



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 12 P 21/02
// C 12 N 15/00



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENT SCHRIFT** A5

⑪

629 533

⑮① Gesuchsnummer:	5067/77	⑦③ Inhaber: The Regents of the University of Minnesota, Minneapolis/MN (US)
⑮② Anmeldungsdatum:	22.04.1977	
⑮③ Priorität(en):	23.04.1976 US 679565	⑦② Erfinder: Mandayam Jeersannidhi Thirumalachar, Minneapolis/MN (US) Mandayam Jeersannidhi Narasimhan, Minneapolis/MN (US) John Adolph Anderson, Menlo Park/CA (US)
⑮④ Patent erteilt:	30.04.1982	
⑮⑤ Patentschrift veröffentlicht:	30.04.1982	⑦④ Vertreter: Kirker & Cie, Genève

⑤④ **Verfahren zur Gewinnung von Insulin mittels genetisch umgebildeter Funguszellen.**

⑤⑦ Man lässt Insulin erzeugende β -epithelähnliche Zellen aus der Bauchspeicheldrüse selektiv wachsen und züchtet sie unter Zellenwachstumsbedingungen an Luft in einem mit Aminosäuren angereicherten Nährmedium serienmässig in Sekundärkulturen.

Ein rasch züchtbarer Fungus wird dann mit genomischen Bestandteilen, die aus den Zellen der Sekundärkultur extrahiert worden sind, beimpft und zum Einbringen des funktionellen Genoms in die Funguszellen inkubiert. Die erhaltenen biologisch umgebildeten Funguszellen werden dann in einem mit Kohlehydraten und Stickstoff angereicherten Nährmedium unter Zellenwachstumsbedingungen inkubiert und die Funguszellen werden aus den Nährmedien abgetrennt und anschliessend wird das Insulin aus den Zellen und der überstehenden Flüssigkeit extrahiert.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung von Insulin mittels genetisch umgebildeter Funguszellen, dadurch gekennzeichnet, dass man

(a) Insulin erzeugende β -epithelähnliche Zellen aus der Bauchspeicheldrüse selektiv wachsen lässt und sie unter Zellwachstumsbedingungen an Luft in einem mit Aminosäuren angereicherten Nährmedium serienmässig in Sekundärkulturen weiterzüchtet,

(b) einen rasch züchtbaren Fungus mit genomischen Bestandteilen, die aus den Zellen der Sekundärkultur extrahiert worden sind, beimpft und zum Einbringen des funktionellen Genoms in die Funguszellen inkubiert,

(c) die erhaltenen biologisch umgebildeten Funguszellen in einem mit Kohlehydraten und Stickstoff angereicherten Nährmedium unter Zellwachstumsbedingungen inkubiert und

(d) die Funguszellen aus den Nährmedien abtrennt und anschliessend das Insulin aus den Zellen und der überstehenden Flüssigkeit extrahiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Bauchspeicheldrüse menschliche Bauchspeicheldrüsen verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Funguszellen solche des Fungus *Pseudosaccharomyces* TC-1176 (ATCC 20477) verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 1 zur Gewinnung von Insulin mittels genetisch umgebildeter Funguszellen, dadurch gekennzeichnet, dass man

(a) aus Bauchspeicheldrüsen selektiv Insulin erzeugende β -epithelähnliche Zellen erhält,

(b) diese Zellen in einem mit Aminosäure angereicherten Nährmedium in einem offenen, belüfteten, auf 32 bis 39°C gehaltenen Inkubationsgefäss dispergiert,

(c) anfänglich diese Zellen mehrere Tage unter Zellwachstumsbedingungen an Luft hält,

(d) die erhaltene Anfangszüchtung jeweils nach mehreren Tagen serienmässig als Sekundärkulturen weiterzüchtet und das ursprüngliche Volumen mit zusätzlichem Nährmedium rekonstituiert,

(e) die Sekundärkulturen weitere mehrere Tage unter Zellwachstumsbedingungen an Luft hält, bis das gewünschte Optimum an Zellenwachstum erreicht ist,

(f) die Zellen aus den Nährmedien abtrennt und die genomischen Bestandteile aus den Zellen extrahiert,

(g) diese genomischen Bestandteile (funktionelles Genom) in einem weiteren, mit Aminosäuren angereicherten Nährmedium in einem Inkubationsgefäss dispergiert,

(h) diese Dispersion mit *Pseudosaccharomyces* TC-1176 (ATCC 20477) beimpft,

(i) die Kultur unter Zellwachstumsbedingungen in Gegenwart eines antifungalen Membranpermeabilitätsmittels und Mitogen zum Einbringen des funktionellen Genoms in die Funguszellen inkubiert,

(j) die erhaltenen umgebildeten Funguszellen in ein mit Kohlehydraten und Stickstoff angereichertes Nährmedium überführt,

(k) die Kultur unter Zellwachstumsbedingungen hält, bis das gewünschte Optimum beim Funguswachstum erreicht ist und

(l) die Zellen aus den Nährmedien abtrennt und das Insulin aus den Zellen und aus den Nährmedien extrahiert.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man als Bauchspeicheldrüse menschliche Bauchspeicheldrüsen verwendet und als Insulin menschliches Insulin erhält.

6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man als mit Aminosäuren angereichertes Nährmedium das «Medium 199» mit Earle'scher Base verwendet, das durch Zusatz von geringen Mengen Leberextrakt, Hydrocortison und gegen Bakterien und Fungi wirkende Antibiotika ergänzt ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nährmedium eine Zusammensetzung verwendet, die 5 bis 20 ml Leberextrakt und 5 bis 20 mg Hydrocortisonsulfat je Liter des «Medium 199» enthält.

Die Erfindung liegt im wesentlichen auf dem Gebiet der medizinischen Biologie und insbesondere auf den Gebieten der

a) Endokrinologie, Physiologie und klinischen Medizin,

b) der Mikrobiologie und der Zellumbildung und

c) der Fermentationssysteme von menschlichen Zellen und Mikroorganismenzellen.

Seit der Entdeckung des Hormons Insulin und seiner Anwendung bei der Behandlung beim Menschen mit Diabetes mellitus ist Insulin in grossen Mengen aus den Bauchspeicheldrüsen von Rindern und Schweinen erhalten und gewonnen worden. Menschliches Insulin aus Menschenpankreas hat man nur im Laboratoriumsmassstab erhalten. Insuline aus einer grossen Anzahl von Tierarten, die von Fischen bis zu Elefanten und Walen reichen, sind isoliert und im Laboratoriumsmassstab untersucht worden. Vor kurzem hat der Mangel an Rinder- und Schweinepankreas die Suche nach einer Insulingewinnung aus anderen Quellen oder nach anderen Verfahren erforderlich gemacht. Hinzu kommt noch, dass, obwohl Rinder- und Schweineinsuline seit mehreren Jahren verwendet worden sind, Nachteile infolge der Spezies und der immunologischen Unterschiede bestehen, die bekanntlich bei einem längeren Gebrauch beim Menschen eine Antiinsulin-Antikörperbildung stimulieren. Demzufolge werden von zahlreichen Forschern wissenschaftliche Untersuchungen für Verfahren zur Gewinnung von menschlichem Insulin betrieben, das biologisch hochwirksam ist und keine Antigenbildung hervorruft.

Es sind zwei Richtungen zur Gewinnung von menschlichem Insulin versucht worden: Erstens die chemische Synthese von menschlichem Insulin und zweitens die Gewinnung von menschlichem Insulin durch Züchten von menschlichem Insulin erzeugenden β -Zellen mittels in vitro-Gewebekulturen. Die chemische Synthese von menschlichem Insulin in grossem Massstab ist infolge der Kompliziertheit der bei der Synthese angewendeten chemischen Stufen und auch infolge

der vielfachen Kosten derartiger synthetischer Verfahren im Vergleich zu den anfallenden Kosten bei der Gewinnung von Rinder- oder Schweineinsulin noch nicht erfolgreich gewesen. Bezüglich der Gewebekulturen beschäftigten sich alle Verfahren – soweit sie sich darauf beziehen – mit Primärkulturen kleiner angelegter Gewebekulturen oder mit primären Einschnitten von Insulin erzeugenden pankreatischen β -Zellen, die sowohl von einer grossen Anzahl von Tier-Spezies als auch von Menschen erhalten worden sind. Jedoch überleben derartige Primärkulturen nicht lange und können auch nicht serienmässig vermehrt werden, um eine genügende Anzahl von β -Zellen zu erhalten, um auf diese Weise Insulin in grossem Masstab zu erzeugen.

Es ist nun ein neues Verfahren zum Züchten von sowohl tierischen als auch menschlichen β -epithelähnlichen Zellen gefunden worden, die Insulin serienmässig in Sekundärkulturen erzeugen, wodurch man angemessene Mengen an menschlichem oder tierischem Insulin erhalten kann. Dieses neue Verfahren ist, obwohl es den von anderen Forschern beschriebenen Verfahren mit anderen Gewebekulturen weit überlegen ist, gegenwärtig noch nicht befriedigend, um Insulin oder menschliches Insulin in grossem Masstab zu erhalten, da die Wachstumsgeschwindigkeit von menschlichen β -Zellen in in-vitro-Kulturen verhältnismässig begrenzt ist. Demzufolge umfasst die vorliegende Erfindung ein neues Verfahren, bei dem man ein rasch wachsendes Zellsystem mit einer genetischen Information, die von menschlichem Insulin erzeugenden Zellen zur Bildung von menschlichem Insulin in grossem Masstab erhalten worden ist, umbildet.

Auf dem Gebiet der Mikrobiologie sind im Verlauf der letzten Jahre verschiedene Untersuchungen durchgeführt worden, um Zellen umzubilden. Hierbei werden folgende Wege beschritten:

- 1) Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit, der Morphologie und der Struktur,
- 2) Umbildung der Funktion und
- 3) Kombination der beiden Massnahmen (1) und (2).

Zu (1): Die Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit, der Morphologie und der Struktur ist erreicht worden unter Anwendung physikalischer Mittel, wie Röntgenstrahlen oder einer Einwirkung von α -, β - oder γ -Strahlen, durch chemische Methoden unter Anwendung von sowohl organischen als auch anorganischen Mitogenen oder Metaboliten von Mikroorganismen, wie solchen, die zur Actinomycesgruppe gehören, sowie schliesslich durch biologische Massnahmen durch Anordnen der Zellen in einer fremden Umgebung oder einem Züchten der Zellen in Berührung mit anderen Zellarten, um eine zwischenzelluläre Reizübertragung zu erreichen. Derartige Beispiele reichen von der Umbildung von spezialisierten, ectodermalen Zellen zu keratinisierten und sogar fibroplastischen Zellen, wenn sie in ungeschützter oder feindlicher Umgebung angeordnet sind, bis zur Umwandlung der Bakterien in resistente Stämme, wenn sie in einem langdauernden oder chronischen Kontakt mit geringen subletalen Dosen entsprechender Antibiotika vorliegen.

Zu (2): Die Umbildung der Funktion oder eines Teils der Funktionen oder der funktionellen Eigenschaften ist mit dem Bakterium *Escherichia coli* erreicht worden. *Escherichia coli*-Bakterien, die gegen ein Antibiotikum anfällig sind, werden in einen resistenten Stamm durch Übertragen der genetischen Substanz (DNA) aus einem anderen *Escherichia coli*-Stamm, der bereits gegen das genannte Antibiotikum resistent ist,

umgebildet. Dies wird durch Extrahieren des Plasmids DNA aus den resistenten Bakterien und Überführen auf den nicht resistenten Stamm unter Verwendung eines Virus als Trägermaterial erreicht. Dieses Verfahren ist durch serienmässige Übertragungen erweitert worden, um einen *Escherichia coli*-Stamm zu erhalten, der gegen mehrere Antibiotika resistent ist, indem ein anfälliger, nicht resistenter Stamm mit genetischer Substanz (DNA) aus verschiedenen, gegen unterschiedliche Antibiotika resistenten *Escherichia coli*-Stämmen umgebildet wird.

Schliesslich hat man *Escherichia coli* umgebildet, um eine einzige, in der Krötenblase enthaltene Proteinsequenz zu erzeugen, indem genetische Substanz (DNA) aus den Zellen der Krötenblase umgebildet wird. In allen der vorgenannten Beispiele wird gereinigte oder native DNA als die als Umbildungsprinzip tragende Gen-Information eingesetzt und ein Virus angewendet, um die genetische Information aus der Ursprungsumbildungszelle zu der aufnahmefähigen umgebildeten Zelle zu tragen. Somit ist es möglich, dass ausser den funktionellen Charakteristika des Donators *Escherichia coli* oder der Zellen der Krötenblase in der aufnahmefähigen umgebildeten Zelle auch die funktionellen Eigenschaften in Form von Proteinsequenzen des Trägervirus auftreten können, der ebenfalls in die genetische Sequenz der umgebildeten Zelle eingebracht wird.

Eine biologische Umbildung in Antibiotika erzeugenden Kulturen ist erfolgreich von einem der Erfinder erreicht worden. Hierbei wurde *Streptomyces aureofaciens*, das Chlortetracyclin erzeugt, unter Verwendung des funktionellen Genoms bzw. Erbguts aus *Streptomyces pimprina* biologisch umgebildet, welches letzteres das gegen Fungi wirkende Antibiotikum Thiolutin erzeugt. Das biologisch umgebildete *Streptomyces aureofaciens* erzeugt ausser Tetracyclin ebenfalls Thiolutin.

Die Erfinder haben auch funktionell nicht spezifische menschliche schuppenförmige Zellen aus der Mundhöhle mit dem das funktionelle Genom aus menschlichem Insulin erzeugenden Zellen umgebildet, um die bukkalen Zellen zur Erzeugung von Insulin geeignet zu machen, wie dies durch einen speziellen Radioimmunitätsversuch gemessen worden ist.

Für eine Umbildung eines rasch wachsenden Zellsystems, wie Mikroorganismen mit genetischem Material aus menschlichem Insulin erzeugenden Zellen, ist das Bakterium *Escherichia coli* von mehreren Forschern eingehend untersucht worden. Jedoch haben diese Untersuchungen noch zu keinem Erfolg geführt. *Escherichia coli*, das eine megaloplastische Zelle ist (ohne definierten Kern), scheint offenbar ein ungeeignetes Modell für einen Umbildungsversuch mit genetischem Material aus den entwickelten eukaryotischen Zellen (mit einem definierten Kern) zu sein, da *Escherichia coli* kein geeignetes nukleares Netzwerk haben würde, genetische Segmente aus menschlichen Zellen einzubringen, die an der Insulinerzeugung beteiligt sind. Es ist auch von *Escherichia coli* nicht bekannt, irgendwelche langkettigen Aminosäuren zu erzeugen, die wesentlich für eine Synthese des Insulins sein würden. Jedoch sind Fungi, die rasch wachsen, eukaryotische Zellen, von denen bekannt ist, dass sie langkettige Aminosäuresequenzen, wie einige Antibiotika, erzeugen. Demzufolge ist für eine Umbildung ein primitiver Fungus mit dem funktionellen Gen-Bestand aus menschlichem Insulin erzeugenden Zellen zur Gewinnung von Insulin verwendet worden.

Zusammenfassend ist als Stand der Technik bekannt, Bakterienzellen (*Escherichia coli*) mit genetischem Material aus einem anderen *Escherichia coli* umzubilden und menschliche und tierische Zellen mit genetischer Substanz aus anderen durch Viren (tumorbildenden und anderen Viren) infizierten

menschlichen und tierischen Zellen umzuwandeln. Es ist jedoch keine Veröffentlichung über eine Umbildung von primitiven Mikroorganismen, wie einem Fungus, mit genetischem Material aus menschlichen Zellen mit der Fähigkeit bekannt, eine sehr spezialisierte oder spezifische Substanz zu erzeugen, um die Mikroorganismen in die Lage zu versetzen, die spezifische Substanz, nämlich Insulin, durch diese primitiven Mikroorganismen zu erzeugen.

Aufgabe vorliegender Erfindung war es nun, ein verbessertes Verfahren zur Gewinnung von Insulin durch eine genetische Umbildung von Funguszellen zur Verfügung zu stellen. Die Erfindung löst diese Aufgabe.

Die Erfindung bezieht sich auf das im Anspruch 1 definierte Verfahren zur Erzeugung von Insulin durch genetisch umgebildete Funguszellen. Bei einer besonderen Ausführung dieses Verfahrens werden Pankreaszellen, entweder vom Menschen oder von Tier-Spezies, in einem selektiv differenzierten, mit Aminosäuren angereicherten Medium dispergiert und unter Zellwachstumsbedingungen an Luft gezüchtet, um ein Wachstum der Insulin erzeugenden β -Zellen zu erreichen. Die erhaltene Nährlösung wird dann serienmässig mehrmals in Sekundärkulturen weitergezüchtet, bis die gewünschte Höchstmenge an Zellen erreicht ist. Die funktionellen genomischen Bestandteile, welche die Fähigkeit der Zellen zur Erzeugung von Insulin bestimmen, werden dann aus den Zellen extrahiert. Der Extrakt wird in einem weiteren, mit Aminosäuren angereicherten Nährmedium in einem Inkubationsgefäss dispergiert. Die Dispersion wird dann mit einer neuen Spezies des Fungus des Genus *Trichosporon* beimpft, der aus dem Boden isoliert und als TC-1176 bezeichnet worden ist. Die Hinterlegung des neuen Bodenbakteriums *Pseudosacccharomyces* TC-1176 ist gemäss Eingabe vom 29. April 1971 (866 O. G. 638) bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, erfolgt. Das Bakterium hat die Bezeichnung ATCC 20477 erhalten.

Die Kultur wird dann unter Zellwachstumsbedingungen in Gegenwart eines antifungalen Membranpermeabilitätsmittels und Mitogen inkubiert, um das funktionelle Genom bzw. das Erbgut in die Funguszellen einzubringen. Die erhaltenen biologisch umgebildeten Funguszellen werden dann in ein mit Kohlehydraten und Stickstoff angereichertes Medium überführt, das unter Zellwachstumsbedingungen gehalten wird, bis der erwünschte Höchstwert an Funguswachstum erreicht ist. Danach werden die Zellen aus den Medien abgetrennt, und das Insulin wird aus den Zellen und der überstehenden Flüssigkeit unter Anwendung üblicher Techniken extrahiert.

Nachstehend werden im einzelnen die Verfahrensstufen, die bei der Extraktion des funktionellen Genoms, der Umbildung der Funguszellen und der Züchtung angewendet werden können, und andere Eigenschaften der umgebildeten Funguszellen beschrieben.

I. Züchtung eines freien Zellen enthaltenden selektiven Systems von β -epithelähnlichen Zellen

Die Bauchspeicheldrüsen erhält man durch steriles Sezieren, vorzugsweise aus menschlichen Föten bei der Autopsie, und trennt sie von der umhüllenden Peritonealhaut und zerschneidet sie unter Verwendung einer gebogenen Iris-Schere und der stumpfen Kante einer BD 19-Skalpellklinge in feine Stückchen. Anschliessend werden die kleingeschnittenen Bruchstücke 30 Minuten in 0,125prozentigem Trypsin bei etwa 32 bis 39°C (Höchstwert bei 37°C) tryptinisiert. Dann werden die Zellen zentrifugiert, und das restliche Trypsin wird neutralisiert, indem man die Zellen in dem Nährmedium suspendiert. Die Zellen werden als frei suspendierte Zellen 4 Tage lang bei etwa 32 bis 39°C (Höchstwert bei 37°C) in sterilen Kunststoffflaschen mit geöffneten Belüf-

tungsdeckeln gezüchtet, wobei man minütlich 8 bis 16 Liter Luft durchströmen lässt, die in dem mit Wasserrinnen für die Feuchtigkeit versehenen Inkubationsgefäss zirkuliert. Das Medium («Medium alpha HC») ist ein selektives charakteristisches Medium, das ein selektives Wachstum der Insulin erzeugenden β -epithelähnlichen Zellen erlaubt.

Ein beispielsweise mit Aminosäuren angereichertes Nährmedium ist als «Medium 199» mit Earle'scher Base bekannt (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73 (1950), 1; Growth 15 (1951), 11; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74 (1950), 22; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78 (1951), 880; J. Cell & Comp. Physiol. 36 (1950), 411; J. Am. Med. Assn. 151 (1953), 1081). Je Liter Medium fügt man etwa 5 bis 20 ml, vorzugsweise etwa 10 ml, Leberextrakt, etwa 5 bis 20 mg, vorzugsweise 12,5 mg, Hydrocortison-sulfat und geringe Mengen Antibiotika und Mittel gegen Fungi zu.

Eine bevorzugte Zusammensetzung des Nährmediums zur Züchtung von Pankreaszellen in dem «Medium alpha HC» enthält die folgenden Bestandteile:

Medium 199 mit Earle'scher Base («GIBCO» der Grand Island Biological Co.)	100 ml
injizierbarer Leberextrakt («Lexavite-Lilly»)	1,0 ml
Hydrocortison-sulfat	1,25 mg
kristallines Penicillin	50 000 Einheiten
Streptomycin-sulfat	50 mg
Nystatin, ein Polyen-Antibiotikum gegen Fungi	5 000 Einheiten.

Nach einer 4tägigen Züchtung in dem vorgenannten charakteristischen Nährmedium werden die Züchtungen mit «Medium alpha» als Sekundärkultur weitergezüchtet, welches letzteres die gleichen Bestandteile wie das «Medium alpha HC» aufweist, jedoch kein Hydrocortison-sulfat enthält. Alle 4 bis 8 Tage werden die Flaschen durch Teilen des Volumens des Nährmediums und der Zellen in zwei gleiche Anteile und Rekonstituieren mit der Zugabe eines entsprechenden Volumens frischen Nährmediums als Sekundärkulturen weitergezüchtet. Die Insulin-Untersuchungen unter Anwendung der Radioimmunitätstechnik werden jeweils am 8ten Tag vor der nächsten Weiterzüchtung als Sekundärkultur durchgeführt.

II. Extraktion des makromolekularen funktionellen Genoms

Das funktionelle Genom kann nach einer der nachstehenden verschiedenen Methoden extrahiert werden:

(A) Die nach der Stufe I erzeugten Kulturen (Zellen und Nährmedium) enthalten in einer Grössenordnung von 80 bis 100 Mikroeinheiten je ml immun reagierendes Insulin (IRI). Nach 3 und 6 derartigen serienmässigen Sekundärkulturen werden 10 ml des Nährmediums, das Zellen nach einer 8tägigen Sekundärkultur enthält, bei 1800 bis 2000 UpM 20 Minuten lang zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird nochmals weitere 20 Minuten bei 2800 bis 3000 UpM zentrifugiert. Die beiden Zentrifugate werden zusammengegeben und mit isotonischer Normalkochsalzlösung gewaschen und schliesslich 3 mal zentrifugiert, um Spuren von Insulin enthaltendem Nährmedium zu entfernen.

Die vereinigten zentrifugierten Zellen werden zuerst einer osmotischen Lysis unterworfen, indem man sie in 5 ml sterilem destillierten Wasser bei neutralem pH-Wert suspendiert. Als nächstes werden die Zellen und ihre Membranen einer niederen Temperaturen erzeugenden Lysis und Zerreissung durch mehrmaliges alternierendes Einfrieren der Suspension bei -80°C mittels Trockeneis und Aceton und Auftauen auf 37°C unterworfen. Nach dem letzten Auftauen

wird das Zell-Lysat weiterhin 30 bis 60 Sekunden lang mittels eines «Branson»-Ultraschallgerätes (Vibrator) bei 3,5 Watt beschallt.

Nach der Beschallung wird die Gesamtlösung durch ein steriles «Millipore»-Filter (40 m Mikron) filtriert. Das erhaltene Produkt wird danach unter dem Mikroskop untersucht, um zu gewährleisten, dass es frei von Teilchen und Hautbruchstücken ist. Die erhaltene makromolekulare Zubereitung wird dann als funktionelles Genom in den Umbildungsversuchen verwendet. Alle Verfahrensmassnahmen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

(B) Alternativ kann man unter Verwendung geringer Volumina der Zellmassen 5 ml des Gesamtnährmediums mit einem Gehalt an den fötalen β -epithelähnlichen Zellen und dem «Medium alpha» mit dem gleichen Volumen sterilen destillierten Wassers vermischen. Nach einem abwechselnden Gefrieren und Auftauen und Beschallen und Filtrieren durch ein «Millipore»-Filter (40 m Mikron) – wie unter II(A) beschrieben – wird die zellfreie Gesamtlösung als funktionelles Genom verwendet.

(C) In einer zweiten Versuchsreihe wird nach einer Behandlung der Zellen wie unter II (A) beschrieben das zellfreie Lysat 3 mal mit dem gleichen Volumen aus einem Gemisch von Isopentanol (Isoamylalkohol) und Chloroform im Verhältnis 1:24 extrahiert. Die Lösungsmittelphasen werden vereinigt und entweder gefriergetrocknet oder bei 4°C an Luft getrocknet und mit sterilem Wasser oder steriler Kochsalzlösung bei einem pH-Wert im Bereich von 7 bis 10 (Optimum bei pH 8) rekonstituiert und dann als Umbildungsfaktor verwendet.

(D) Bei einer dritten Versuchsreihe werden die Zell-Lysate unter Verwendung der Hirt'schen oder einer anderen Technik zur Gewinnung von DNA extrahiert.

Bei diesen Versuchen ist ersichtlich, dass die besten Ergebnisse für die Umbildung und gegebenenfalls für die Insulingewinnung mit einem funktionellen Genom erhalten werden, das nach den Methoden II (A) und II (B) erhalten worden ist, obwohl DNA-Extrakte nach den Methoden II (C) und II (D) ebenfalls verwendet werden können.

III. Verfahren und Techniken zur Umbildung der Funguszellen mit Insulin erzeugenden β -epithelähnlichen Zellen von menschlichen Föten

Die genomischen Zubereitungen aus den spezifischen Zellen, die nach den Methoden II (A), II (B), II (C) und II (D) hergestellt worden sind, werden jeweils in 5 ml des «Medium alpha» eingebracht, das die folgende Zusammensetzung aufweist:

Medium 199 mit Earle'scher Base	
(«GIBCO» der Grand Island Biological Co.)	100 ml
injizierbarer Leberextrakt («Lexavite-Lilly»)	1,0 ml
Penicillin	50 000 Einheiten
Streptomycin	50 mg
Nystatin ^{*)}	5 000 Einheiten.

^{*)} gegebenenfalls können Hamycin oder Griseofulvin oder Amphoterizin-B oder andere Mittel gegen Fungi in diesem Medium sowie demjenigen der Methode I verwendet werden.

5 ml jedes Mediums werden in 15×2,5 cm grossen sterilen Röhren mit einer Suspension des neuen Erdbakteriums *Pseudosaccharomyces* TC-1176 geimpft und auf einem «Kahn»-Schüttler mit 400 Schüttelungen je Minute bewegt und bei etwa 27°C (26 bis 28°C) inkubiert. Nach 120 Stunden

werden die Funguszellen, die in Gegenwart der Mittel, die die Permeabilität der Membranen der Fungi (wie Nystatin, Hamycin, Griseofulvin oder Amphoterizin-B oder andere Antifungimittel oder Membranpermeabilitätsmittel) beeinflussen, und in Gegenwart des funktionellen Genoms gezüchtet worden sind, damit die Funguszellen mit geänderter Membranpermeabilität zur Einbringung des funktionellen Gen-Bestandes in ihre intrazelluläre Struktur befähigt werden, auf eine Petriplattenkultur mit einem Glukose-Hefe-Agar ausgestrichen und 6 Tage bei etwa 27°C inkubiert.

Einige Sporenkolonien, die sich entwickelt haben, werden selektiv isoliert und auf Schrägagar des gleichen Mediums übertragen, als Sekundärzüchtung weitergezüchtet und für eine weitere gross angelegte Züchtung konserviert. Um aus dem Fungus TC-1176 Insulin zu erzeugen, werden Flüssigkeitskulturen von beiden Oberflächen und submers belüftete Kulturen hergestellt. Zu diesem Zweck werden Schüttelflaschen und Fermentoren unterschiedlicher Fassungsvermögen verwendet. Aus Gründen der Ergiebigkeit werden hauptsächlich Submerskulturen mit einer Belüftung von 0,25 bis 1 Volumen steriler Luft je Volumen Flüssigkeit angewendet. Oberflächenkulturen, die nicht bewegt werden, können ebenfalls mit verlängerter Inkubationszeit hergestellt werden.

Das Verfahren zur Gewinnung von Insulin unter Verwendung des Fungus TC-1176 ist ähnlich den an sich bekannten Verfahren, die in der Fermentationsindustrie zur Erzeugung von Antibiotika und Enzymen angewendet werden. Das Nährmedium besteht aus Kohlehydratquellen, wie Zuckern, Alkoholen und ihren Estern, Stärke und Ölen, und Stickstoffquellen, die sowohl organischer als auch anorganischer Natur sein können. Beispiele von Stickstoffquellen organischer Natur sind zahlreiche Formen von Ölkuchen, Peptonen und Proteinen pflanzlichen und tierischen Ursprungs, und Beispiele von anorganischen Stickstoffquellen sind Nitrate, Nitrite, Ammoniumsalze, Harnstoff usw. Des weiteren können die Medien zahlreiche Spurenelemente, Vitamine und Wachstumsbeschleuniger enthalten. Der pH-Wert des Nährmediums kann im Bereich von 2 bis 10 liegen, je nach den Bestandteilen der Medien. Die Inkubationstemperatur liegt bei 16 bis 32°C. Das Nährmedium mit dem Funguswachstum wird nach einer geeigneten Zeitdauer des Wachstums geerntet, die durch Versuche vorbestimmt wird, und die geernteten Zellen werden zur Extraktion des aktiven, in den Funguszellen erzeugten Metaboliten, nämlich des Insulins, verwendet.

Das Verfahren zum Wachsen des Fungus wird weiterhin durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Ein Nährmedium mit einem Gehalt von 3% entfettetem Sojabohnenmehl, 2% Glukose, 2% Glycerin, 0,5% Hefeextrakt und 1% Magermilchpulver wird mit destilliertem Wasser vermischt. Der pH-Wert wird auf 6,5 eingestellt. Das Nährmedium wird auf 500 ml-Flaschen verteilt, die jeweils 100 ml Nährmedium enthalten, und 30 Minuten bei 120°C sterilisiert. Nach dem Abkühlen wird 1 ml einer Suspension von Funguszellen aus einer 8 Tage alten Züchtung des im Kühlschrank aufbewahrten umgebildeten TC-1176 überimpft, und die Flaschen werden in einem Drehschüttler mit 220 UpM in einem auf 28°C konstant gehaltenen Raum angeordnet. Die Flaschen werden von Zeit zu Zeit auf Sterilität, auf Wachstum und den Verbrauch an Zuckern und anderen Bestandteilen untersucht. In Abständen von 40 bis 96 Stunden, wenn ein entsprechendes Wachstum der Zellen und der biologischen Synthese von Insulin bei einem Höchstwert angelangt ist, werden die Flaschen abgeerntet. Die Masse der Hefezellen mit Pseudomycelbruchstücken wird geerntet, und die Zellen werden mehrmals abwechselnd mit

Wasser und Kochsalzlösung gewaschen, bis sie frei von den Bestandteilen des Nährmediums sind. Die derart erhaltenen abfiltrierten oder zentrifugierten Zellen werden zur Gewinnung des Insulins extrahiert.

Beispiel 2

Nährmediumzusammensetzungen mit einem Gehalt an «Medium 199» mit Earle'scher Base mit 1% Leberextrakt, Penicillin und Streptomycin werden beimpft und in der gleichen Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben, gezüchtet. Die erhaltenen Funguszellen werden zur Gewinnung des Insulins extrahiert.

Beispiel 3

Nährmediumzusammensetzungen mit einem Gehalt an den unter (1) genannten Zuckern und mit organischen und anorganischen Stickstoffquellen, Mineralsalzen und Vitaminen werden mit TC-1176-Zellen beimpft und bei der optimalen Temperatur mittels einer Oberflächenkultur inkubiert.

Nach einer Inkubationsdauer von 3 bis 30 Tagen, je nach der Wachstumsgeschwindigkeit des Fungus-Stammes, werden die Inhalte der Flaschen oder Gefässe, in denen der Fungus unter sterilen Bedingungen gewachsen ist, vereinigt. Die Funguszellen werden für eine weitere Verarbeitung geerntet und zur Gewinnung des Insulins extrahiert.

Das Filtrat, das häufig eine gewisse Menge an dem aktiven Metaboliten Insulin enthält, kann ebenfalls extrahiert werden.

Obwohl die Erfindung hinsichtlich spezieller diskontinuierlicher kleiner Ansätze beschrieben worden ist, umfasst die vorliegende Erfindung auch andere gleichartige Verfahren, bei denen das Wachstum des Organismus TC-1176 bezüglich der Insulinerzeugung durch absatzweise Fermentierung oder kontinuierliche oder halbkontinuierliche Fermentierungen und anschliessendes Ernten der biologisch umgebildeten Fungizellen für eine Extraktion des Insulins in einem grossen Masstab durchgeführt werden kann.