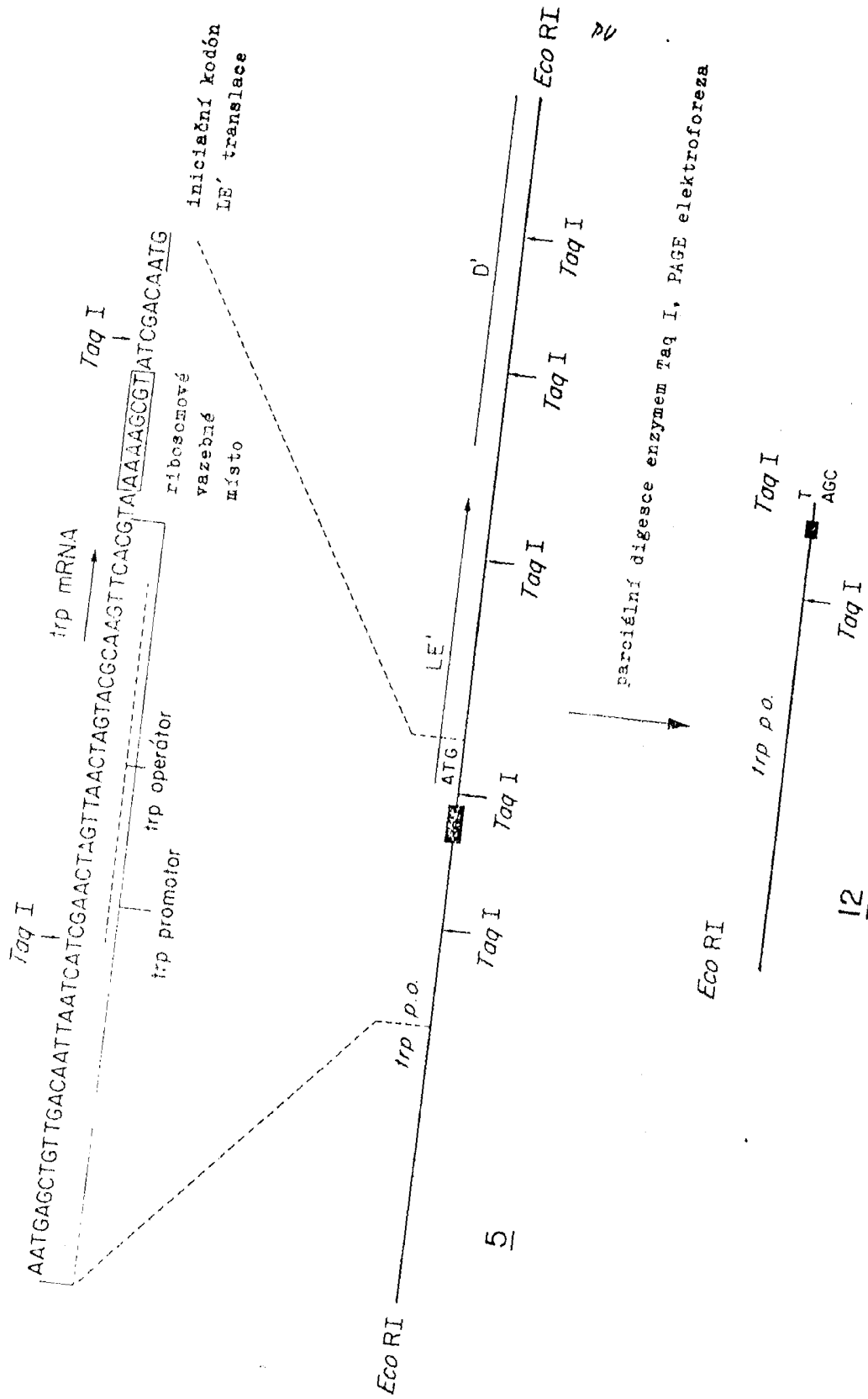


obr. 1

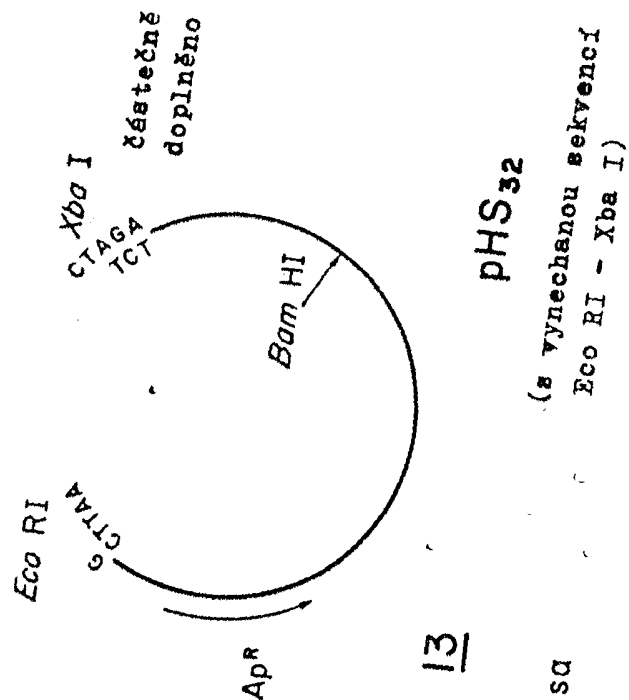




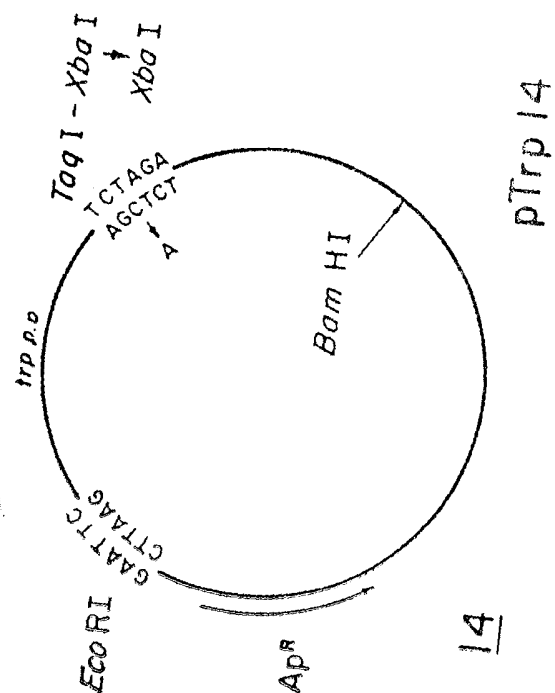
obr. 3

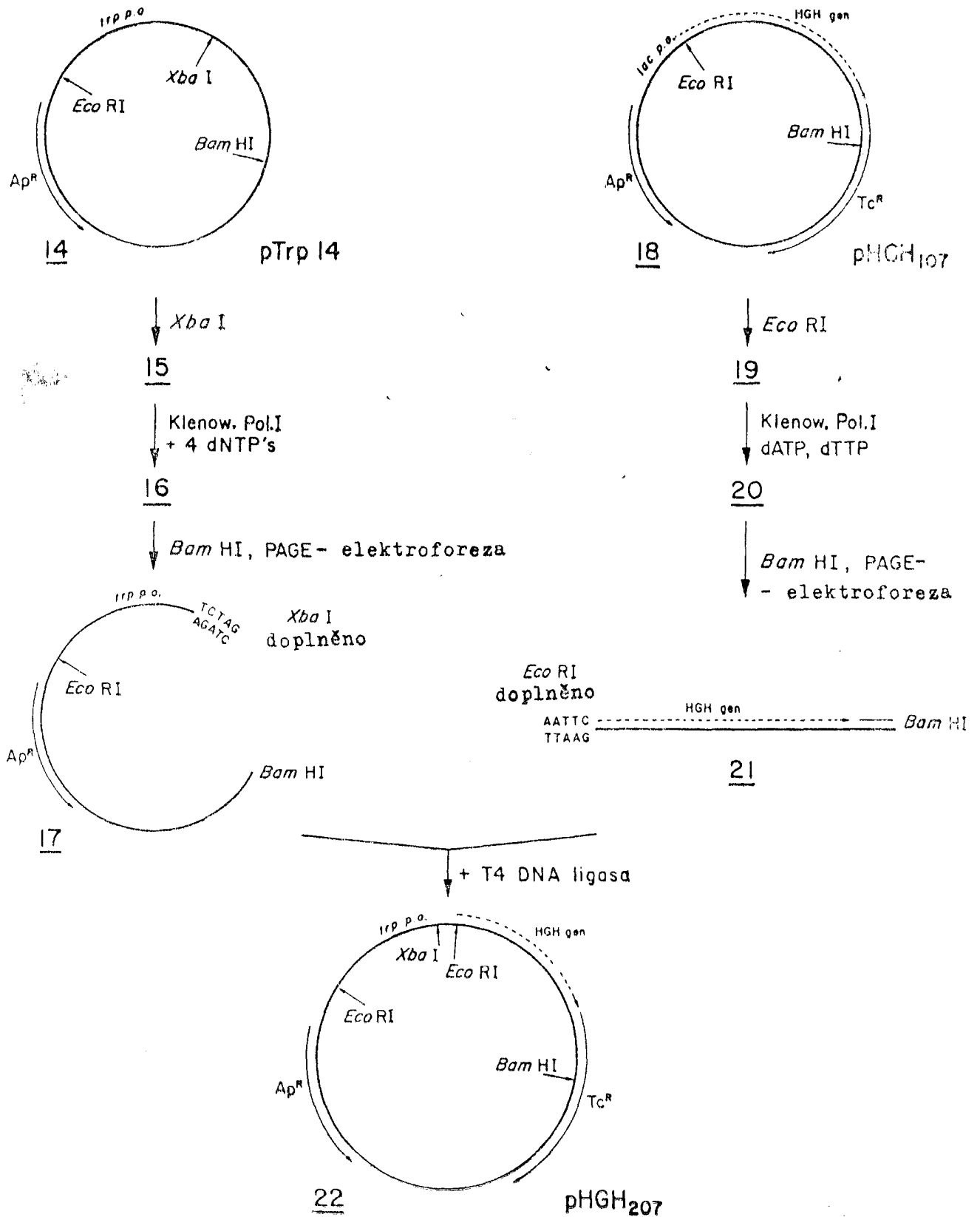


Obr. 4

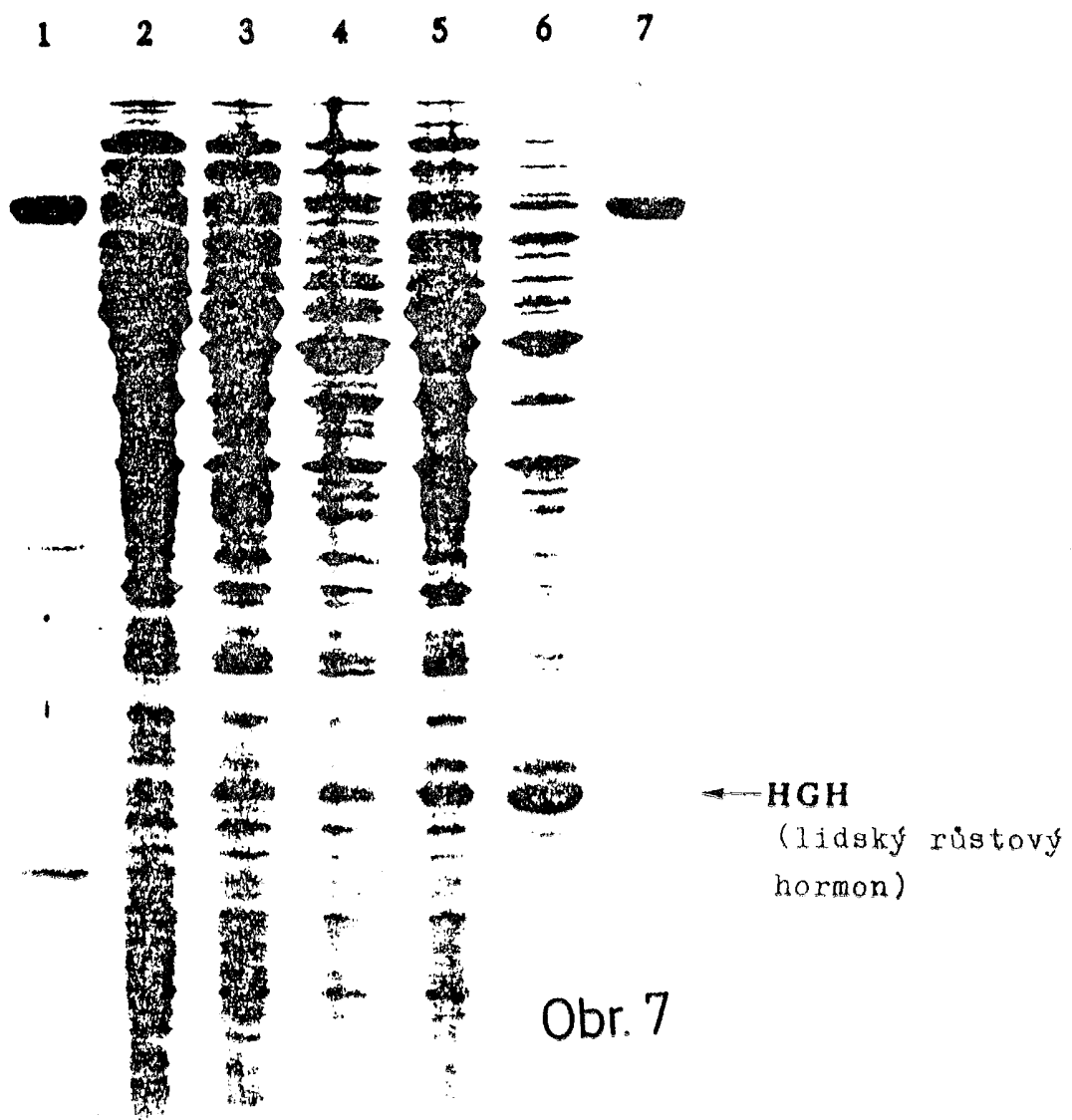


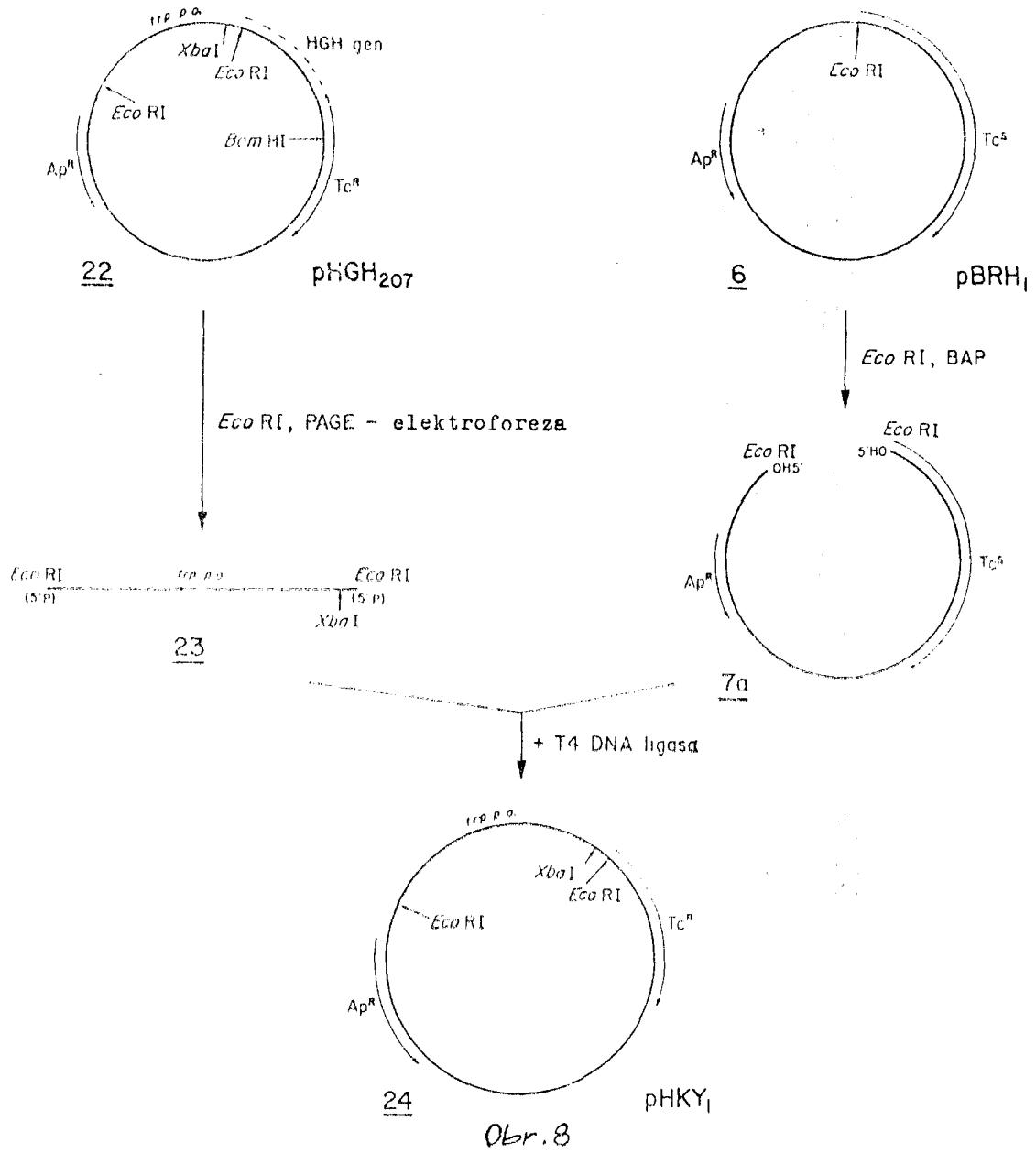
+ T4 DNA ligasa

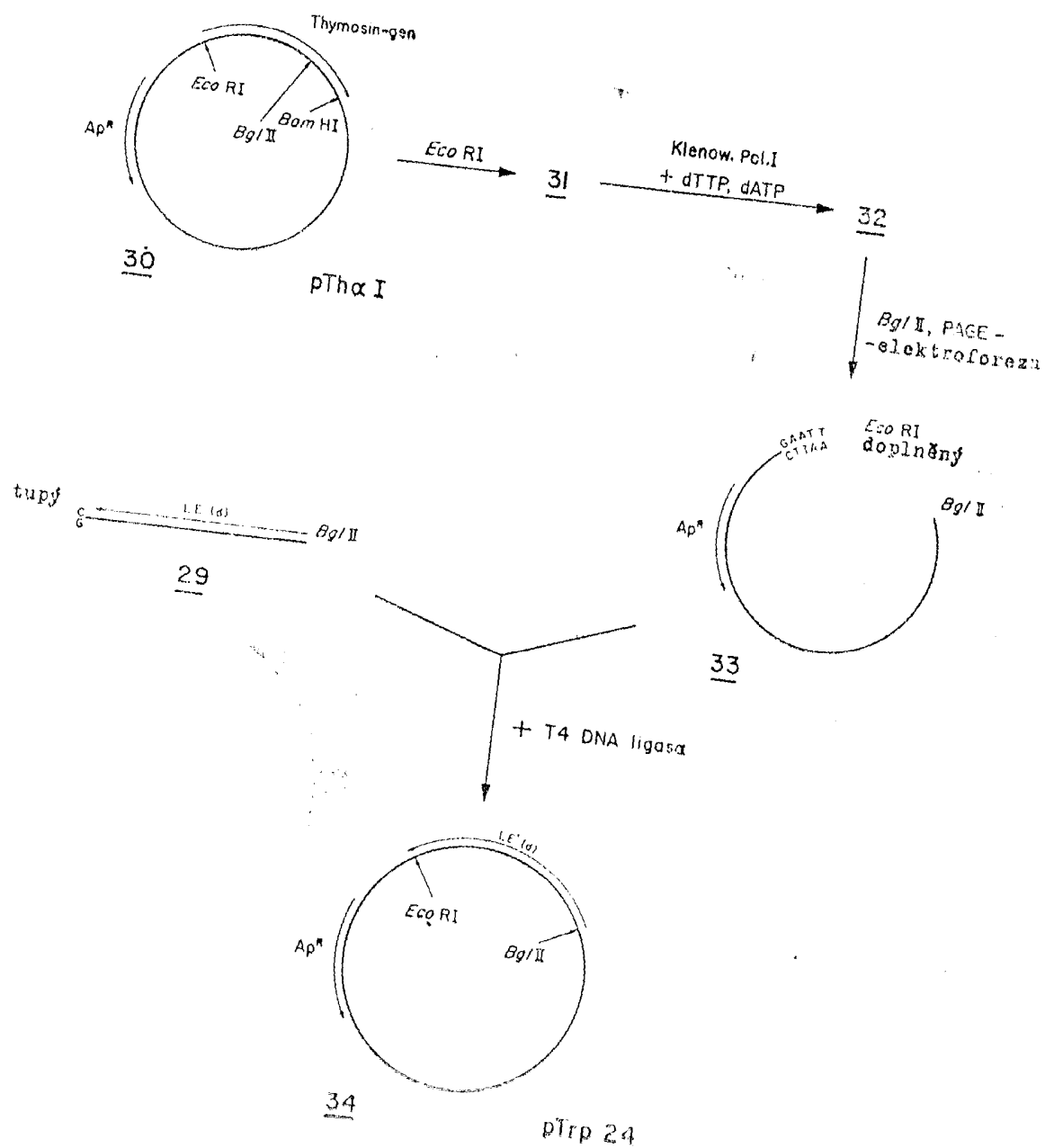




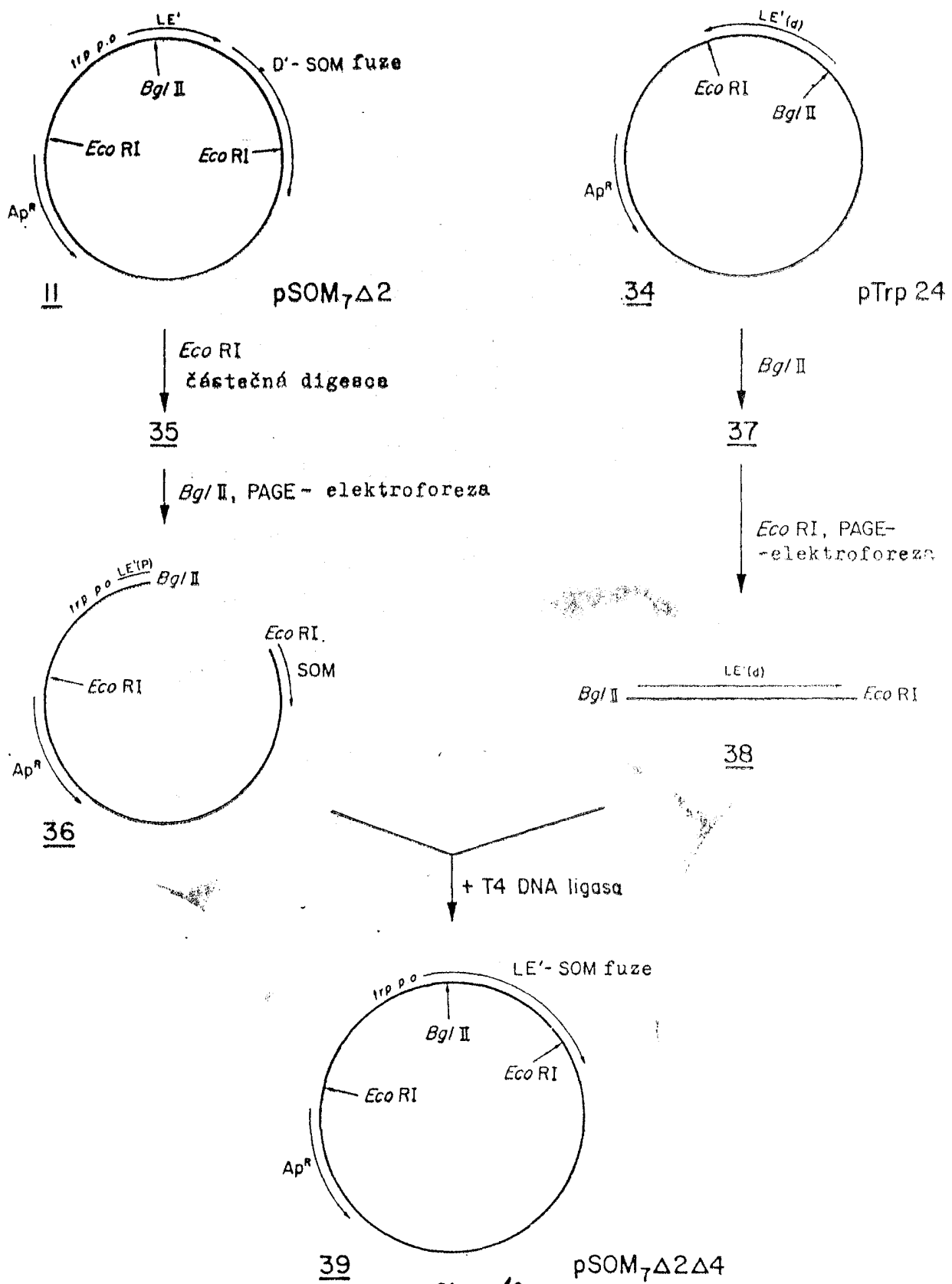
Obr. 6



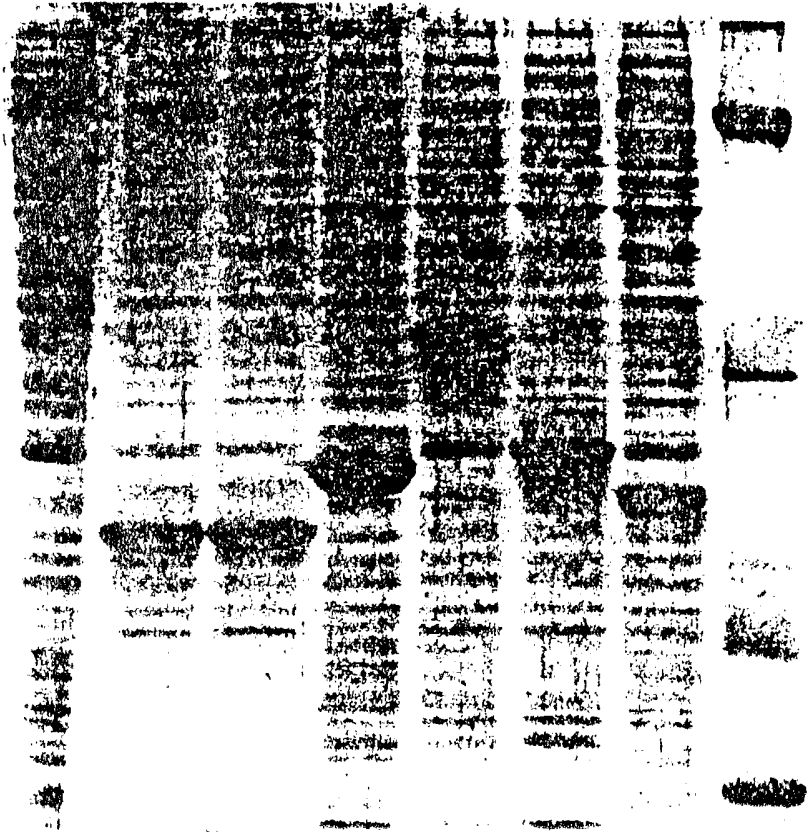




Obr. 3f



1 2 3 4 5 6 7 8



Obn. 11

