



⑩ A Terinzagelegging ⑪ 8100210

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Microbiologisch verkregen polypeptide met de aminozuurvolgorde van het proinsuline van primaten, DNA en plasmiden, die deze volgorde coderen, microörganismen die deze genetische informatie bevatten en het maken daarvan.**
- ⑤1 Int.Cl³.: C12P 21/02, C12N 15/00.
- ⑦1 Aanvrager: Hoechst Aktiengesellschaft te Frankfurt a/d Main, Bondsrepubliek Duitsland.
- ⑦4 Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

- ②1 Aanvraag Nr. 8100210.
- ②2 Ingediend 16 januari 1981.
- ③2 Voorrang vanaf 19 januari 1980.
- ③3 Land van voorrang: Bondsrepubliek Duitsland (DE).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: P 3001928 .
- ⑥2 - -

- ④3 Ter inzage gelegd 17 augustus 1981.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Betr: Microbiologisch verkregen polypeptide met de aminozuurvolgorde van het proïnsuline van primaten, DNA en plasmiden, die deze volgorde coderen, microorganismen die deze genetische informatie bevatten en het maken daarvan.

In toenemende mate zijn menselijke hormonen in de therapie nodig. Daartoe behoort o.a. het hormoon insuline. Omdat het onmogelijk is, hormonen in grote hoeveelheden uit menselijke organen te winnen, moeten geschikte technieken worden ontwikkeld, deze hormonen buiten het menselijk organisme te doen vormen.

De uitvinding geeft een dergelijke weg weer. Deze betreft de isolatie van nucleotidenvolgorde, die de genetische code voor een specifiek eiwit bevatten, de synthese van DNA met deze specifieke nucleotidenvolgorde en een transfer van dit DNA in een microorganisme als gastheer, waarin de replicatie en expressie van dit DNA plaatsvindt.

Het is bekend, polypeptiden en proteïnen door het kweken van bacteriën te bereiden, die plasmiden met genen dragen, die de gewenste polypeptiden of proteïnen coderen. Voorts is het bekend, dat plasmiden kunnen worden geconstrueerd, die de hen bevattende gastheer ertoe aanzetten genprodukten te bereiden, die van nature niet voor deze gastheer karakteristiek zijn. Het is ook bekend, dat door DNA-recombinatietechnieken de genetische informatie van ratten-preproinsuline in bacteriën gecloneerd is. Er kon worden aangetoond, dat deze bacteriën een eiwit exprimeren, dat antigeen-determinanten van insuline bezit. Bovendien is het bekend, dat de genetische informatie van de A- en B-keten van menselijk insuline gescheiden in bacteriën is gecloneerd. Dit werd aldus bereikt, dat de betreffende DNA's voor A- en B-keten de novo werden gesynthetiseerd. De door de bacteriën geproduceerde A- en B-ketens konden hierna in vitro tot het insulinemolecuul worden verknoopt.

Geen van deze methoden heeft tot een in de menselijke therapie toepasbaar geneesmiddel geleid. Bij het rattenproïnsuline is het eindprodukt, het ratteninsuline, een eiwit, dat tot allergische reacties leidt. Bij de menselijke A- en B-ketens stuitte men op de eigenschappen van de B-keten wegens zijn polymerisatie-eigenschap en de zeer slechte opbrengst bij de combinatie van A- en B-keten tot het einddoel, menselijk insuline.

Met de uitvinding wordt derhalve een andere weg ingeslagen. Het is bekend, dat ape- en menselijk insuline een identieke structuur bezitten. Wanneer men erin slaagt ape-proïnsuline te bereiden, kan men daaruit door splitsing menselijk insuline winnen.

De uitvinding betreft nu in het bijzonder de vorming van genen voor ape-proinsuline, de transfer van deze genen in een microbe-gastheer, replicatie van gastheer en gen en expressie van dit gen door de gastheer. Daarbij ontstaan proteïnen, die de aminozuurvolgorde van ape-pro-

5 insuline bevatten.

Voor het bereiken van dit doel kan men op de volgende wijze te werk gaan, waarbij de aangegeven weg als voorbeeld voor verscheidene andere moet worden opgevat.

Men wint uit apancreas, liefst van rhesusapen of cynamolgen,

10 door een proteolytische afbraak, die wegens de mogelijke verdergaande ontleding zeer zorgvuldig moet worden gecontroleerd, en vervolgens centrifugeren afzonderlijke cellen. Hieruit wordt door een dichtheidscentrifugering over een gradiënt een aan β -cellen rijke laag gewonnen. Deze cellaag wordt gedenatureerd en het RNA als neerslag volgens een cesium-

15 chloridecentrifugering gewonnen. Na verder hernieuwd neerslaan wordt uit dit RNA de mRNA via een oligo-dT-cellulosekolom afgescheiden. De gewonnen mRNA wordt met behulp van het enzym reverse transcriptase tot een RNA-DNA-dubbelstrengcompleet verwerkt. Na afbraak van de RNA-streng wordt de DNA-streng (de complementaire DNA = cDNA) met reverse

20 transcriptase of het enzym polymerase I tot een DNA-DNA-dubbelstreng (dsDNA) gecompleteerd.

Dit dubbelstrengige DNA moet nu in een plasmide worden ingebouwd. Daartoe is een verlenging van het 3'-uiteinde van het DNA b.v. met dCMP-resten nodig. Het plasmide (b.v. pBR 322) wordt met het res-

25 trictienuclease PstI opgesneden en b.v. met dGMP-resten verlengd. Bij samenvoegen van het aldus verlengde DNA met een passend verlengd plasmide vindt baseparing tussen DNA en plasmide plaats. Dit circulaire molecuul wordt daarna in microorganismen (liefst bacteriën, met name E. coli, zoals E. coli K 12 of X 1776) getransformeerd; de nog niet gesloten

30 bindingen worden door de enzymen van het microorganisme covalent verknoot. De getransformeerde organismen worden op agarplaten uitgestreken en op antibioticaresistenties, die door het gekozen plasmide en de toegepaste restrictienuclease gegeven zijn, geselecteerd.

Met behulp van immunologische proeven worden de clonen, die in-

35 sulinehoudende proteïnen exprimeren, uitgezocht. Deze clonen worden

gekweekt, de microörganismemassa afgecentrifugeerd, geëxtraheerd en op insulinegehalte nagegaan. Hierbij konden in een reeks van clonen insulineaarden van meer dan één insulineëenheid (= 1 IE) per liter cultuuroplossing worden gemeten. Deze cultuuroplossing fungeert als uitgangsmateriaal voor het winnen van ape-proïnsuline en vervolgens menselijk insuline.

De onderhavige trappen kunnen als volgt worden uitgevoerd:

1. Werkwijze voor het isoleren van RNA.

a) De isolatie van insuline producerende pancreascellen.

10 Van primaten, liefst rhesusapen of cynomolgen werden de pancreasklieren onder steriele voorwaarden gewonnen en na wegwerpen van de huidjes en grotere bloedvaten eerst mechanisch door snijden verkleind. Daarbij moet er op worden gelet, dat het weefsel tijdens deze behandeling koel wordt gehouden om een zelfontsluiting tengevolge van de daarin aanwezige pancreatine-enzymmengsels te vermijden. Het verkleinde weefsel wordt enige malen met gekoeld zoogdierenserum, bij voorkeur kalverserum, gewassen, daarna in kolven gebracht en met een steriele 0,125 %'s verwarmde collagenaseoplossing in PBS gemengd. De collagenaseoplossing moet steeds vers voor de ontsluiting worden bereid. Doorslaggevend voor de opbrengst aan cellen uit de pancreas is een gelijktijdige toevoeging van 20 en meer procent serum, liefst kalverserum, aan de collagenase. Dit mengsel wordt 10 minuten geroerd en de gehele bovenstaande vloeistof vervolgens weggegooid. Daarna wordt opnieuw een collagenase-serummengsel toegevoegd en ca. 6-10 minuten geroerd. Deze behandeling wordt ca. driemaal herhaald en het telkens gewonnen ontsloten materiaal in een koele houder verzameld. Het verzamelde materiaal met de enzymatisch gewonnen cellen wordt bij ca. 1000 tpm 10 minuten in een gekoelde centrifuge gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof weggegooid en het cel-bodemmateriaal in vers Dulbecco-medium met 1 g/l glucose en 20% kalverserum geresuspendeerd. Dit centrifugeren wordt herhaald en het daarbij gewonnen bodemmateriaal in 10 cm³ Dulbecco-medium met 15% serumtoeslag geresuspendeerd.

35 Dit celmateriaal, dat uit een mengsel van β -cellen, fibroblasten en epitheloïde cellen bestaat, werd vervolgens over een

dichtheidsgradiënt, b.v. uit ficolen of percol, gescheiden. Het beste is hiervoor een ficol-dichtheidsgradiënt gebleken. Daartoe werd ficol 400/Pharmacia in Dulbecco-medium zonder serum opgelost en in een refractometer op een viscositeit van 1,38 of met een as op een dichtheid van 1,16 ingesteld, door een membraanfilter met een poriediameter van $0,45 \mu$ steriel gefiltreerd en bij $+4^{\circ}\text{C}$ tot de toepassing bewaard. Van deze ficol-uitgangssuspensie werden dichtheden met een viscositeit van 1,373, 1,370 en 1,3672 door een toevoeging van Dulbecco-medium ingesteld en in centrifugebuisjes in lagen boven elkander aangebracht. Bovenop werden de geresuspendeerde pancreascellen aangebracht en 10 minuten werd bij $+4^{\circ}\text{C}$ en 3200 tpm gecentrifugeerd. Na dit centrifugeren werden de afzonderlijke banden voorzichtig gewonnen en van restantficolen met Dulbecco-medium vrijgewassen. De hoofdmassa van de insulineproducerende β -cellen werd op de bovenste lagen met de geringste dichtheid en een viscositeit van 1,3672 geconcentreerd.

b) Winnen van RNA

De verkregen cellen werden in "denaturerend medium" (4 M guanidiniumthiocyanaat, 1 M mercaptoëthanol, 0,15 M natriumacetaat; pH 5,5) opgenomen en 1 minuut bij 0°C met een ultra-turrax gehomogeniseerd. De oplossing werd 5 minuten op 80°C verwarmd en onmiddellijk in een ijsbad gebracht.

Deze werd vervolgens op een oplossing ("kussen") van 5 cm^3 5,7 M CsCl, 10 mM tris-hydroxyaminomethaan (tris), 10 mM ethyleendiaminetetraäizijnzuur (EDTA) met pH 7,6 als laag aangebracht en in een Beckman-SW 27 rotor 36 uren bij 20°C en 22.000 tpm gecentrifugeerd. Gevonden werd, dat in tegenstelling tot opgaven in de literatuur een toeslag van CsCl aan het lysaat moet worden vermeden om een zo volledig mogelijke afscheiding van het mRNA bij de volgende reactietrap te bereiken. Na afloop van het centrifugeren werden de polyallomeerbuisjes in vloeibare stikstof ingevroren en de bodem van het buisje waarop zich het RNA-neerslag bevond, afgesneden. Dit neerslag werd in een oplossing van 10 mM tris, 10 mM EDTA en 1% "Sarkosyl" (N-lauryl-sarkosine-natriumzout) met pH 7,6 opgenomen en de suspensie bij 20.000 tpm gedurende

20 minuten afgecentrifugeerd. Het verkregen neerslag werd nogmaals in dezelfde buffer opgenomen, 5 minuten op 65°C verwarmd en opnieuw gecentrifugeerd. De verenigde bovenstaande vloeistoffen werden 0,3 molair aan natriumacetaat gemaakt met het 2,5-voudige volume aan ethanol gemengd en bij -20°C opgeslagen.

2. Winning van mRNA

Het RNA werd door afcentrifugeren uit de ethanoloplossing (20.000 tpm, 30 minuten, -5°C) afgescheiden en in 0,5 M NaCl, 10 mM tris met pH 7,5 opgelost. Deze oplossing werd op een oligo-dT-cellulosekolom (van Collaborative Research, type 3) die met een zelfde buffer was geëquibreerd, aangebracht en met 1 mM tris pH 7,6 of gedestilleerd water geëluëerd. De elutie van het poly-A-houdende RNA (mRNA) kan door extinctiemeting bij 260 nm worden gevolgd. Het aldus verkregen mRNA werd met natriumacetaat tot een eindconcentratie van 0,3 M gemengd, een 2,5-voudig volume aan ethanol toegevoegd en de oplossing bij -20°C opgeslagen.

3. Winning van cDNA

a) Winning van enkelstreng-cDNA

De transcriptie van een mRNA tot het overeenkomstige DNA (cDNA) vindt plaats met behulp van het enzym reverse transcriptase. Het incubatiemengsel bevatte: 50 mM tris, pH 8,3, 10 mM MgCl₂, 30 mM 2-mercaptäthanol, 0,5 mM aan alle vier gewoonlijk voorkomende desoxyribonucleosidetrifosfaten (de passende trifosfaten van adenine, guanine, cytosine en thymidine), 100 µg/cm³ oligo-dT 12-18 (producent Boehringer Mannheim) ca. 100 µg/cm³ gepolyadenyleerd RNA en 800 eenheden/cm³ reverse transcriptase (producent: Life Science Inc., St. Petersburg, USA). Om de reactie te kunnen volgen kan een op de λ -plaats met 32 P-gemerkt desoxyribonucleosidetrifosfaat (specifieke activiteit: 50 Ci/mmol) aan het mengsel worden toegevoegd. Het mengsel werd 60 minuten bij 42°C geïncubeerd, waarna door een toevoeging van 20 mM EDTA de reactie werd afgebroken. De oplossing werd met een gelijk volume met water verzadigde fenol geëxtraheerd, de fenol door uitschudden met ether verwijderd en restanten ether met stikstof afgedestilleerd. Niet ingebouwde desoxyribonucleosidetrifosfaten werden door een kolomchromatografie

over Sephadex G50 in 10 mM tris, pH 9,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA afgescheiden. Het geëluëerde cDNA werd door een toevoeging van 0,3 M natriumacetaat en het 2,5-voudig volume ethanol neergeslagen.

5 Na centrifugeren werd het neerslag in 0,1 M natronloog opgenomen en 20 minuten bij 70°C geïncubeerd of in 0,3 M natronloog een nacht bij kamertemperatuur geïncubeerd. Het mengsel werd met 1 M zoutzuur en 1 M tris op pH 7,6 gebracht.

b) Vorming van dubbelstreng-cDNA (ds DNA)

10 Voor de synthese van de tweede DNA-streng kan wederom het enzym reverse transcriptase of het enzym polymerase I worden gebruikt.

Vorming van dsDNA met reverse transcriptase:

Dit incubatiemengsel (pH 8,3) bevatte 50 mM tris, 10 mM MgCl₂, 30 mM 2-mercaptoëthanol, 0,5 mM van de bovengenoemde vier desoxyribonucleosidetrifosfaten, 50 µg/cm³ cDNA en 800 eenheden/cm³ reverse transcriptase. De reactie werd 120 minuten bij 42°C uitgevoerd en door een toevoeging van EDTA tot de eindconcentratie van 20 mM beëindigd. Vervolgens vond de fenol-extractie en een gel-permeatiechromatografie over Sephadex G50 als tevoren beschreven plaats.

20 Vorming van dsDNA met polymerase I:

Het incubatiemengsel met pH 6,9 bevatte 200 mM hepes, 0,5 mM van de bovengenoemde 4 desoxyribonucleosidetrifosfaten, 10 mM MgCl₂, 30 mM 2-mercaptoëthanol en 70 mM KCl. Door een toevoeging van 32 P-gemerkte desoxyribonucleotiden (op de 5'-plaatsen) aan het incubatiemengsel kan de reactie worden gevolgd. De reactie werd met 800 eenheden/cm³ polymerase I gestart en 2 uren bij 15°C uitgevoerd. Door een toevoeging van 0,1 % natriumdodecylsulfaat en 100 µg/cm³ RNA werd de reactie afgestopt. De oplossing werd als beschreven geëxtraheerd. De na de extractie verkregen oplossing werd op een Sephadex G50-kolom aangebracht en gechromatografeerd met 10 mM tris pH 9,0, 100 mM NaCl en 1 mM EDTA. Het geëluëerde DNA kon door zijn radioactiviteit worden bepaald en werd door een toevoeging van 0,3 M natriumacetaat en het 2,5-voudig volume ethanol neergeslagen. Dit ethanol-neerslag werd in een oplossing (pH 4,5) van 300 mM NaCl, 30 mM natriumacetaat en 3 mM ZnCl₂ opgenomen

35

en met 1500 eenheden/cm³ S1 nuclease (Boehringer, Mannheim) gemengd. De reactie werd na 1 uur bij 37°C door een toevoeging van EDTA tot een eindconcentratie van 20 mM beëindigd. Vervolgens werd geëxtraheerd met fenol en met ethanol neergeslagen als eerder beschreven.

5 c) Winning van cDNA volgens een eenvatsprocédé.

Naast de beschreven reacties kan het dsDNA uit het mRNA ook met een eenvatsprocédé worden gewonnen. Daarbij wordt de reactie van de reverse transcriptase als beschreven uitgevoerd, maar aan het incubatiemengsel nog 140 mM KCl toegevoegd. Na afloop van de reactie wordt het monster 4 minuten op 100°C verhit en het gevormde neerslag afgecentrifugeerd. Aan de bovenstaande vloeistof wordt een gelijk volume aan 0,4 M hepesbuffer (pH 6,9) toegevoegd, waarbij de bovengenoemde 4 desoxyribonucleotiden in de buffer 0,5 mM aanwezig zijn. Door een toevoeging van 800 eenheden/cm³ polymerase I wordt de reactie als beschreven bij 15°C uitgevoerd en door een toevoeging van natriumdodecylsulfaat en RNA afgestopt. Hieraan aansluitend wordt als onder 3b verder gewerkt.

10 4. Verlenging van de 3'-uiteinden van cDNA met dCTP (desoxycytosine-trifosfaat)

15 Voor de inbouw in het plasmide is de verlenging van het 3'-uiteinde van het DNA met een van de bovengenoemde 4 desoxynucleotiden nodig. Voorts worden de 3'-uiteinden van het gesneden plasmide met het complementaire desoxynucleotide verlengd. Bij samenvoeging van DNA met plasmide vindt dan een baseparing tussen DNA en plasmide plaats. Dit weer circulair gemaakt molecuul kan voor het transformeren van bacteriën worden gebruikt; de nog niet gesloten bindingen worden door een enzymstelsel in de bacterie covalent verknoopt.

30 B.v. kunnen de 3'-uiteinden van cDNA met dCMP-resten (desoxycytosinemonofosfaatresten) en het plasmide met dCMP-resten (desoxyguanidinemonofosfaatresten) worden verlengd. Bij toepassing van deze desoxynucleotiden op de beschreven wijze en bij opening van het plasmide door het restrictie-enzym Pst I wordt na inbouw van het vreemde DNA een Pst I-splitsingsplaats op elke insertieplaats nieuw gevormd, zodat na vermeerdering van het plasmide het geïnserteerde

DNA voor verder onderzoek gemakkelijk weer met een restrictie-
enzym Pst I uitgesneden kan worden.

5 Het neerslag verkregen na de alcoholtoevoeging na afbraak met
S1 nuclease werd in een waterige oplossing (pH 6,7) uit 30 mM tris,
1 mM CoCl_2 , 140 mM kaliumcacodylaat, 150 mM dCTP, 100 μg geauto-
claveerd gelatinehydrolysaat en 0,1 M dithioërytritol opgelost. Voor
het volgen van de reactie kan 32 P-gemerkt dCTP worden gebruikt.
De reactie werd door een toevoeging van terminaal desoxynucleotidyl-
transferase gestart en 10 minuten bij 37°C uitgevoerd. Na afloop
10 van deze reactietijd werd het monster in ijs gebracht en door een
radioactiviteitsmeting in een met trichloorazijnzuur verkrijgbaar
neerslag het aantal van de ingebouwde dCMP-resten bepaald. Bij de
reactie moet ca. 10% van het oorspronkelijk aanwezige nucleotide
zijn geaddeerd; wanneer dit niet het geval is, kan door een toe-
15 voeging van verder enzym de reactie worden voortgezet. Indien een
te groot aantal dCMP-resten is geaddeerd, kan de gevormde keten
met behulp van het enzym S1-nuclease worden verkort.

5. Werkwijze voor het integreren van DNA in een plasmide.

20 Een geschikt circulair plasmide, b.v. pBR 322, werd met een res-
trictieëndonuclease gesneden, dat slechts een sequentie op het plas-
mide erkent. Gunstig is het, wanneer deze plitsingsplaats achter
een sterke of induceerbare promotor is gelegen en/of zo is geloca-
liseerd, dat een antibioticaresistentie wordt beïnvloed.

25 Het aldus gelineariseerde plasmide werd hierna aan de 3'-uit-
einden met een van de vier desoxynucleotiden verlengd.

Dit werd b.v. als volgt uitgevoerd: 30 μg plasmide werd met
50 eenheden Pst I restrictieëndonuclease bij aanwezigheid van 50 mM
NaCl, 6 mM tris, 6 mM MgCl_2 , 6 mM 2-mercaptoëthanol en 0,1 mg/cm^3
gelatine gedurende 40 minuten bij 37°C en een pH van 7,5 geïncubeerd.
30 Vervolgens werd met fenol en ether als beschreven geëxtraheerd en
het gesneden plasmide met ethanol bij aanwezigheid van 0,3 M na-
triumacetaat neergeslagen. De verlenging van de 3'-uiteinden
van het plasmide met dGTP (desoxyguanidinetrifosfaat) vond plaats
analoog met de bovenbeschreven verlenging van het cDNA met
35 dCTP.

Het verlengde plasmide-DNA werd daarna in een oplossing met pH 8,0 uit 0,1 M NaCl, 10 mM tris en 1 mM EDTA met het verlengde ds cDNA gemengd, 2 minuten op 56°C verwarmd, 2 uren bij 42°C ge-incubeerd en daarna langzaam op kamertemperatuur afgekoeld. Het aldus verkregen hybride DNA werd daarna voor een transformering van E. coli gebruikt.

6. Clonering van het hydrideplasmide in E. coli.

De bacteriën, b.v. E. coli X 1776, werden bij 37°C in 50 cm³ van een gebruikelijke voedingsbodem tot een optische dichtheid van A₆₀₀ = 0,5 - 0,6 gekweekt, gesedimenteerd, eenmaal met 10 mM tris met pH 7,5 gewassen en daarna in 40 cm³ van een oplossing van 75 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂ en 5 mM tris met pH 8,0 geresuspendeerd en 20 minuten in ijs geïncubeerd. Daarna werden de cellen gesedimenteerd en in 2 cm³ 75 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 mM tris pH 8,0 geresuspen-deerd.

0,2 cm³ van deze bacteriesuspensie werd daarna met 0,1 cm³ hybride-DNA-oplossing gemengd en 45 minuten op ijs geïncubeerd. Daarna werd 90 seconden op 42°C verwarmd en vervolgens met 0,2 cm³ voedingsbodem gemengd. 50 tot 75 mm³ van deze suspensie werden daarna op tetracycline en ampicilline houdende agarplaten uitgestreken en op antibiotica-resistentie geselecteerd.

7. Isolatie van stammen, die insulinehoudende proteïnen produceren.

Met behulp van een door Broome en Gilbert (E. PNAS 75, 2746, (1978)) ontwikkeld proefsysteem werden de clonen op de expressie van insulinehoudende proteïnen onderzocht. Clonen, die insulinehoudende proteïnen exprimeren werden door de binding van radioactieve antilichamen aan de proteïnen met hieropvolgende autoradiografie aldus onderkend, dat de röntgenfilm op deze plaatsen werd gezwart. Daartoe werd tot 50 clonen per nitrocellulosefilter gedurende 2 dagen bij 37°C gekweekt. Daarna werden de filters op een agarblok gelegd, dat 1 mg/cm³ lysozyme bevatte; op de bacteriekolonie werd een met insulineantilichamen beklede PVC-folie aangebracht, en daarna werd 2-3 uren bij 4°C geïncubeerd. De PVC-folie werd vervolgens 15 uren bij 4°C in een oplossing van met 132 jodium-gemerkte insulineantilichamen geïncubeerd. De specifieke

activiteit van de oplossing bedroeg ca. 1×10^6 cpm/cm³. Na wassen en drogen van de folies werden deze geautoradiografeerd.

- 5 De op de plaat immunologisch op insuline reagerende clonen werden in een gebruikelijke voedingsbodem gekweekt, de bacteriën afgecentrifugeerd, geëxtraheerd en nu met een radioimmunoproef op aanwezigheid van insulinegehalte uitgetest. Een aantal van deze clonen vertoonden daarbij insulinewaarden van meer dan 1 IE per liter cultuuroplossing.

CONCLUSIES:

1. Microbiologisch verkregen polypeptide, dat de aminozuurvolgorde van proinsuline van primaten geheel of gedeeltelijk bevat.
2. Microbiologisch verkregen polypeptide volgens conclusie 1, dat de aminozuurvolgorde van het C-peptide van proinsuline van primaten ge-
5 heel of gedeeltelijk bevat.
3. cDNA, dat voor aminozuurvolgorden van proinsuline volgens conclusies 1 of 2 codeert, verkregen met behulp van mRNA van primaten.
4. Plasmide, dat voor aminozuurvolgorden volgens conclusies 1 of 2 codeert, verkregen uit het cDNA volgens conclusie 3 en een plasmide,
10 liefst plasmide pBR 322.
5. Microorganisme, speciaal E. coli, met de genetische informatie voor de biosynthese van het polypeptide volgens conclusies 1 of 2.
6. Werkwijze voor het bereiden van een polypeptide volgens de conclusies 1-2, met het kenmerk, dat men de genetische informatie voor
15 de biosynthese van het polypeptide met mRNA van primaten wint, het verkregen gen op een op zichzelf bekende wijze in microorganismen aanbrengt en die microorganismen op een op zichzelf bekende wijze uitsel-
selecteert en cultiveert, die dit polypeptide produceren.
7. Werkwijze voor het bereiden van cDNA volgens conclusie 3, met
20 het kenmerk, dat men uit de pancreas van primaten RNA wint, daaruit het mRNA isoleert en hiermede op een op zichzelf bekende wijze cDNA bereidt.
8. Werkwijze volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat men bij het winnen van eilandcelletjes uit de pancreas van primaten een zoogdier-
serum, liefst kalverserum, in een hoeveelheid van bij voorkeur 20 of
25 meer procent van het totale volume toepast en uit de aldus gewonnen eilandcellen RNA wint.
9. Werkwijze voor het maken van een microorganisme volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat men een microorganisme, bij voorkeur E. coli, met een plasmide volgens conclusie 4 transformeert.
- 30 10. Werkwijze voor het winnen van RNA, met het kenmerk, dat men een cesiumchloride-vrij lysaat op een waterige geconcentreerde cesiumchlorideoplossing als laag aanbrengt, centrifugeert en het RNA wint.

8100210