(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 997 T2** 2008.03.06

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 624 645 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 997.6**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 107 364.5**
(96) Europäischer Anmeldetag: **11.05.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.11.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **04.07.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.03.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/16*** (2006.01)
C07K 14/51 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

10962093	**11.05.1993**	**JP**
31829893	**17.12.1993**	**JP**

(73) Patentinhaber:
Hiraki, Yuji, Kawachinagano, Osaka, JP

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(72) Erfinder:
Suzuki, Fujio, Toyonaka-shi, Osaka-fu, JP; Hiraki, Yuji, Kawachinagano-shi, Osaka-fu, JP; Takahashi, Kazuhiro, Machida-shi Tokyo-to, JP; Suzuki, Junko, Tokyo-to, JP; Kondo, Jun, Machida-shi, Tokyo-to, JP; Kohara, Atsuko, Machida-shi Tokyo-to, JP; Mori, Akiko, Yokohama-shi Kanagawa-ken, JP; Yamada, Ei, Kawasaki-shi Kanagawa-ken, JP

(54) Bezeichnung: **Menschliches Chondromodulin-I-Protein**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung betrifft ein neues menschliches Chondromodulinprotein. Genauer gesagt betrifft sie ein Chondromodulin-I-Protein, das das Wachstum von Chondrocyten in Gegenwart oder Abwesenheit von Fibroblasten-Wachstumsfaktor stimulieren kann und isolierte DNA (ein Gen), kodierend das Protein, Expressionsvektoren, enthaltend die DNA, Transformanten, die rekombinantes Chondromodulin-I-Protein erzeugen können, ein Verfahren zur Erzeugung eines Chrondromodulin-I-Proteins durch Kultivierung der Transformanten und eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend Chondromodulin-I-Protein als Wirkstoff. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung des Chondromodulin-I-Proteins bei der Behandlung von Brüchen und verschiedenen Knorpelerkrankungen und als Anti-Tumor-Arzneimittel.

STAND DER TECHNIK DER ERFINDUNG

[0002] Fast alle Knochen von Säugern, außer den flachen Knochen, wie z.B. dem Cranialknochen und ähnlichen, werden durch einen Mechanismus gebildet, der "intraknorpelige Verknöcherung" genannt wird, und der die Expression von Primordialchondrocyten während des Embryonalstadiums, das Wachstum und die Differenzierung von knorpelartigen Zellen, die Erzeugung von Primordialknorpel, wie z.B. Proteoglycagon, Collagen II, Collagen IX, Collagen X und ähnlichem, die Infiltration von Kapillargefäßen, begleitet von einem Abbau von Grundsubstanz des Knorpels und Fortschreiten der Calzifizierung um die Vesikel der Grundsubstanz und den Ersatz davon durch Knochen als Endstufe umfasst. So spielt der Knorpelmetabolismus eine signifikant wichtige Rolle bei der Knochenbildung, insbesondere bei einer Verlängerung des Knochen entlang der Achse.

[0003] Es war bekannt, dass eine Vielzahl von Hormonen und Wachstumsfaktoren an der Knochenbildung (der Osteogenese) teilhaben, einschließlich dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF1, IGF2), dem Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), dem Wachstumshormon, dem transformierenden Zellwachstumsfaktor (TGF-β) und ähnlichen. Es wurde auch vorgeschlagen, dass ein bestimmter aktiver Faktor im Knorpel existiert, der das Wachstum und die Differenzierung von Chondrocyten stimuliert. Es gab jedoch keine Berichte, die die Reinigung des Faktors in einem solchen Ausmaß offenbaren, dass eine einzelne Bande auf SDS-PAGE erhalten wird und die definitive physiologische Aktivität wurde nicht bestimmt. Neam et al. [Peter J. Neam et al., Journal of Biological Chemistry Bd. 265, Nr. 17, 9628–9633 (1990)] berichteten, dass sie ein Zuckerprotein aus Rinderknorpel abtrennten, das eine Aminosäuresequenz aufwies, die zu der von Chondromodulin hoch ähnlich ist, und zwar im Verlauf ihrer Studien im Hinblick auf die Identifizierung konstitutiver Proteine im Knorpel. Sie haben jedoch immer noch nicht die biologischen Funktionen des Zuckerproteins aufgeklärt.

[0004] Das Protein, das das oben erwähnte Wachstum der Chondrocyten betrifft, ist als Chondromodulinprotein mit biologischen Aktivitäten, wie unten illustriert, bekannt.

[0005] Die Expression des Wachstums und die Differenzierung von Chondrocyten spielt eine wichtige Rolle im Verlauf der Erholung von Brüchen oder verschiedenen Knorpelerkrankungen wie folgt: entzündliche Reaktionen an der verletzten Stelle, Wachstum von von Periost-abstammenden Zellen, Expression und Wachstum von Chondrocyten, Synthese extra-zellulärer Grundsubstanzen, Verkalkung der Substanzen und ihr Ersatz durch Knochengewebe. Wie einfach verstanden werden wird, ist das Wachstum von Knorpelgewebe an der Stelle von Brüchen essentiell für die Bildung von Knochengewebe. Es ist außerdem naheliegend, dass das Wachstum der Chondrocyten ebenfalls im Verlauf der Erholung von Knorpelerkrankungen wichtig ist, die von einer Knorpelzerstörung oder -verletzung begleitet werden. Weiterhin tritt vor dem Wachstum oder der Metastase von Tumorzellen eine Infiltration von Blutgefäßen in Gewebe auf, für eine Zufuhr der notwendigen Energie zu den Tumorzellen und daher wird angenommen, dass die Inhibition einer solchen Infiltration für die Prävention von Wachstum oder Metastase von Tumorzellen effektiv ist.

[0006] Es wurde berichtet, dass ein Gen, das das Chondromodulin-I-Protein kodiert, aus einer cDNA-Bibliothek kloniert wurde, die von fötalem Rinderknorpel konstruiert wurde und in tierischen Zellen exprimiert wurde. Das exprimierte rekombinante Protein besitzt äquivalente Aktivitäten zu denjenigen von gereinigtem bovinen Chondromodulin-I-Protein. Seki et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 175, 971–977 (1991); und europäische Patentveröffentlichung Nr. 473,080. In der vorliegenden Beschreibung wird die Bezeichnung "menschliches Chondromodulin-I-Protein" oder "menschliches Chondromodulin-I" in einigen Fällen durch die Abkürzung "hChM-I" ausgedrückt.

[0007] Um rekombinante Proteine bei Menschen sicher verwenden zu können, ist es notwendig, ihre Antige-

nizität im Menschen zu überprüfen, was durch eine Analyse der Struktur des menschlichen Chondromodulin-I-Gens und einem Vergleich derselben mit derjenigen des Rinder-Chondromodulin-I-Gens durchgeführt werden kann. Wenn irgendwelche Unterschiede angetroffen werden, die antigen sein können, wird es bevorzugt, das rekombinante Chondromodulin-I nach Modifikation des Rinder-Typ-Chondromodulin-I-Gens zur Umwandlung des rekombinanten Rinderproteins in den menschlichen Typ mit weniger Antigenzitat durch genetische Manipulation umzuwandeln. Die Präparation von menschlichem Typ Chondromodulin-I-Protein durch Extraktion und Reinigung aus menschlichen Chondrocyten ist tatsächlich im Hinblick auf Kosten und Quellen unmöglich.

[0008] Wie es sich aus dem Obigen ableiten lässt, ist es wünschenswert eine ausreichende Menge eines Chondromodulinproteins zu erhalten, das die Amplifikation von Chondrocyten oder die Infiltration von Blutgefäßen inhibieren kann, wobei das Protein im Menschen weniger antigen ist und dadurch Behandlungsverfahren bereitzustellen, die für die oben erwähnten Erkrankungen effektiv sind. Die industrielle Produktion des Proteins aus Knorpelgewebe war jedoch sehr schwierig und praktische Anwendungen des Proteins wurden aufgrund eines Fehlens von Mitteln, um das Protein in großer Menge zu erhalten, behindert.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die vorliegenden Erfinder haben extensive Studien mit dem Ziel durchgeführt, eine große Menge an menschlichem Chondromodulinprotein unter Verwendung rekombinanter DNA-Techniken zu erzeugen und waren nun bei der Isolation eines neuen Proteins erfolgreich, was zu einer Familie von Chondromodulinproteinen gehört, nützlich für das Etablieren des Zwecks der Erfindung, klonieren eines Gens (cDNA), das das Protein kodiert, Konstruktion eines Expressionsvektors, Transformation heterogener Zellen und Produktion von rekombinanten Proteinen durch Kultivierung der Transformanten. Die vorliegenden Erfinder haben auch die physiologischen Aktivitäten des so erhaltenen menschlichen Chondromodulin-I-Proteins untersucht und demonstriert, dass das Protein die oben erwähnten Aktivitäten besitzt und dass es für die Behandlung von Brüchen, verschiedenen Knorpelerkrankungen, Krebs und ähnlichem nützlich ist und in pharmazeutische Zusammensetzungen formuliert werden kann.

[0010] So stellt diese Erfindung ein menschliches Chondromodulin-I-Protein bereit, wobei es sich um ein wasserlösliches Protein handelt, bestehend aus einem Polypeptid, das ein Molekulargewicht von ungefähr 26.000 Dalton auf SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufweist und die Fähigkeiten zur Stimulation des Wachstums von Chondrocyten in Gegenwart oder Abwesenheit von Fibroblasten-Wachstumsfaktor, zur Unterstützung der Differenzierungs-Potenz von Chondrocyten und zur Inhibition des Wachstums von vaskulären Endothelzellen aufweist.

[0011] Die Erfindung stellt auch ein isoliertes Gen (DNA) bereit, kodierend menschliches Chondromodulin-I-Protein und Expressionsvektoren, enthaltend Sequenzen, die für die Expression des Gens nötig sind, die mindestens eine Promotorsequenz, eine Signalpeptid-ähnliche Sequenz, eine DNA-Sequenz, kodierend das Chondromodulin-I-Protein und eine Terminatorsequenz, falls gewünscht, umfassen.

[0012] Diese Erfindung stellt weiterhin eine Transformante bereit, transformiert durch einen Expressionsvektor der Erfindung und ein Verfahren zur Erzeugung von menschlichem Chondromodulin-I-Protein durch Kultivierung der Transformante in einem geeigneten Medium zur Expression der DNA, kodierend das Chondromodulin-I-Protein und Gewinnen des Chondromodulin-I-Proteins aus der resultierenden Kulturbrühe.

[0013] Diese Erfindung stellt auch rekombinante menschliche Chondromodulin-I-Protein Produkte bereit, erzeugt durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung.

[0014] Diese Erfindung stellt auch die Verwendung von menschlichem Chondromodulin-I-Protein bereit, erhalten gemäß dem Verfahren der Erfindung bei der Behandlung von Brüchen, verschiedenen Knorpelerkrankungen und Krebs.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die Reinigung des neuen menschlichen Chondromodulin-I-Proteins kann durch irgendeines der konventionellen Verfahren, die dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt sind, durchgeführt werden. Das Chondromodulin-I-Protein wurde durch eine Isolation von Chondrocyten aus menschlichem Knorpel, Kultivierung der Zellen, Abtrennen des Überstands aus der kultivierten Brühe durch Zentrifugation, Konzentration des Überstands durch Ultrafiltration, Unterwerfen des Konzentrats einer Molekular-Siebchromatografie auf einer Se-

phacryl-S1200-Säule und Reinigung des resultierenden Produkts auf wiederholte Weise mit einer YMC-Pack-C4-Chromatografie, unter Veränderung der Elutionsbedingungen, erhalten und gereinigt.

[0016] Dieses Verfahren weist jedoch einige Nachteile auf, aufgrund der Schwierigkeit eine stetige Zufuhr großer Mengen von menschlichem Gewebe sicherzustellen. Alternativ kann gereinigtes Chondromodulin-I-Protein, wie in den Beispielen unten, durch Kultivierung von Zellen erhalten werden, die mit dem hChM-I-Gen transformiert, Abtrennen des Chondromodulin-I-Proteins, assoziiert mit Albumin von anderen kontaminierenden Proteinen in der Kulturbrühe durch eine Blue Sepharose-Säule oder ähnliches und wiederholte Reinigung, beispielsweise durch eine Chromatographie unter Verwendung einer YMC-Pack-C4-Säule oder ähnlichem, während die Elutionsbedingungen verändert werden. So hat das gereinigte Protein der Erfindung ein Molekulargewicht von ungefähr 26.000 Dalton auf SDS-PAGE und Aktivitäten, um das Wachstum von Chondrocyten in Gegenwart oder Abwesenheit von Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) zu stimulieren, die Differenzierungs-Potenz von Chondrocyten zu unterstützen und das Wachstum von vaskulären Endothelzellen zu inhibieren.

[0017] Die Aminosäuresequenz des gereinigten Peptids wurde bestimmt, und wird in den SEQ ID Nrn. 2, 3 oder 4 bereitgestellt.

[0018] Die vorliegenden Erfinder isolierten dann cDNA, kodierend das Chondromodulin-I-Protein, klonierten die DNA und konstruierten Expressionsvektoren. Eine Rasensequenz, die das Chondromodulin-I-Protein kodiert, wird in SEQ ID Nr. 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 bereitgestellt. Unter diesen Sequenzen enthalten diejenigen, die in SEQ ID Nr. 2, 3 und 4 teilweise eine Rasensequenz (-sequenzen) des Ringergens, da die in der PCR verwendeten Primer auf der Basis des Rinder-Chondromodulingens hergestellt wurden. Sie fallen jedoch in den Umfang der Erfindung, da in Transformanten exprimierte rekombinante Proteine, transformiert mit diesen DNAs keine Variationen in der Aminosäuresequenz im Vergleich zu derjenigen von hChM-I-Proteinen zeigen, was zeigt, dass sie dieselbe Nützlichkeit und Wirkung wie das hChM-I-Gen aufweisen und für die Zwecke der vorliegenden Erfindung nützlich sind.

[0019] Sobald die Aminosäure- und DNA-Sequenzen von menschlichem Chondromodulin-I-Protein bestimmt sind, ist es einfach, aktive Derivate des menschlichen Chondromodulin-I-Proteins durch konventionelle Verfahren, wie z.B. eine ortspezifische Mutation von DNA, die zu einer Deletion, einem Ersatz, einer Modifikation oder Addition von Aminosäuren ohne Veränderung der Eigenschaften von menschlichem Chondromodulin-I-Protein führt, zu erhalten. Für die Zwecke der Erfindung, wie hier offenbart und beansprucht, bezieht sich die Bezeichnung menschliches Chondromodulin-I-Protein sowohl auf das natürlich auftretende menschliche Chondromodulin-I-Protein als auch rekombinantes menschliches Chondromodulin-I-Protein, erzeugt durch das Verfahren der Erfindung.

[0020] Ein DNA-Fragment (-Fragmente), kodierend das Chondromodulin-I-Protein der Erfindung, kann auf konventionelle Weise unter Verwendung von DNA-Bibliotheken erhalten werden, enthaltend ein Gen, kodierend das Protein, wie unten illustriert.

[0021] Beispiele für die verwendbare Bibliothek sind diejenigen, die aus RNA hergestellt wurden, die aus menschlichem normalem Knorpel oder menschlichem Chondrosarcom isoliert wurden, einschließlich Plasmid-cDNA-Bibliotheken, Phagen-cDNA-Bibliotheken und Phagen-genomischen Bibliotheken.

[0022] Im Fall einer Phagen-cDNA-Bibliothek wird normaler menschlicher Knorpel oder menschliches Chondrosarcom-Gewebe in flüssigem Stickstoff pulverisiert, in einem Lösungsmittel, wie einer wässrigen Guanidiniumisothiocyanatlösung homogenisiert und es werden Präzipitate von Gesamt-RNA durch Cäsiumchlorid-Gleichgewichtsdichtegradienten-Zentrifugation gemäß dem Verfahren von Chirgwin et al., Biochemistry, 18, 5294–5299 (1978) abgetrennt. Nachdem die resultierende Gesamt-RNA durch eine Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt wurde, wird sie weiter unter Verwendung einer Chromatographie mit einer Oligo(dT)cellulosesäule gereinigt, um die beabsichtigte Poly(A)-haltige mRNA (polyA$^+$ mRNA), d.h., mRNAs, zu isolieren.

[0023] Eine einzelsträngige cDNA kann durch Hyridisieren von mRNAs, wie vorher hergestellt, mit DNA-Primern, wie den in Nature, 329, 836–838 (1987) beschriebenen, erhalten werden, spezifisch, diejenigen bestehend aus den DNAs, wie dargestellt in SEQ ID Nr. 11 und 12 oder mit Oligo(dT), bestehend aus 12 bis 18 Deoxythymidins in Gegenwart von reverser Transkriptase. Die einzelsträngige cDNA wird in doppelsträngige cDNA durch Behandlung mit Escherichia coli DNA-Polymerase I oder E. coli DNA-Ligase, RNase H oder ähnlichem auf konventionelle Weise umgewandelt, und wird dann mit T4-DNA-Polymerase mit glatten Enden ver-

sehen. An beiden Enden des cDNA-Strangs werden kleine DNA-Fragmente angehängt, wie z.B. ein EcoRI-Adapter mit einer T4-DNA-Ligase, um dieselben Rasensequenzen wie diejenigen zu erzeugen, die mit dem Restriktionsenzym erzeugbar sind.

[0024] Alternativ ist auch eine DNA mit EcoRI-Restriktionsenden durch Behandlung der cDNA mit Methylase, wie EcoRI-Methylase, erhältlich um (eine) inherente EcoRI-Restriktionsstelle(n) zu schützen, Zugabe von EcoRI-Linkern oder ähnlichem zu beiden Enden mit T4-DNA-Ligase und Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI. Wenn andere Restriktionsstellen, wie z.B. BamHI oder ähnliche, als Klonierungsstelle im Vektor verwendet werden sollen, würde die Reihe der Prozeduren, wie oben beschrieben, unter Verwendung von beispielsweise einem BamHI-Adapter oder BamHI-Methylase, BamHI-Linker und dem Restriktionsenzym BamHI durchgeführt werden.

[0025] Der cDNA-Strang mit wie oben erwähnt behandelten Enden wird dann in einen kommerziell erhältlichen λ-Phagenvektor, beispielsweise λZAP (PROMEGA Biotechs, Inc.) oder pGEM2 (PROMEGA Biotechs, Inc.) an der EcoRI-Stelle auf konventionelle Weise verpackt, um rekombinante λ-Phagen-DNAs oder rekombinante Plasmid-DNAs zu erhalten.

[0026] Die resultierenden λ-Phagen-DNAs werden bei der in vitro-Verpackung durch kommerziell erhältliche in vitro-Verpackungskits, wie z.B. Gigapack Gold (PROMEGA Biotechs, Inc.) verwendet, um λ-Phagenpartikel zu erhalten, die rekombinante λ-Phagen-DNA enthält.

[0027] Die resultierenden λ-Phagenpartikel werden dann in Wirtszellen, wie E. coli, gemäß konventionellem Verfahren (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 85 (1982)) für die Amplifikation transfiziert. Rekombinante Plasmid-DNAs werden in Wirtszellen wie E. coli auf konventionelle Weise transformiert und die Transformanten gezüchtet. Die amplifizierten Phagen werden auf Nylonmembranen übertragen, wie z.B. ein Gen-Screening-Plus oder einen Nitrocellulosefilter und mit Alkali behandelt, um Protein zu entfernen, um λ-Phagen-DNA oder Plasmid-DNA, enthaltend cDNA, zu erhalten. Die DNAs des cDNA-Klons werden mit ^{32}p-markierten Sonden hybridisiert, hergestellt aus DNA-Fragmenten von dem vorher klonierten Rinder-Chondromodulingen auf konventionelle Weise oder unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits und werden durch die Plaque-Hybridisierung gemäß dem in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 320–328 (1982) beschriebenen Verfahren selektiert, um eine vollständige oder einen Teil einer cDNA zu erhalten, die hChM-I kodiert.

[0028] Ein Teilfragment des menschlichen Chondromodulin-I-Gens kann durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von PCR-Primern erhalten werden, die auf der Basis einer Aminosäuresequenz von bovinem Chondromodulin-I-Protein entworfen wurden. Als Matrize kann eine cDNA, die auf der Basis von RNA synthetisiert wurde, extrahiert aus menschlichem Chondrosarcom oder menschlichen normalen Chondrocyten auf konventionelle Weise verwendet werden. Ein Gen, das die gesamte Sequenz des menschlichen Chondromodulin-I-Proteins kodiert, kann durch wiederholte Durchführung einer PCR mit Primern, die auf der Basis eines Primers (Primern) entworfen wurden, die bei der Synthese der Matrizen-cDNA verwendet wurden, oder durch Durchführung einer PCR mit Primern, die basierend auf geeignete Anchorsequenzen, angehaftet an das 3'-Ende der cDNA basieren, erhalten werden.

[0029] Alternativ ist auch ein synthetisches Oligonukleotid, hergestellt auf Basis einer DNA-Sequenz, deduziert von der Aminosäuresequenz des Chondromodulin-I-Proteins erhältlich.

[0030] DNA kann aus positiven Plaques nach Amplifikation von Phagen wie beschrieben (T. Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 85 (1982)), verdaut mit geeigneten Restriktionsezymen, wie EcoRI oder ähnlichem und subkloniert in ein Plasmid, wie pUC18, hergestellt werden und die Rasensequenz des gewünschten cDNA-Segments kann beispielsweise durch das Dideoxyverfahren (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463, (1977)) bestimmt werden. Die so erhaltene Basensequenz, beispielsweise die in den SEQ ID Nrn. 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 dargestellte, ist ein Fragment von 892 oder 1006 Nukleotiden in der Gesamtlänge und kodiert ein Protein mit 296 oder 334 Aminosäuren, wobei das Protein die Aminosäuresequenz des reifen Proteins enthält. Die in SEQ ID Nr. 2, 3 und 4 dargestellten Rasensequenzen enthalten teilweise eine Basensequenz (-sequenzen) des bovinen Gens, obwohl die Aminosäuresequenzen, die von ihnen kodiert werden, mit denjenigen des menschlichen Chondromodulin-I-Proteins übereinstimmen.

[0031] Da die DNA, die das Chondromodulin-I-Protein kodiert, kloniert und ihre Sequenz in der vorliegenden Erfindung bestimmt wurde kann man einfach Expressionsvektoren konstruieren, die es Wirtszellen ermögli-

chen ein Chondromodulin-I-Protein zu erzeugen, wobei bekannte Rekombinationstechnologie verwendet wird, beispielsweise durch Insertion der DNA-Verbindung, nach Modifikation des 5'-Endes in einen bekannten Expressionsvektor an geeigneter Stelle des Vektors, stromabwärts von einem Promotor, unter Verwendung eines per se wohl bekannten Verfahrens und Einführung des Expressionsvektors, der die cDNA beherbergt in eine Wirtszelle, wie z.B. eine Escherichia coli-Zelle, Hefezelle oder tierische Zelle, gemäß dem Fachmann bekannten Verfahren.

[0032] Diese Erfindung kann unter Verwendung von irgendwelchen Expressionsvektoren bewirkt werden, die einen Promotor an einer geeigneten Stelle aufweisen, um eine DNA herzustellen, die ein Chondromodulin-I-Protein kodiert, exprimiert in einer gewählten Wirtszelle.

[0033] Um die industrielle Produktion des menschlichen Chondromodulin-I-Proteins zu bewirken ist es notwendig, ein stabiles Wirts-Vektorsystem zu konstruieren, das ein biologisch aktives Protein exprimieren kann. Faktoren, die mit in die Betrachtung einbezogen werden müssen, sind: das natürlich auftretende menschliche Chondromodulin-I-Protein ist ein Zuckerprotein; das menschliche Chondromodulin-I-Protein enthält eine Menge Cysteinreste, deren neuerliche Faltung sich stark auf den Erwerb der physiologischen Aktivität auswirkt und das Expressionsprodukt muss in lebenden Körpern (Zellen) in ein reifes menschliches Chondromodulin-I-Protein verarbeitet werden. Wenn diese Faktoren mit in die Betrachtung einbezogen werden, werden tierische Zelle als Wirt für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bevorzugt.

[0034] Beispiele für Wirtszellen, die für die Transformation geeignet sind, beinhalten tierische Zellen, die unten in den Arbeitsbeispielen beschrieben werden. Dies ist jedoch nicht begrenzend und andere Wirtszellen, wie Mikroorganismen oder Insektenzellen, können verwendet werden.

[0035] Tierische Zellen, die in der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, sind die CHO-Zelle, COS-Zelle, Maus-L-Zelle, Maus-Cl27-Zelle und Maus-FM3A-Zelle. Diese Zellen haben den Vorteil, dass sie reifes hChM-I durch Einführung eines Gens, das hChM-I kodiert, in Form eines Vorläuferproteins erzeugen und sezernieren können.

[0036] Wenn diese Zellen als Wirt verwendet werden, enthalten die Expressionsplasmide vorzugsweise den SV40-Promotor, den Metallothionein-Genpromotor oder ähnliche. Ein Expressionsvektor kann durch Insertion des hChM-I-Gens, modifiziert um eine Signalsequenz aufzuweisen, 5'-terminal stromabwärts von einem Promotor, konstruiert werden. Um eine höhere Expression zu erreichen, d.h., einen Anstieg des Ertrags des Expressionsprodukts, kann der Expressionsvektor 2 oder 3 hChM-I-Gene enthalten, die auf eine derartige Weise inseriert sind, dass die Gene in Tandemweise 5' zu 3' verbunden sind. Alternativ können 2 bis 3 Gene mit jeweils einem Promotor, wie dem SV40-Promotor, angehaftet an die 5'-Stelle in Tandemweise verbunden werden. Eine Polyadenylierungsstelle, beispielsweise eine solche, die von SV40-DNA abstammt, vom β-Globingen oder vom Metallothioneingen, wird stromabwärts vom hChM-I-Gen platziert.

[0037] Expressionsvektoren können ein Gen enthalten, das als Marker zur Selektion dient, wenn es in tierische Zellen, wie eine CHO-Zelle, transformiert wird. Beispiele für selektierbare Marker sind das DHFR-Gen, das eine Methotrexat-Resistenz ergibt und das 3'-Deoxycistoleptamin-Antibiotikum-G-418-Gen und ähnliche. In einem Expressionsvektor werden an 5'- und 3'-Stellen des gewählten Arzneimittel-resistenten Markers Promotoren inseriert, z.B. ein SV40-Promotor bzw. eine Polyadenylierungsstelle. Dies kann durch Insertion eines Markergens in den hChM-I-Expressionsvektor stromabwärts von einer Polyadenylierungsstelle des hChM-I-Gens bewirkt werden. Expressionsvektoren können keine selektierbare Marker für Transformanten enthalten. In einem solchen Fall wird eine Doppel-Transformation unter Verwendung eines hChM-I-Expressionsvektors und eines Vektors durchgeführt, der einen selektierbaren Marker in Transformanten enthält, wie z.B. pSV2neo, pSV2gpt, pMTVdhfr.

[0038] Tierische Zellen, die durch eine doppelte Transformation transformiert wurden, können auf Basis des Phänotyps, wie oben erwähnt, aufgrund der Expression des selektierbaren Markers, selektiert werden. Nachdem Wirtszellen, worin hChM-I exprimiert wurde, nachgewiesen wurden, kann eine doppelte Transformation wiederholt unter Verwendung unterschiedlicher selektierbarer Marker durchgeführt werden, um den Ertrag des Expressionsprodukts hChM-I zu erhöhen.

[0039] Ein Beispiel für einen Expressionsvektor, verwendbar als Plasmidvektor ist pKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1528 (1981)), enthaltend den SV40 frühen Promotor, eine Splice-Sequenz-DNA, abstammend von einem Kaninchen-β-Globingen, eine Polyadenylierungsstelle, abstammend von einem Kaninchen-β-Globingen, eine Poladenylierungsstelle, abstammend vom SV40 frühen Promotor und einen Transkriptionsur-

sprung und ein Ampicillin-resistentes Gen, abstammend von pBR322.

[0040] Allgemein wird ein Expressionsvektor in tierische Zellen durch Transfektion mit Calciumphosphat eingeführt.

[0041] Die Kultivierung von Transfektanten kann auf konventionelle Weise durch Suspensionskultur oder Adhäsionskultur in einem Medium, wie MEM, RPMI1640 in Gegenwart von 5 bis 10% Serum oder einer geeigneten Menge Insulin, Dexamethason, Transferrin oder in einem Serum-freien Medium, durchgeführt werden. Tierische Zellen, die hChM-I exprimieren, sollten hChM-I in dem Kulturüberstand sezernieren und es ist daher möglich, eine Abtrennung und Reinigung von hChM-I unter Verwendung des Überstands der Kulturbrühe von Transformanten durchzuführen. Der Kulturüberstand, der hChM-I enthält, kann durch eine Chromatographie unter Verwendung von Heparinsepharose, blauer Sepharose gereinigt werden.

[0042] Expressionsvektoren, die in Mikroorganismen funktional sind, wie z.B. Escherichia coli, Bacillus subtilis, werden vorzugsweise einen Promotor, einen Ribosomen-Bindungs(SD)-Sequenz, das Chondromodulin-I-Protein-kodierende Gen, einen Transkriptions-Terminations-Faktor und ein Regulatorgen umfassen.

[0043] Beispiele für Promotoren beinhalten diejenigen, die von Escherichia coli oder Phagen abstammen, wie z.B. Tryptophansynthetase (trp), Lactoseoperon (lac), λ-Phagen P_L und P_R, T_5 frühes Gen P_{25}, P_{26}-Promotor. Diese Promotoren können eine modifizierte oder entworfene Sequenz für jeden Expressionsvektor aufweisen, wie z.B. als Pac-Promotor (Agr. Biol. Chem., 52: 983–988, 1988).

[0044] Obwohl die SD-Sequenz von Escherichia coli oder einem Phagen abstammen kann, kann auch eine Sequenz verwendet werden, die so entworfen wurde, dass sie eine Konsensus-Sequenz enthält, bestehend aus mehr als 4 Basen, die zu der Sequenz am 3'-terminalen Ende von 16S-Ribosomen-RNA komplementär ist.

[0045] Der Transkriptions-Terminationsfaktor ist nicht essentiell. Es wird jedoch bevorzugt, dass ein Expressionsvektor einen ρ-unabhängigen Faktor enthält, wie beispielsweise einen Lipoproteinterminator, einen trp-Operon-Terminator.

[0046] Vorzugsweise sind diejenigen Sequenzen, die für die Expression des Chondromodulin-I-Proteingens nötig sind, in einem geeigneten Expressionsplasmid, in der Reihenfolge Promotor, SD-Sequenz, Chondromodulin-I-Proteingen und Transkriptions-Terminationsfaktor in Richtung 5' zu 3' lokalisiert.

[0047] Es ist bekannt, dass die Kopiezahl einer Transkriptionseinheit auf einem Vektor durch Insertion von mehr als einer Einheit, bestehend aus der SD-Sequenz und dem hChM-I-Gen erhöht werden kann (japanische Patentoffenlegungsschrift Nr. 95798/1989), wobei dieses Verfahren für die vorliegende Erfindung verwendet werden kann.

[0048] Typische Beispiele für einen Expressionsvektor sind pVAI2 (japanische Patentoffenlegungsschrift Nr. 95798/1989) und kommerziell erhältliches pKK233-2 (Pharmacia). Eine Reihe von pGEK (Pharmacia)-Plasmiden, die für die Expression fusionierter Proteine bereitgestellt werden, sind jedoch auch für die Expression des Chondromodulin-I-Proteingens der vorliegenden Erfindung verwendbar.

[0049] Eine geeignete Wirtszelle kann mit einem Expressionsvektor transformiert werden, umfassend die DNA, die das Chondromodulin-I-Protein moduliert, und zwar auf konventionelle Weise, um eine Transformante zu ergeben.

[0050] Die Kultivierung der Transformanten kann unter Verwendung von wohl bekannter Verfahren in der Literatur, wie beispielsweise Molecular Cloning (1982), durchgeführt werden.

[0051] Die Kultivierung wird vorzugsweise bei einer Temperatur von ungefähr 28 bis 42°C durchgeführt.

[0052] Die für die Transformation verwendeten Expressionsvektoren außer Wirtszellen, wie die von Insekten oder von Tieren abstammenden Zellen, einschließlich den Säugern, bestehen im wesentlichen aus denselben Elementen wie oben erwähnt. Es gibt jedoch bestimmte bevorzugte Faktoren wie folgt.

[0053] Wenn Insektenzellen verwendet werden, wird ein kommerziell erhältliches Kit, MAXBAC™ gemäß den Lehren des Verkäufers (MAXBAC™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM MANUAL VERSION 1.4) verwendet. In diesem Fall ist es wünschenswert, eine Modifikation durchzuführen, um die Distanz zwischen dem

Promotor des Polyhedringens und dem Initiationskodon zu reduzieren, um die Expression des Gens zu verbessern.

[0054] Trennung und Reinigung des Chondromodulinproteins, erzeugt durch die Transformanten, kann durch irgendeines der dem Fachmann auf dem Gebiet bekannten Verfahren durchgeführt werden.

[0055] Trennung und Reinigung des Chondromodulinproteins, erzeugt durch die Transformanten, kann durch irgendeines der dem Fachmann auf dem Gebiet bekannten Verfahren durchgeführt werden.

[0056] Das rekombinante Polypeptid, exprimiert durch die Wirtszellen, wie Mikroorganismen, einschließlich E. coli, Insektenzellen und tierische Zellen, kann aus der Kulturbrühe durch bekannte Verfahren gewonnen und beispielsweise durch Immunreaktion zwischen dem exprimierten Protein und einem Kaninchenantiserum identifiziert werden, erzeugt gegen ein synthetisches Peptid, enthaltend ein Fragment eines menschlichen Chondromodulin-I-Proteins, wobei ein konventionelles Verfahren, wie z.B. Western-Blot-Analyse verwendet wird.

[0057] Die biologischen Aktivitäten des Chondromodulin-I-Proteins können gemäß dem beschriebenen Verfahren (Suzuki, et al., Methods in Enzymology, 146; 313–320, 1987) bestimmt werden.

[0058] Primere Zellen wurden aus wachsendem Costal-Knorpel isoliert, erhalten von einem Kaninchen und in einer Platte mit 96 Vertiefungen gezüchtet. Wenn die Kultur konfluent wurde, wurden [^{3}H]Tymidin und 0,6 bis 200 ng/ml Chondromodulin-I-Protein und, falls gewünscht, 0,4 ng/ml FGF der Platte zugefügt und die Aufnahme von [^{3}H]Tymidin wurde bestimmt. Für Kontrollexperimente wurden Proben, denen das Chondromodulin-I-Protein und/oder FGF fehlte, simultan behandelt.

[0059] Das Chondromodulin-I-Protein wurde ebenfalls im Hinblick auf die inhibierende Aktivität gegen eine vaskuläre Infiltration durch Bestimmung der präventiven Wirkung auf das Wachstum vaskulärer Endothelzellen bewertet. Die Bewertung basierte auf einer Inhibition gegen die [^{3}H]Tymidin-Aufnahme durch Aorta-Endothelzellen, wie hiernach im Detail in den Beispielen beschrieben. Wenn so das Chondromodulin-I-Protein zu Rinder-Aorta-Endothelzellen zugefügt wurde, war die Aufnahme von radioaktivem Thymidin anscheinend inhibiert.

[0060] Für die Anwendung von hChM-I auf die klinische Behandlung, ist dieses allein oder als pharmazeutische Zusammensetzung, formuliert mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern hierfür, verwendbar. Der hChM-I-Gehalt als aktiver Bestandteil, kann 1 bis 90% (G/G) in Bezug auf die Träger betragen. Beispielsweise kann das erfindungsgemäße hChM-I als Medizin für die externe Anwendung formuliert werden und Verwendung bei der Behandlung von Brüchen, Knorpelerkrankungen finden, wobei diese Medizin beispielsweise durch Vermischen mit, Imprägnieren in oder Anwendung auf physiologisch annehmbare Träger, einschließlich Kollagen, Aterokollagen, Gelatine, Hyaluronsäure, Polyethylenglycol, Polylaktose, Knochenzement, Hydroxyapatit, Keramik, Kohlefasern, Fibrinstärke und ähnliches hergestellt werden. Sie kann oral nach Formulierung in eine geeignete Form verabreicht werden, wie z.B. Körner, feine Körpern, Pulver, Tabletten, Hartkapseln, Weichkapseln, Sirups, Emulsionen, Suspensionen, Lösungen. Sie kann in injizierbare Formen zur intravenösen, intramuskulären, topischen oder subkutanen Verabreichung oder in Suppositorien formuliert werden. Die Formulierungen für die orale, intrarektale oder parenterale Verabreichung können unter Verwendung organischer/anorganischer Träger/Verdünnungsmittel in Form von Feststoffen/Flüssigstoffen hergestellt werden. Beispiele für in Festformulierungen nützliche Exzipienzien beinhalten Laktose, Sccharose, Stärke, Talk, Cellulose, Dextrin, Kaolin, Calciumcarbonat. Flüssige Formulierungen für die orale Verabreichung, beispielsweise Emulsionen, Sirups, Suspensionen und Lösungen können inerte Verdünnungsmittel enthalten, die üblicherweise auf dem Gebiet verwendet werden, wie Wasser oder Pflanzenöl. Zusätzlich zu dem inerten Verdünnungsmittel kann eine Formulierung Additive enthalten, beispielsweise ein Befeuchtungsmittel, Suspendierhilfen, Süßmittel, Aromastoffe, Färbemittel oder Konservierungsmittel. Die flüssigen Formulierungen können in Kapseln beinhaltet sein, die aus einer absorbierbaren Substanz bestehen. Beispiele für Lösungsmittel oder Suspendiermittel für parenterale Formulierungen, wie Injektionen oder Suppositorien beinhalten Wasser, Propylenglycol, Polyethylenglycol, Benzylalkohol, Ethyloleat und Lecithin. Beispiele für Basen für Suppositorien beinhalten Kakaobutter, emulgierte Kakaobutter, Laurintalg, Witepsol. Die Präparation dieser Formulierungen kann auf konventionelle Weise durchgeführt werden.

[0061] Die klinische Dosis hChM-I der vorliegenden Erfindung variiert abhängig von der Verabreichungsweise, dem Alter, dem Gewicht und dem Zustand des zu behandelnden Patienten. Eine geeignete tägliche hChM-I-Dosis der vorliegenden Erfindung bei oraler oder externer Verabreichung an einen Erwachsenen beträgt allgemein ungefähr 1 ng bis 50 mg (für die Injektion 1/10 oder weniger als 1/10 dieser Dosierung), was

einmal, in zwei oder mehreren Teilen in geeigneten Intervallen oder intermittierend verabreicht werden kann. Für die Injektion wird es bevorzugt, die oben erwähnte Dosis kontinuierlich oder intermittierend zu verabreichen.

[0062] In dem Fall, dass das hChM-I der vorliegenden Erfindung für medizinische Zwecke verwendet wird, kann es sich in jeder Form befinden, die biologische und/oder physiologische Aktivitäten von hChM-I ausüben kann, beispielsweise als gereinigtes hChM-I, rekombinantes hChM-I, Kulturbrühe von Transformanten, getrennte Transformanten, behandelte Transformanten, immobilisierte Transformanten, eine Rohenzymlösung oder enzymatisch behandeltes Produkt.

[0063] Die folgenden Beispiele illustrieren die offenbarte Erfindung weiter und detaillieren diese, sollten sie jedoch nicht begrenzen.

BEISPIEL 1

HERSTELLUNG EINES SONDEN-DNA-FRAGMENTS VON EINEM RINDER-CHONDROMODULIN-GEN

[0064] Die Plasmid-DNA wurde von einem klonierten Rinder-Chondromodulin-Gen (Seki et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 175, 971–977 (1991); und europäische Patentveröffentlichung Nr. 473,080) gemäß dem Verfahren von T. Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 85–96 (1982) erhalten. So wurde eine große Menge Plasmid-DNA, enthaltend das Rinder-Chondromodulin-Gen gewonnen und aus E. coli-Transformanten gereinigt, die den pUC19-Vektor beherbergten, enthaltend an seiner EcoRI-Stelle eine ungefähr 1,4 kb-Gensequenz des Rinder-Chondromodulin-Gens, das das gesamte Protein kodierte.

[0065] Die Plasmid-DNA (20 µg) wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI (ungefähr 200 U) und PstI (ungefähr 200 U) 2 Stunden bei 37°C verdaut und einer Elektrophorese auf Agarosegel unterworfen, um Vektor-DNA und das Rinder-Chondromodulin-Gen auf konventionelle Weise abzutrennen. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid auf konventionelle Weise gefärbt und das Gel, das das DNA-Fragment enthielt, das zu dem Rinder-Chondromodulin-Gen korrespondierte, wurde unter UV-Licht ausgeschnitten. Das Gel, das das Rinder-Chondromodulin-Gen enthielt, wurde gemäß dem Verfahren von Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 164–170 (1982) behandelt, um ein DNA-Fragment (ungefähr 2 µg) für die Sonde zu gewinnen und zu reinigen. Das DNA-Fragment (100 ng) wurde mit ^{32}-P unter Verwendung des RTC DNA Labeling Kit (Pharmacia, Inc.) gemäß den beigefügten Anweisungen des Herstellers markiert.

BEISPIEL 2

SCREENING EINES GENOMISCHEN DNA-KLONS, KODIEREND EINEN TEIL VON MENSCHLICHEM CHONDROMODULIN-I

[0066] Ein Screening einer menschlichen Genom-Bibliothek (Clonetech, Inc.) wurde gemäß den den beigefügten Instruktionen angehefteten Manual durchgeführt. Ungefähr 10^6 Klone (ungefähr 2×10^5 Klone/Platte) des Phagen wurden in den E. coli-Stamm P2-392 transfiziert und in Petrischalen (24,5 × 24,5 cm), die jeweils NZY-Weichagar überschichtet über 1,5% NZY-Agarplatte enthielten, über Nacht bei 37°C gezüchtet. Das NZY-Medium wurde durch Zugabe von 0,25% Magnesiumsulfat zu einer Lösung (pH 7,5) von 1% NZY-Amin, 0,5% Hefeextrakt und 0,5% Natriumchlorid hergestellt. Die 1,5% NZY-Agarplatte wurde durch Autoklavieren von NZY-Medium, enthaltend 1,5% Agarpulver, hergestellt. Der NZY-Weichagar wurde durch Autoklavieren von NZY-Medium, enthaltend 0,7% Agarpulver, hergestellt. Die Plaque-Hybridisierung wurde durch Übertragung von λ-Phagenklonen in NZY-Weichagar auf Nitrozellulosefilter (BA85, S & S Inc.), indem ein Filter auf jede Platte gegeben und vorsichtig entfernt wurde, durchgeführt.

[0067] So wurden zwei Nitrozellulosemembranen auf Weichagar in jeder Platte gegeben und zum Transfer von Phagen entfernt. Die beiden Membranen wurden gleich markiert, um die relativen Positionen auf der Platte darzustellen. Jede Membran wurde 2 Minuten auf ein vorher mit 0,2 M Natriumhydroxid/1,5 M Natriumchlorid eingeweichtes Filterpapier platziert. Nach Entfernung der Flüssigkeit mit trockenem Filterpapier wurde die Membran auf ein Filterpapier platziert, das vorher mit 2 × SSCP/0,2 M Tris-HCl, pH 7,4 eingeweicht worden war und auf einem trockenen Filterpapier an der Luft getrocknet. Dieselben Prozeduren wurden wiederholt. 2 × SSCP: SSCP der doppelten Konzentration, dieselbe Expression wird hiernach verwendet; 10 × SSCP = 1,2 M Natriumchlorid, 150 mM Natriumcitrat, 130 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,2.

[0068] Die behandelten Nitrozellulosemembranen wurden für 2 Stunden auf 80°C erwärmt, um die Nukleinsäure zu fixieren und zweimal mit 3 × SSC gewaschen (20 × SSC, d.h., SSC-Lösung des 20-fachen der Konzentration besteht aus 3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat)/0,1% SDS für 15 Minuten bei 60°C. Jede Membran wurde in Hybridisierungspuffer [3 × SSC, 0,1% SDS, 10 × Denhardt's-Reagenz (50 × Denhardt = 1% Rinderserum-Albumin, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% Ficol 400), 20 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA und 10% Dextransulfat] (5 ml) eingetaucht und 3 Stunden bei 65°C inkubiert.

[0069] Die Hybridisierung wurde durchgeführt, indem die Membranen in einem Hybridisierungspuffer, enthaltend ein ^{32}P-markiertes DNA-Fragment, vorher in Beispiel 1 hergestellt, in einer Konzentration von 5 ng/ml (umgewandelt in eine Matrizen-DNA-Basis) 18 Stunden bei 55°C inkubiert wurden. Die Membranen wurden entfernt und in 3 × SSC/0,1 SDS bei Raumtemperatur 30 Minuten gewaschen, was zweimal wiederholt wurde. Die Membranen wurden in 0,2 × SSC/0,1 SDS 15 Minuten bei 55°C gewaschen, was zweimal wiederholt wurde, getrocknet und durch Autoradiografie nachgewiesen. Bei der Autoradiografie wurde ein positiver Plaque erhalten, der ein positives Signal an den korrespondierenden Positionen von beiden gepaarten Membranen ergab. Klone, die zu dem positiven Signal korrespondierten, wurden durch Ausstanzen des Plaques auf Weichagar mit einem Glasröhrchen gewonnen und mit TMG-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM Natriumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 0,01 Gelatine) (1 ml) in Gegenwart von Chloroform (50 µl) über Nacht extrahiert. Die extrahierten Phagenteilchen wurden einer Plaque-Hybridisierung auf ähnliche Weise wie der oben beschriebenen durch Transfektion in einen E. coli-Stamm P2-392 auf konventionelle Weise unterworfen und in 9 cm Petrischalen in geeigneter Menge kultiviert. Diese Reihe von Prozeduren wurde wiederholt, um den Klon zu reinigen, der zu dem positiven Signal korrespondierte, was zu einem unabhängigen λ411-Klon führte.

BEISPIEL 3

SUBKLONIEREN EINES DNA-FRAGMENTS, ENTHALTEND EINEN KODIERENDEN BEREICH VON PHAGEN-DNA UND SEQUENZANALYSE DAVON

[0070] DNA-Fragmente wurden aus den λ114-Phagenklonen, die in Beispiel 2 erhalten wurden, extrahiert und in die Plasmide pUC18 und pUC19 subkloniert. Eine Suspension von Phagenklonen (2×10^7 p.f.u., Plaque-Bildungseinheit) in TMG-Puffer (200 µl) wurden in den E. coli-Stamm P2-392 (2×10^8, 40 µl) in NZY-Medium (200 ml) in einem 500 ml-Erlenmeyer-Kolben bei 37°C für 15 Minuten infiziert. Nach Zugabe von 1 M Calciumchlorid (1 ml) wurde der Kolben über Nacht inkubiert, d.h., ungefähr 14 Stunden. Dem Kolben wird Chloroform (2 ml) zugefügt und dies ließ man 10 Minuten stehen. Nachdem Natriumchlorid (15,8 g) gelöst wurde, wurde die Mischung bei 6.000 UPM 20 Minuten bei 4°C mit einer Hitachi Cooling Centrifuge SCR20BB (Rotor RPR9-2) zentrifugiert. In dem Überstand wurde Polyethylenglycol 6000 (20 g) gelöst und man ließ die Lösung 1 Stunde auf einem Eisbad stehen.

[0071] Die Mischung wurde bei 6.000 UPM 20 Minuten mit der Hitachi Cooling Centrifuge SCR20BB (Rotor RPR9-2) zentrifugiert und die Präzipitate in A-Puffer (0,5% NP40, 36 mM Calciumchlorid, 30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM Magnesiumchlorid, 125 mM Kaliumchlorid, 0,5 mM EDTA, 0,25% DOC, 0,6 mM Mercaptoethanol) (6 ml) suspendiert. Von E. coli abstammende Nukleinsäuren wurden durch Inkubation der Suspension in Gegenwart von 10 mg/ml Deoxyribonuklease I (100 µl) und 10 mg/ml Ribonuklease A (10 µl) bei 30°C für 30 Minuten zersetzt. Der Reaktionsmischung wurde eine gleiche Menge Chloroform zugegeben und die Mischung wurde vollständig gerührt und mit einer Tomy Centrifuge LC-06 (Rotor-TS-7) bei 3.000 UPM 10 Minuten zentrifugiert, um den Überstand abzutrennen.

[0072] In einem Zentrifugenröhrchen für die Hitachi Ultracentrifuge Rotor RPS40T (Hitachi, Japan) wurde eine 40%ige Glycerinlösung (0,5% N240, 30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 125 mM Kaliumchlorid, 0,5 mM EDTA, 0,6 mM Mercaptoethanol, 40% Glycerin) (1 ml) platziert, die mit 10%iger Glycerinlösung (0,5% NP40, 30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 125 mM Kaliumchlorid, 0,5 mM EDTA, 0,6 mM Mercaptoethanol, 10% Glycerin) (3 ml) überschichtet wurde. Die oben hergestellte Nukleasebehandelte Phagensuspension wurde über diese Glycerinlösungen geschichtet und mit einer Hitachi Ultracentrifuge 70P72 (Rotor RPS40T; Hitachi, Japan) bei 35.000 UPM 1 Stunde zentrifugiert. Ausgefällte Phagenteilchen wurden in einer Mischung (0,4 ml) von 40 mM Tris-HCl, pH, 7,5, 10 mM EDTA und 2% SDS suspendiert und die Suspension 1 Stunde bei 55°C in Gegenwart von 10 mg/ml Proteinase K (4 µl) inkubiert. Die Lösung wurde in Eppendorf-Röhrchen übertragen und mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde einer Ethanolpräzipitation unterworfen, um die gewünschte Phagen-DNA (200 µg) zu erhalten.

[0073] Die resultierenden Phagen-DNAs (10 µg) wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI (jeweils 20 Einheiten; Takara Syuzo, Japan) in einem Restriktionspuffer, wie im Manual, bei 37°C für 3 Stunden

verdaut und die Verdaumischung wurde auf einem Agarosegel auf konventionelle Weise elektrophoretisch aufgetrennt. Eine Southern-Hybridisierung, die unter Verwendung einer DNA-Sonde, gemäß dem Verfahren wie beschrieben in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 382–389 (1982) durchgeführt wurde, die in Beispiel 1 hergestellt wurde, ergab die Gegenwart eines DNA-Fragments bei einer ungefähr 5,6 kb-Bande, an die die Sonde am stärksten hybridisierte.

[0074] Das beabsichtigte DNA-Fragment wurde abgetrennt und durch Verdau von Phagen-DNAs (100 µg) mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI gereinigt und durch Gewinnen des DNA-Fragments aus dem Agarosegel auf konventionelle Weise. Die DNA-Fragmente (100 ng) wurden in die pUC18- und pUC19-Plasmidvektoren (200 ng) ligiert, die vorher mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI verdaut worden waren, und zwar auf konventionelle Weise in Gegenwart von T4-DNA-Ligase (350 Einheiten) in einem Reaktionspuffer (66 mM Tris-HCl (pH 7,6), 6,6 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Dithiothreitol, 66 µM ATP, Substrat-DNA) (10 µl). Die Ligationsmischung (1 µl) wurde verwendet, um kompetente E. coli DH5α (COMPETENT HIGH, Toyobo, Japan) zu transformieren und die resultierende bakterielle Lösung wurde auf einem LB-Agarmedium (1% Hefeextrakt, 0,5% Bacto-Trypton, 0,5% Natriumchiorid), enthaltend Ampicillin (50 µg/ml) in 15 cm-Petrischalen verteilt. Ampicillin-resistente Kolonien traten in den Schalen (jeweils 5 ml) auf und wurden gezüchtet. Plasmid-DNAs wurden gemäß dem Verfahren von Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, Laboratory, S. 365–370 (1982) gewonnen, mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI verdaut und durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Analyse ergab, dass eine Rekombinante, bezeichnet als p411BS, enthaltend das beabsichtigte 5,6 kb-DNA-Fragment, erhalten wurde.

[0075] Plasmid-DNA, die von einem der positiven Klone auf konventionelle Weise (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 86–96 (1982)) hergestellt wurde und für das Sequenzieren notwendige DNA-Regionen wurden mit einem Restriktionsenzym (-enzymen) in Fragmente verdaut, die in den Plasmidvektor pUC19 subkloniert wurden. Aus den resultierenden Subklonen wurden Plasmid-DNAs auf konventionelle Weise hergestellt und einer Sequenzanalyse unterworfen. Sowohl (+)- als auch (–)-Stränge des DNA-Fragments wurden unter Verwendung von zwei synthetischen Primern, wie unten dargestellt, und in SEQ ID Nr. 9 bzw. 10, als Sequenzprimer, bestimmt.
SEQ ID Nr. 9: 5'-d(GTAAAACGACGGCCAGT) 3'
SEQ ID Nr. 10: 5'-d(CAGGAAACAGCTATGAC) 3'

[0076] Das Ergebnis ist in SEQ ID Nr. 1 dargestellt. Die Analyse ergab, dass das von dem unabhängigen λ411-Klon abstammende Plasmid p411BS eine 5'-stromaufwärts-Sequenz enthält, d.h., einen Teil des kodierenden Bereichs (Exon), korrespondierend zum N-terminalen Bereich (Aminosäure Nr. 1 bis 72) von hChM-I, wie auch (eine) Intron-Sequenz(en).

BEISPIEL 4

PRÄPARATION VON cDNA

[0077] Die Synthese der cDNA wurde unter Verwendung eines Primers durchgeführt, der hergestellt wurde, indem eine Mischung von 1,2 µg/µl synthetischer DNA (z.B. eine DNA gemäß SEQ ID Nr. 11), enthaltend NotI und am 5'-Ende XhoI-Restriktionsstellen und 40 Ts am 3'-Ende der NotI-Restriktionsstelle von einem Strang, dargestellt durch die folgende Sequenz:
5'-d(CTCGAGGCCATGGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTT) 3'
und 0,4 µg/µl einer komplementären DNA (z.B. eine DNA gemäß SEQ ID Nr. 12), der ein Kluster von T fehlte, der folgenden Sequenz:
5'-d(GCGGCCGCCATGGCCTCGAG) 3'
bei 95°C für 5 Minuten erwärmt wurde und Inkubation bei 36°C für 1 Stunde für das Annealing.

[0078] Die RNA wurde wie folgt hergestellt. Menschliches Chondrosarcom-Gewebe (10 g) wird in flüssigem Stickstoff pulverisiert, in einer wässrigen Guanidiniumisothiocyanatlösung homogenisiert und einer Cäsiumchlorid-Gleichgewichtsdichtegradienten-Zentrifugation gemäß dem Verfahren von Chirgwin et al., Biochemistry, 18, 5294–5299 (1979) unterworfen, um Gesamt-RNA (ungefähr 1 mg) zu erhalten. Die Gesamt-RNA wird dann unter Verwendung von Oligo(dT)Zellulosetyp 7 (Pharmacia) gemäß einem konventionellen Verfahren (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 85 (1982)) zum Erhalt von polyA$^+$ RNA gereinigt.

[0079] Die polyA$^+$ RNA (ungefähr 1 µg) wurde mit dem Primer (80 pmol) umgesetzt, vorher durch Annealing hergestellt, in einem Reaktionspuffer [50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM Kaliumchlorid, 8 mM Magnesiumchlo-

rid, 1 mM 4dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 10 mM DTT (Dithiothreitol) und 40 µCi α-^{32}P-dCTP] (50 µl), in Gegenwart von AMV-reverser Transkriptase (100 Einheiten) bei 37°C, um die Erststrang-cDNA zu erhalten, hybridisiert mit Matrizen-RNA.

BEISPIEL 5

PCR UND ANALYSE DES DNA-FRAGMENTS, DAS DADURCH AMPLIFIZIERT WURDE

[0080] Die PCR wurde mit dem Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler unter Verwendung des Gene Amp DNA Amplification Reagent Kits (Takara Syuzo, Japan) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Als Matrizen-DNA wurde eine Reaktionsmischung (1 µl) der cDNA-Synthese, wie beschrieben in Beispiel 4, verwendet. Zu der Matrizenlösung wird × 10-Reaktionspuffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 15 mM $MgCl_2$, 0,1 (G/V) Gelatine) (10 µl), 1,25 mM 4dNTPs (16 µl), 20 µM Primer #1 und #2 (jeweils 5 µl), Taq-DNA-Polymerase (0,5 µl) zum Erhalt eines Rektionssystems (100 µl) zugefügt. Die PCR wurde durch 35-faches wiederholen eines Reaktionszykluses durchgeführt, umfassend die folgenden Schritte: Vorbehandlung für 10 Minuten bei 94°C, Denaturierung für 1 Minute bei 94°C, Annealing für 1,5 Minuten bei 44°C und Elongation für 2 Minuten bei 72°C. Die Rektion wurde durch Inkubation für 7 Minuten bei 72°C beendet.

[0081] Die Primer #1 und #2 sind DNA-Primer mit 19 und 16 Nukleotiden, die jeweils in den SEQ ID Nrn. 13 bzw. 14 dargestellt sind, mit den folgenden Sequenzen:
Primer #1: 5'-d(AGTCTCCAAGTGCCTCACT) 3'
Primer #2: 5'-d(CGAGGCCATGGCGGCC) 3'

[0082] Der Primer #1 ist die stromaufwärts gelegene Sequenz eines Gens, entworfen auf der Basis des menschlichen Gens, erhalten in Beispiel 3, während der Primer #2 ein DNA-Fragment ist, das zu einem Teil der in SEQ ID Nr. 12 dargestellten Sequenz komplementär ist, verwendet als Primer bei der Synthese von cDNA.

[0083] Die zweite PCR wurde unter Verwendung eines Teils (2 µl) der oben erhaltenen Reaktionslösung als Substrat und dem Primer #3 und #4 durchgeführt, die DNA-Primer mit 18 Nukleotiden sind, dargestellt in SEQ ID Nr. 15 bzw. 16 und die folgende Sequenz aufweisen:
Primer #3: 5'-d(CATGACAGAGAACTCCGA) 3'
Primer #4: 5'-d(ACACCATGCCCAGGATGC) 3'.

[0084] Der Primer #3 ist eine Sequenz, korrespondierend zu dem Anfangsteil der Region, kodierend hChM-I, entworfen auf der Basis des menschlichen Gens, das in Beispiel 3 erhalten wurde, während der Primer #4 eine Sequenz ist, korrespondierend zum Endteil einer Sequenz, kodierend bovines Chondromodulin-I-Protein. Die zweite PCR wurde auf ähnliche Weise wie in der ersten PCR durchgeführt, d.h., unter Verwendung desselben Reaktionspuffers, dNTPs, Enzymbehandlung, in einer Reaktionsmischung, die mit destilliertem Wasser auf 100 µl eingestellt wurde, durch 35-faches Wiederholen eines Reaktionszyklusses, umfassend die folgenden Schritte: Vorbehandlung für 10 Minuten bei 94°C, Denaturierung für 1 Minute bei 94°C, Annealing für 1,5 Minuten bei 55°C und Elongation für 2 Minuten bei 72°C. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 7 Minuten bei 72°C beendet.

[0085] Die Reaktionsmischung (10 µl von 100 µl) wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert und ein Gel, korrespondierend zu ungefähr einer 1 kb-Bande wurde ausgeschnitten, um ein DNA-Fragment auf konventionelle Weise zu gewinnen. DNA, gewonnen aus dem Gel, wurde mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, mit Ethanol ausgefällt und in sterilisiertem deionisiertem Wasser (20 µl) gelöst. Die DNA wird in eine Klonierungsstelle eines kommerziell erhältlichen pCR2-Vektors (Invitrogen, Inc.), durch Umsetzung der DNA-Lösung (5 µl), wie oben erhalten, mit dem pCR2-Vektor (0,25 µg) in Gegenwart von T4-DNA-Ligase (300 Einheiten) in einem Reaktionspuffer (66 mM Tris-HCl (pH 7,6), 6,6 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Dithiothreitol, 66 µM ATP, Substrat-DNA) für 12 Stunden bei 16°C ligiert.

[0086] Die Ligationsmischung (3 µl) wurde verwendet, um kompetente E. coli JM109 (COMPETENT HIGH, Toyobo, Japan) zu transformieren und die resultierende bakterielle Lösung wurde auf ein X-Gal-IPTG-LB-Agarmedium (1% Hefeextrakt, 0,5% Bacto-Trypton, 0,5% Natriumchlorid, 0,004% X-Gal, 1 mM IPTG), enthaltend Ampicillin (50 µg/ml) in 15 cm Petrischalen verteilt. Zwölf Kolonien, die Ampicillin-resistent sind und keine Farbentwicklung aufgrund von X-Gal zeigten, wurden aus Kolonien auf der Petrischale selektiert und jede (5 ml) wurde gezüchtet. Die Plasmid-DNA wurde dann gemäß dem Verfahren von Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 365–379 (1982) gewonnen, mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und

durch eine Elektrophorese auf Agarosegel analysiert. Die Analyse ergab, dass drei Transformanten erhalten wurden, die jeweils die Plasmid-DNA phCHM-13-6, phCHM-16-3 oder phCHM16-5 enthielten, wobei das Plasmid ein DNA-Fragment unterschiedlicher Größe nach EcoRI-Verdau ergibt.

[0087] Plasmid-DNAs wurden von jedem der gereinigten positiven Klone phCHM-13-6, phCHM-16-3 und phCHM16-5, auf konventionelle Weise (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 86–96 (1982)) hergestellt und mit dem Fluorescence Sequencer GENESIS 2.000 System sequenziert. Sowohl der (+)- als auch der (–)-Strang der DNA wurden unter Verwendung unterschiedlicher synthetischer Primer als Sequenzprimer, dargestellt in SEQ ID Nr. 9 bzw. 10 bestimmt.
SEQ ID Nr. 9: 5'-d(GTAAAACGACGGCCAGT) 3'
SEQ ID Nr. 10: 5'-d(CAGGAAACAGCTATGAC) 3'

[0088] Auf der Basis der oben erhaltenen Sequenz wurden synthetische DNAs, die zu etlichen Teilsequenzen komplementär waren, hergestellt und einer Sequenzierung auf ähnliche Weise unterworfen, um die Rasensequenzen zu erhalten, die in den SEQ ID Nrn. 2, 3 und 4 dargestellt sind, zusammen mit den davon deduzierten korrespondierenden Aminosäuresequenzen.

BEISPIEL 6

KLONIERUNG DER 3'-STROMABWÄRTS GELEGENEN SEQUENZ DES GENS, DAS MENSCHLICHES CHONDROMODULIN KODIERT

[0089] Die Sequenz des 3'-stromabwärts kodierenden Bereiches der Klone phCHM-13-6, phCHM-16-3 und phCHM16-5, erhalten in Beispiel 5 oben, korrespondierten zu dem DNA-Primer (5'd(ACACCATGCCCAGGATGC) 3'; SEQ ID Nr. 16), der eine 18-Nukleotid-Synthese-DNA ist, basierend auf dem Rinder-Chondromodulin-Gen und in der zweiten PCR verwendet wurde. Um die Region zu erhalten, die zu dem DNA-Primer von SEQ ID Nr. 16 korrespondierte und auch eine Region stromabwärts davon, die eine menschliche Basensequenz aufwies, wurde ein Klonierung wiederum durch PCR durchgeführt.

[0090] Die RNA wurde wie folgt hergestellt. Normales menschliches Costochondral-Gewebe (ungefähr 20 g) wurde in flüssigem Stickstoff pulverisiert, in wässriger Guanidiniumisothiocyanatlösung homogenisiert und einer Cäsiumchlorid-Gleichgewichtsdichtegradienten-Zentrifugation gemäß dem Verfahren von Chirgwin et al., Biochemistry, 18, 5294–5299 (1978) zum Erhalt von Gesamt-RNA (ungefähr 2 mg) unterworfen.

[0091] Die Gesamt-RNA (20 µg) wurde dann mit einem Primer (80 pmol) umgesetzt, der vorher auf ähnliche Weise wie der in Beispiel 4 verwendeten, in Reaktionspuffer [50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM Kaliumchlorid, 8 mM Magnesiumchlorid, 1 mM 4dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 10 mM Dithiothreitol und 40 µCi α-^{32}P-dCTP] (50 µl) einem Annealing unterworfen wurde, in Gegenwart von AMV-reverser Transkriptase (100 Einheiten) bei 37°C, um die Erststrang-cDNA zu erhalten, hybridisiert mit Matrizen-RNA. Ein Teil der resultierenden Reaktionslösung wurde als Matrize in der PCR verwendet.

[0092] Die PCR wurde mit einem Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler unter Verwendung des Gene Amp DNA Amplification Reagent Kit (Takara Shuzo, Japan) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt, wobei als Matrize ein Teil (1 µl) der Reaktionslösung verwendet wurde, erhalten bei der cDNA-Synthese unter Verwendung von Gesamt-RNA, wie oben beschrieben. Zu der Lösung wurde × 10 Reaktionspuffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 15 mM $MgCl_2$, 0,1% (G/V) Gelatine) (10 µl), 1,25 mM 4dNTPs (16 µl), 20 µM Primer #5 und #2 (jeweils 5 µl) und Taq-DNA-Polymerase (0,5 µl) zugefügt, um ein Reaktionssystem (100 µl) zu erhalten. Die PCR wurde durch 35-faches Wiederholen eines Reaktionszyklusses durchgeführt, umfassend die folgenden Schritte: Vorbehandlung für 10 Minuten bei 94°C, Denaturieren für 1 Minute bei 94°C, Annealing für 1,5 Minuten bei 55°C und Elongation für 2 Minuten bei 72°C. Schließlich wurde die Reaktion durch Inkubation für 7 Minuten bei 72°C beendet.

[0093] Die Primer #5 und #2 sind DNA-Primer mit 16 Nukleotiden, die jeweils in SEQ ID Nr. 17 bzw. 14 dargestellt sind, mit der folgenden Sequenz:
SEQ ID Nr. 17: 5'-d(CCCTAGACTGGATCAC) 3'
SEQ ID Nr. 14: 5'-d(CGAGGCCATGGCGGCC) 3'

[0094] Der Primer #5 ist die Sequenz des kodierenden Bereichs eines Gens, das auf der Basis des menschlichen Gens entworfen wurde, das in Beispiel 5 erhalten wurde, während der Primer #2 ein DNA-Fragment ist, das komplementär zu einem Teil der Sequenz ist, die in SEQ ID Nr. 12 dargestellt ist, die als Primer bei der

Synthese der cDNA verwendet wurde.

[0095] Die Reaktionsmischung (10 µl von 100 µl) wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert und ein Gel, korrespondierend zu ungefähr einer 0,6 kb-Bande wurde auf konventionelle Weise ausgeschnitten, um ein DNA-Fragment zu gewinnen. Das DNA-Fragment wurde mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, mit Ethanol ausgefällt und in sterilisiertem deionisiertem Wasser (20 µl) gelöst. Die DNA wurde in eine Klonierungsstelle des kommerziell erhältlichen pCR2-Vektors (Invitrogen), durch Umsetzen der DNA-Lösung (5 µl), wie oben erhalten, mit dem pCR2-Vektor (0,25 µg) (Invitrogen, INC.) in Gegenwart von T4-DNA-Ligase (350 Einheiten) in einem Reaktionspuffer (66 mM Tris-HCl (pH 7,6), 6,6 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Dithiothreitol, 66 µM ATP, Substrat-DNA) für 12 Stunden bei 16°C ligiert.

[0096] Die Ligationsmischung (3 µl) wurde verwendet, um kompetente E. coli JM109 (COMPETENT HIGH, Toyobo, Japan) zu transformieren und die resultierende bakterielle Lösung wurde auf X-Gal-IPTG-LB-Agarmedium (1% Hefeextrakt, 0,5% Bacto-Trypton, 0,5% Natriumchlorid, 0,004% X-Gal, 1 mM IPTG), enthaltend Ampicillin (50 µg/ml) in 15 cm Petrischalen verteilt. Zwölf Kolonien, die Ampicillin-resistent waren und keine Farbentwicklung aufgrund von X-Gal zeigten, wurden aus Kolonien selektiert, die auf der Petrischale auftraten und jede (5 ml) wurde gezüchtet. Die Plasmid-DNA wurde dann gemäß dem Verfahren von Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 365–370 (1982) gewonnen, mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und durch eine Elektrophorese auf einem Agarosegel analysiert. Die Analyse ergab, dass zwei Transformanten, phCHM-ILAST8 und phCHM-ILASTI2, erhalten wurden, die ungefähr 0,6 kb-DNA-Fragmente ergaben, außer den Vektor-DNA-Fragmenten, bei Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI. 16-3 oder phCHM16-5, was ein DNA-Fragment von unterschiedlicher Größe bei EcoRI-Verdau ergab.

[0097] Plasmid-DNAs wurden aus beiden gereinigten Klonen, phCHM-ILAST8 und phCHM-ILASTI2, auf konventionelle Weise hergestellt (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 86–96 (1982)) und mit dem Fluorescence Sequencer GENESIS 2.000 System (Dupont) sequenziert. Sowohl der (+)- als auch der (–)-Strang der DNA wurden unter Verwendung von zwei unterschiedlichen synthetischen Primern als Sequenzprimer bestimmt, die in SEQ ID Nr. 9 bzw. 10 dargestellt sind.
SEQ ID Nr. 9: 5'-d(GTAAAACGACGGCCAGT) 3'
SEQ ID Nr. 10: 5'-d(CAGGAAACAGCTATGAC) 3'

[0098] Auf der Basis der oben erhaltenen Sequenz wurden synthetische DNAs hergestellt, die komplementär zu etlichen Teilsequenzen sind und wurden einer Sequenzanalyse auf ähnliche Weise unterworfen, die zeigte, das sich die Sequenzen von phCHM-ILAST8 und phCHM-ILASTI2 in Übereinstimmung befanden. Im Ergebnis wurde die 3'-Stromabwärts-Sequenz, umfassend eine Rasensequenz von SEQ ID Nr. 8, erhalten.

BEISPIEL 7

KONSTRUKTION EINES EXPRESSIONSPLASMIDS, KODIEREND MENSCHLICHES CHONDROMODULIN-I-PROTEIN

[0099] Der Vergleich der Rasensequenzen der Klone phCHM-ILAST8 und phCHM-ILASTI2, wie erhalten in Beispiel 6, und derjenigen von phCHM-13-6, phCHM-16-3 und phCHM16-5, erhalten in Beispiel 5, ergab, dass die beiden ersteren sich von den letzteren in 2 Basen unterschieden, in einer Sequenz, korrespondierend zu dem 3'-Stromabwärts-Kodierungsbreich, d.h., der Sequenz, korrespondierend zum DNA-Primer (5'-d(ACACCATGCCCAGGATGC) 3') (18 Nukleotide, dargestellt in SEQ ID Nr. 16), der in der zweiten PCR verwendet wurde. Die beiden ersten Klone hatten jedoch keine Variation in den Aminosäuresequenzen im Vergleich zu den letzteren. Dies bedeutet, dass die Klone phCHM-13-6, phCHM-16-3 und phCHM16-5, die in Beispiel 5 erhalten wurden, wenn sie in Wirtszellen transformiert werden es den resultierenden Transformanten erlauben können, perfektes hChM-I im Hinblick auf die Aminosäuresequenz zu exprimieren, obwohl sie durch eine Rasensequenz kodiert werden, die teilweise diejenige des bovinen Chondromodulingens umfast.

[0100] Plasmid-DNA wurde von den cDNA-Klonen phCHM-13-6, phCHM-16-3 oder phCHM16-5, die in Beispiel 5 hergestellt wurden, gemäß dem Verfahren von Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 86–96 (1982) erhalten. Jede der Plasmid-DNAs phCHM-13-6, phCHM-16-3 und phCHM16-5 wurde mit den Restriktionsenzymen NotI und NsiI verdaut, um ein ungefähr 1 kb-DNA-Fragment zu erhalten, enthaltend einen Teil der Vektorsequenz von den jeweiligen Klonen. Diese DNA-Fragmente deckten den gesamten Bereich ab, der hChM-I kodierte, d.h., die Region, die sich von dem Translations-Initiationskodon ATG bis zum Stopkodon TAA erstreckte. Jedes der DNA-Fragmente, gewonnen von den cDNA-Klonen, phCHM-13-6, phCHM-16-3 und phCHM16-5, wurde in den kommerziell erhältlichen Expressionsvektor pcD-

NAlneo (Invitrogen, Inc.), der vorher mit den Restriktionsenzymen NotI und NsiI verdaut wurde, in einem Reaktionssystem (10 µl), enthaltend T4-DNA-Ligase auf konventionelle Weise ligiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet, um kompetente E. coli DH5α (COMPETENT HIGH; Toyobo, Japan) zu transformieren und die resultierende bakterielle Lösung wurde auf LB-Agarmedium (1 Hefeextrakt, 0,5 Bacto-Trypton, 0,5 Natriumchlorid), enthaltend Ampicillin (50 µg/ml) in 15 cm Petrischalen verteilt. Amipicillin-resistente Kolonien (jeweils 5 ml) wurden gezüchtet. Plasmid-DNAs wurden gemäß dem Verfahren von Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 365–370 (1982) gewonnen, mit den Restriktionsenzymen NotI und NsiI verdaut und auf einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Analyse ergab, dass die gewünschten Rekombinanten, transformiert mit den Plasmid-DNAs pcDNAhCHM-13-6, pcDNAhCHM-16-3 und pcDNAhCHM16-5, jeweils enthalten an den Restriktionsstellen NotI und NsiI des Expressionsvektors pcDNAIneo, jeweils das beabsichtigte hChM-I-cDNA-Fragment erhalten wurde.

[0101] Aus rekombinanten E. coli-Zellen wurden Plasmid-DNAs gemäß dem Verfahren von Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 86–96 (1982) gewonnen und gereinigt, um eine große Menge hChM-I-Expressionsplasmid-DNAs zu erhalten.

BEISPIEL 8

EXPRESSION VON hChM-I IN TIERISCHEN ZELLEN

[0102] COS-Zellen wurden mit entweder dem Expressionsplasmid pcDNAhCHM-13-6, pcDNAhChM-16-3 oder pcDNAhChM16-5, konstruiert in Beispiel 6 durch Verwendung des kommerziell erhältlichen Lipofectinreagenzes (LIPOFECTIN™, GIBCO, Inc.) gemäß den Anweisungen des Herstellerst transfiziert.

[0103] So wurden COS-Zellen in DMEM-Medium in einer 9 cm Petrischale gezüchtet. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS(–)-Lösung (0,8% Natriumchlorid, 0,02% Kaliumchlorid, 0,144% Dinatriumhydrogenphosphat, 0,024% Natriumdihydrogenphosphat, pH 7,4) gewaschen. Nach Entfernung der PBS(–)-Lösung wurde serumfreies DMEM-Medium (8 ml) der Platte zugefügt. Eine DNA-Lösung, die bei der Transfektion zu verwenden war, wurde durch Lösen von Plasmid pcDNAhCHM-13-6, pcDNAhChM-16-3 oder pcDNAhChM16-5 DNA (20 µg) in serumfreiem DMEM-Medium (100 µl) in einem Nr. 55,426,013 Röhrchen (Amersham, Inc.) hergestellt. Zu der DNA-Lösung wird eine Mischung aus Lipfectinreagenz (LIPOFECTIN™, GIBCO, Inc.) (50 µl) und serumfreies DMEM-Medium (50 µl) zugefügt und dies lässt man 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Die Lipofectin-DNA-Suspension (200 µl) wurde den mit PBS(–) gewaschenen COS-Zellen zugefügt, wie oben hergestellt, und die Zellen wurden über Nacht bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 gezüchtet. Nach Entfernung des Lipofectin-haltigen Mediums wurde 10% FCF-haltiges ER-DE-Medium (Kyokuto-seiyaku, Inc.) zu einer 10 cm Petrischale zugefügt und die Inkubation bei 37°C für ungefähr 56 Stunden unter einer 5%igen CO_2-Atmosphäre fortgesetzt. Die Kulturbrühe wurde gesammelt und die Gegenwart einer physiologischen Aktivität von hChM-I gemäß einem bekannten Verfahren (Suzuki, et al., Methods in Enzymology, 146: 313–320 (1987)) bestätigt. Die Expression von hChM-I wurde durch einen Western-Blot auf konventionelle Weise bestätigt.

BEISPIEL 9

BEWERTUNG DER AKTIVITÄT DES MENSCHLICHEN CHONDROMODULINPROTEINS

[0104] Die Isolation und Kultivierung der in den Experimenten verwendeten Zellen und die Bewertung ihrer Aktivitäten wurden im wesentlichen gemäß dem beschriebenen Verfahren (Suzuki, et al., Methods in Enzymology, 146: 313–320, 1987) durchgeführt. Die Zellen wurden aus wachsendem Costal-Knorpel isoliert, ausgeschnitten aus einem jungen Neuseeland-Stamm-Kaninchen (400 bis 600 g) und in einer 1:1-Mischung (hiernach bezeichnet als FAD-Medium) von Ham's F-12-Medium und Dulbecco's modifiziertem Medium, enthaltend 10% fötales Rinderserum (FCS) mit einer zelldichte von 10^5 Zellen/ml suspendiert. Die Zellsuspension (0,1 ml) wurde auf eine Platte mit 96 Vertiefungen dispergiert, die mit Typ-I-Kollagen (50 µg/ml) über Nacht beschichtet worden war und mit FAD-Medium gewaschen wurde, und wurde in einer Atmosphäre von 5% CO_2 unter Veränderung des Mediums an jedem zweiten Tag bei 37°C inkubiert.

[0105] Die DNA-Syntheseaktivität wurde wie folgt bewertet. Die Zellen wurden in der obigen Platte mit 96 Vertiefungen gezüchtet, bis die Kultur konfluent wurde, dann wurden die Zellen in FAD-Medium, enthaltend 0,3% FCS 24 Stunden gezüchtet. Die Kultur wurde 22 Stunden in 0,1 ml FAD-Medium inkubiert, enthaltend 0,06 bis 20 ng Kulturbrühe von Transformanten, enthaltend hChM-I, 0,04 ng FGF (Fibroblasten-Wachstumsfaktor) und 0,3% FCS. Die Kultivierung wurde für weitere 4 Stunden nach Zugabe von 10 µl [^{3}H]Tymidin (130 µCi/ml) fort-

gesetzt und die Zellen wurden dreimal mit eiskalter Phosphat-gepuffertrer Salzlösung (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,15 M Natriumchlorid) gewaschen, mit 5% Trichloressigsäure extrahiert und dann mit Ethanol/Ether (3:1 im Volumen). Nach der Extraktion wurde das übrig bleibende Präzipitat in 0,3 M Natriumhydroxid gelöst, mit 1/20 Volumen 6 N HCl neutralisiert und die Radioaktivität durch einen Szintillationszähler nachgewiesen. Die Aufnahme an radioaktivem Thymidin, die beobachtet wurde, wenn hChM-I und FGF simultan verwendet wurden, war höher als diejenige, die beobachtet wurde, wenn FGF allein verwendet wurde, was demonstrierte, dass hChM-I eine potente stimulierende Wirkung auf das Wachstum von Chondrocyten ausübt.

[0106] Die inhibitorische Aktivität des Chondromodulinproteins gegenüber dem Wachstum von vaskulären Endothelzellen wurde unter Verwendung boviner Aorta-Endotheliocyten bewertet. So wurden bovine Aorta-Endotheliocyten in ein α-MEM-Medium, enthaltend 0,1 ml 20% FCS in eine Platte mit 96 Vertiefungen bei einer Zelldichte von 2×10^3 Zellen/Vertiefung inokuliert und in einem CO_2-Inkubator 48 Stunden bei 37°C gezüchtet, woraufhin das Medium durch ein frisch hergestelltes ersetzt wurde und 0 bis 3 µg/ml Kulturbrühe der Transformanten, enthaltend hChM-I zugefügt wurden. Nach 12-ständiger Inkubation bei 37°C wurde [^{3}H]Tymidin jeder Vertiefung (1 µCi/Vertiefung) zugefügt und man ließ die Platte 4 Stunden bei 37°C stehen. Nach Abschluss der Aufnahme des radioaktiv markierten Thymidins wurden Zellen unter Verwendung einer Zellerntevorrichtung geerntet und die Radioaktivität auf einer LKB-Platte nachgewiesen. Die Aufnahme von radioaktivem Thymidin wurde verhindert, wenn hChM-I zugefügt wurde, was anzeigte, dass hChM-I eine Aktivität besitzt, die das Wachstum von Endothelzellen verhindert.

[0107] Wie aus der obigen Beschreibung deutlich wird, ist das hChM-I der vorliegenden Erfindung ein neues Protein, das vom Menschen abstammt. Durch Verwendung des Gens, das hChM-I kodiert, kann man eine ausreichende Menge von rekombinantem hChM-I konstant und stetig zur Verfügung stellen. Das hChM-I hat Aktivitäten um das Wachstum von Chondrocyten zu stimulieren, die Differenzierungspotenz von Chondrocyten zu unterstützen und das Wachstum von Endothelzellen zu inhibieren und kann als Wirkstoff von medizinischen Arzneimitteln nützlich sein. Das hChM-I der vorliegenden Erfindung unterscheidet sich von konventionellem Rinder-Chondromodulinprotein in der Aminosäuresequenz, der Rasensequenz des Gens, das dieses kodiert, und ähnlichem und es wird als weniger antigen und effektiver bei der Behandlung des Menschen betrachtet.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDERIN: Mitsubishi Kasei Corporation

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: MENSCHLICHES CHONDROMODULIN-I-PROTEIN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT:

(B) STRASSE: 2-5; Marunouchi 2-chome, Chiyoda-ku

(C) STADT: Tokyo

(D) LAND: Japan

(E) PLZ: 100

(v) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) ART DES MEDIUMS: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(C) SOFTWARE: PatentIn Release #1,0, Version #1.25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1.000 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch (Homo Sapiens)

(vii) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: λ411

SUBKLON: p411BS

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Exon

(B) STELLUNG: 161 ... 232

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Exon

(B) STELLUNG: 691 ... 834

(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: E

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 1:

```
AGGTGAGGCG CTAGAAGGGG TGGGGACCGC TGGGCTGGCC CAGGCGGGAC CGTGCACCGT    60
GTGTGCGCGC GGCGTTGAAA TGCCCTGCAC GTCGGGGCAG CGGGACAGAT CCCAGGGTGC   120
CCAGGGAGTC TCCAAGTGCC TCACTCCTCC CGCCGCAAAC ATG ACA GAG AAC TCC     175
                                               Met Thr Glu Asn Ser
                                                 1               5
GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT GAC GTG GAA TTC TGC     223
Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp Asp Val Glu Phe Cys
                10                  15                  20
AGC CCC CCG GTGAGTAC CGCCAGGGAT TCCACACGCA GGGCCTGGGT TGTGTGAGTA    280
Ser Pro Pro
        24
TCAGGTTCCA CAGTTCGGAC TCAGGGGTGC GTGCCACCGA ATGGGTGTGT TGGCGGGGGA   340
ATAAATTTGG GTCCCAAATG TGTGGGTGGG ATGTCGCCCC ACGCGTATGA GTGTGCAGGG   400
GTCACGGCAT CCACAGGCGG GTGCGGAGGG ACGTCCCGTG GCCGGTAGAG GGTGCAGGTC   460
CTGGGGCGAA GGCCCTGTGC TGCGGGGTTT GCTCATCCCA CTTCCACGCC CGACTGCAAA   520
GGACCCTCGG GAGGGAGCGC GGCGAAAGGG GCACCCGTAG GAGCCCGGGC GAGCTGTTTC   580
CCGCCCGACT CCCCACTCCC TGGGGGCTAC CGCGTGGGGC CCGGGTGCGC TGGGGGCCGC   640
AGGTGCTGGC GGCACAAACG CGACGGTCCC TCTCCCGCCC CGGCCCGCAG GCG TAC      696
                                                        Ala Tyr
                                                          25
GCT ACG CTG ACG GTG AAG CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG     744
Ala Thr Leu Thr Val Lys Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val
```

```
             30                  35                  40
GGA GCC GTG GTC CTC ATT TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC     792
Gly Ala Val Val Leu Ile Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala
         45                  50                  55
ATC GGG GCC TTC TAC TTC TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT AGTCCA      840
Ile Gly Ala Phe Tyr Phe Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile
     60                  65                  70
GAGGGCGGCG CGCGGGGACC CCCGTGTCGC CCATGGTGCC CCTAGGGGGG GCCCGAGCGC   900
GGGCCGGCGA GGGGCGCGCG GCTGCCCGGC GGCCCCTCGG GCCCAGCGTG AGCTCCCCTC   960
TCCCATCCCA CTCTGGCACG CGGCTTTCCG CCTTAGGTCA                        1000
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1.006 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch (Homo Sapiens)

(vii) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON:phCHM-I3-6

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: P CDS

(B) STELLUNG: 2 ... 1003

(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: E

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 2:

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
    1               5                  10                  15
GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG     97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
             20                  25                  30
CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT   145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
         35                  40                  45
```

```
TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC   193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
     50                  55                  60
TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT   241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
 65                  70                  75                  80
ATC AAT GGG AAA CTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC   289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
                 85                  90                  95
AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110
GTT AAT GAT TTC CAG AAT GGC ATC ACA GGA ATT CGT TTT GCT GGA GGA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
        115                 120                 125
GAG AAG TGC TAC ATT AAA GCG CAA GTG AAG GCT CGT ATT CCT GAG GTG   433
Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
    130                 135                 140
GGC GCC GTG ACC AAA CAG AGC ATC TCC TCC AAA CTG GAA GGC AAG ATC   481
Gly Ala Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Lys Leu Glu Gly Lys Ile
145                 150                 155                 160
ATG CCA GTC AAA TAT GAA GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT   529
Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
                165                 170                 175
CAG CCT GTG AAG GAC AAC AGC TTC TTG AGT TCT AAG GTG TTA GAA CTC   577
Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu
            180                 185                 190
TGC GGT GAC CTT CCT ATT TTC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA   625
Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
        195                 200                 205
ATC CAG AGG GAA AGA AGA GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC   673
Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr
    210                 215                 220
ACA AAA AGA CCA CAC AGT GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA   721
Thr Lys Arg Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg
```

```
225                 230                 235                 240
CTG AAT AAT GAA ACC AGA CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC   769
Leu Asn Asn Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe
                245                 250                 255
AAT CCT GAT AAT CCT TAT CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC   817
Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
            260                 265                 270
GAC CCT AGA CTG GAT CAC GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG   865
 p Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
        275                 280                 285
AGC TAC ACC CAC TGC CAG AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC   913
Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
    290                 295                 300
CCA TGG CCT TAT AAT TAT CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC   961
Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile
305                 310                 315                 320
ATG CCA TGT AGC TGG TGG GTG GCC CGC ATC CTG GGC ATG GTG TAA      1006
Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
                325                 330                 335
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1.006 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch (Homo Sapiens)

(vii) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON:phCHM-I6-3

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: P CDS

(B) STELLUNG: 2 ... 1003

(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: E

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 3:

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
   1               5                  10                  15

GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG   97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
            20                  25                  30

CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT  145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
        35                  40                  45

TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC  193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
    50                  55                  60

TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT  241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65                  70                  75                  80

ATC AAT GGG AAA CTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC  289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
                85                  90                  95

AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA  337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110

GTT AAT GAT TTC CAG AAT GGC ATC ACA GGA ATT CGT TTT GCT GGA GGA  385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
        115                 120                 125

GAG AAG TGC TAC ATT AAA GCG CAA GTG AAG GCT CGT ATT CCT GAG GTG  433
Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
    130                 135                 140

GGC GCC GTG ACC AAA CAG AGC ATC TCC TCC AAA CTG GAA GGC AAG ATC  481
Gly Ala Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Lys Leu Glu Gly Lys Ile
145                 150                 155                 160

ATG CCA GTC AAA TAT GAA GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT  529
Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
                165                 170                 175

CAG CCT GTG AAG GAC AAC AGC TTC TTG AAT TCT AAG GTG TTA GAA CTC  577
Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Asn Ser Lys Val Leu Glu Leu
```

```
                180                 185                 190
TGC GGT GAC CTT CCT ATT TTC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA   625
Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
        195                 200                 205
ATC CAG AGG GAA AGA AGA GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC   673
Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr
    210                 215                 220
ACA AAA AGA CCA CAC AGT GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA   721
Thr Lys Arg Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg
225                 230                 235                 240
CTG AAT AAT GAA ACC AGA CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC   769
Leu Asn Asn Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe
                245                 250                 255
AAT CCT GAT AAT CCT TAT CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC   817
Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
            260                 265                 270
GAC CCT AGA CTG GAT CAC GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG   865
Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
        275                 280                 285
AGC TAC ACC CAC TGC CAG AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC   913
Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
    290                 295                 300
CCA TGG CCT TAT AAT TAT CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC   961
Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile
305                 310                 315                 320
ATG CCA TGT AGC TGG TGG GTG GCC CGC ATC CTG GGC ATG GTG TAA      1006
Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
                325                 330                 335
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 892 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch (Homo Sapiens)

(vii) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON:phCHM-I6-5

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: P CDS

(B) STELLUNG: 2 ... 889

(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: E

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 4:

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
    1               5                  10                  15

GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG   97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
            20                  25                  30

CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT  145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
        35                  40                  45

TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC  193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
    50                  55                  60

TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT  241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65                  70                  75                  80

ATC AAT GGG AAA TTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC  289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
                85                  90                  95

AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA  337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110

GTT AAT GAT TTC CAG AAT GAA GGC AAG ATC ATG CCA GTC AAA TAT GAA  385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Glu Gly Lys Ile Met Pro Val Lys Tyr Glu
        115                 120                 125

GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT CAG CCT GTG AAG GAC AAC  433
Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp Gln Pro Val Lys Asp Asn
    130                 135                 140

AGC TTC TTG AGT TCT AAG GTG TTA GAA CTC TGC GGT GAC CTT CCT ATT  481
Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu Cys Gly Asp Leu Pro Ile
145                 150                 155                 160
```

```
TCC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA ATC CAG AGG GAA AGA AGA   529
Ser Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu Ile Gln Arg Glu Arg Arg
                165                 170                 175
GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC ACA AAA AGA CCA CAC AAT   577
Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr Thr Lys Arg Pro His Asn
            180                 185                 190
GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA CTG AAT AAT GAA ACC AGA   625
Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg Leu Asn Asn Glu Thr Arg
        195                 200                 205
CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC AAT CCT GAT AAT CCT TAT   673
Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe Asn Pro Asp Asn Pro Tyr
    210                 215                 220
CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC GAC CCT AGA CTG GAT CAC   721
His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe Asp Pro Arg Leu Asp His
225                 230                 235                 240
GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG AGC TAC ACC CAC TGC CAG   769
Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg Ser Tyr Thr His Cys Gln
                245                 250                 255
AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC CCA TGG CCT TAT AAT TAT   817
Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr
            260                 265                 270
CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC ATG CCA TGT AGC TGG TGG   865
Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile Met Pro Cys Ser Trp Trp
        275                 280                 285
GTG GCC CGC ATC CTG GGC ATG GTG TAA                              892
Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
    290                 295
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1006 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch (Homo Sapiens)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: P CDS

(B) STELLUNG: 2 ... 1003

(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: E

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 5:

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
    1               5                  10                  15
GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG    97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
            20                  25                  30
CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT   145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
        35                  40                  45
TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC   193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
    50                  55                  60
TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT   241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65                  70                  75                  80
ATC AAT GGG AAA CTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC   289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
                85                  90                  95
AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110
GTT AAT GAT TTC CAG AAT GGC ATC ACA GGA ATT CGT TTT GCT GGA GGA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
        115                 120                 125
GAG AAG TGC TAC ATT AAA GCG CAA GTG AAG GCT CGT ATT CCT GAG GTG   433
Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
    130                 135                 140
GGC GCC GTG ACC AAA CAG AGC ATC TCC TCC AAA CTG GAA GGC AAG ATC   481
Gly Ala Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Lys Leu Glu Gly Lys Ile
145                 150                 155                 160
ATG CCA GTC AAA TAT GAA GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT   529
Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
                165                 170                 175
```

```
CAG CCT GTG AAG GAC AAC AGC TTC TTG AGT TCT AAG GTG TTA GAA CTC   577
Aln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu
            180                 185                 190
TGC GGT GAC CTT CCT ATT TTC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA   625
Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
        195                 200                 205
ATC CAG AGG GAA AGA AGA GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC   673
Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr
    210                 215                 220
ACA AAA AGA CCA CAC AGT GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA   721
Thr Lys Arg Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg
225                 230                 235                 240
CTG AAT AAT GAA ACC AGA CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC   769
Leu Asn Asn Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe
                245                 250                 255
AAT CCT GAT AAT CCT TAT CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC   817
Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
            260                 265                 270

GAC CCT AGA CTG GAT CAC GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG   865
Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
        275                 280                 285
AGC TAC ACC CAC TGC CAG AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC   913
Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
    290                 295                 300
CCA TGG CCT TAT AAT TAT CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC   961
Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile
305                 310                 315                 320
ATG CCA TGT AGC TGG TGG GTG GCC CGT ATC TTG GGC ATG GTG TGA      1006
Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
                325                 330                 335
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1006 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch (Homo Sapiens)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: P CDS

(B) STELLUNG: 2 ... 1003

(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: E

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 6:

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
    1               5                  10                  15
GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG    97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
             20                  25                  30
CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT   145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
         35                  40                  45
TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC   193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
     50                  55                  60
TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT   241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
 65                  70                  75                  80
ATC AAT GGG AAA CTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC   289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
                 85                  90                  95
AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110
GTT AAT GAT TTC CAG AAT GGC ATC ACA GGA ATT CGT TTT GCT GGA GGA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
        115                 120                 125
GAG AAG TGC TAC ATT AAA GCG CAA GTG AAG GCT CGT ATT CCT GAG GTG   433
Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
    130                 135                 140
GGC GCC GTG ACC AAA CAG AGC ATC TCC TCC AAA CTG GAA GGC AAG ATC   481
Gly Ala Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Lys Leu Glu Gly Lys Ile
145                 150                 155                 160
ATG CCA GTC AAA TAT GAA GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT   529
Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
                165                 170                 175
```

```
CAG CCT GTG AAG GAC AAC AGC TTC TTG AAT TCT AAG GTG TTA GAA CTC   577
Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Asn Ser Lys Val Leu Glu Leu
            180                 185                 190
TGC GGT GAC CTT CCT ATT TTC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA   625
Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
        195                 200                 205
ATC CAG AGG GAA AGA AGA GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC   673
Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr
    210                 215                 220
ACA AAA AGA CCA CAC AGT GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA   721
Thr Lys Arg Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg
225                 230                 235                 240
CTG AAT AAT GAA ACC AGA CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC   769
Leu Asn Asn Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe
                245                 250                 255
AAT CCT GAT AAT CCT TAT CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC   817
Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
            260                 265                 270
GAC CCT AGA CTG GAT CAC GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG   865
Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
        275                 280                 285

AGC TAC ACC CAC TGC CAG AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC   913
Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
    290                 295                 300
CCA TGG CCT TAT AAT TAT CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC   961
Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile
305                 310                 315                 320
ATG CCA TGT AGC TGG TGG GTG GCC CGT ATC TTG GGC ATG GTG TGA      1006
Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
                325                 330                 335
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 892 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch (Homo Sapiens)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: P CDS

(B) STELLUNG: 2 ... 889

(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: E

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 7:

```
C ATG ACA GAG AAC TCC GAC AAA GTT CCC ATT GCC CTG GTG GGA CCT GAT  49
  Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
    1               5                  10                  15

GAC GTG GAA TTC TGC AGC CCC CCG GCG TAC GCT ACG CTG ACG GTG AAG    97
Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
             20                  25                  30

CCC TCC AGC CCC GCG CGG CTG CTC AAG GTG GGA GCC GTG GTC CTC ATT   145
Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
         35                  40                  45

TCG GGA GCT GTG CTG CTG CTC TTT GGG GCC ATC GGG GCC TTC TAC TTC   193
Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
     50                  55                  60

TGG AAG GGG AGC GAC AGT CAC ATT TAC AAT GTC CAT TAC ACC ATG AGT   241
Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
 65                  70                  75                  80

ATC AAT GGG AAA TTA CAA GAT GGG TCA ATG GAA ATA GAC GCT GGG AAC   289
Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
                 85                  90                  95

AAC TTG GAG ACC TTT AAA ATG GGA AGT GGA GCT GAA GAA GCA ATT GCA   337
Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
            100                 105                 110

GTT AAT GAT TTC CAG AAT GAA GGC AAG ATC ATG CCA GTC AAA TAT GAA   385
Val Asn Asp Phe Gln Asn Glu Gly Lys Ile Met Pro Val Lys Tyr Glu
        115                 120                 125

GAA AAT TCT CTT ATC TGG GTG GCT GTA GAT CAG CCT GTG AAG GAC AAC   433
Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp Gln Pro Val Lys Asp Asn
    130                 135                 140

AGC TTC TTG AGT TCT AAG GTG TTA GAA CTC TGC GGT GAC CTT CCT ATT   481
Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu Cys Gly Asp Leu Pro Ile
145                 150                 155                 160
```

```
TCC TGG CTT AAA CCA ACC TAT CCA AAA GAA ATC CAG AGG GAA AGA AGA   529
Ser Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu Ile Gln Arg Glu Arg Arg
                165                 170                 175

GAA GTG GTA AGA AAA ATT GTT CCA ACT ACC ACA AAA AGA CCA CAC AAT   577
Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr Thr Lys Arg Pro His Asn
            180                 185                 190

GGA CCA CGG AGC AAC CCA GGC GCT GGA AGA CTG AAT AAT GAA ACC AGA   625
Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg Leu Asn Asn Glu Thr Arg
        195                 200                 205

CCC AGT GTT CAA GAG GAC TCA CAA GCC TTC AAT CCT GAT AAT CCT TAT   673
Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe Asn Pro Asp Asn Pro Tyr
    210                 215                 220

CAT CAG CAG GAA GGG GAA AGC ATG ACA TTC GAC CCT AGA CTG GAT CAC   721
His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe Asp Pro Arg Leu Asp His
225                 230                 235                 240

GAA GGA ATC TGT TGT ATA GAA TGT AGG CGG AGC TAC ACC CAC TGC CAG   769
Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg Ser Tyr Thr His Cys Gln
                245                 250                 255

AAG ATC TGT GAA CCC CTG GGG GGC TAT TAC CCA TGG CCT TAT AAT TAT   817
Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr
            260                 265                 270

CAA GGC TGC CGT TCG GCC TGC AGA GTC ATC ATG CCA TGT AGC TGG TGG   865
Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile Met Pro Cys Ser Trp Trp
        275                 280                 285

GTG GCC CGT ATC TTG GGC ATG GTG TGA                              892
Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
    290                 295
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch (Homo Sapiens)

(vii) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON:phCHM-ILAST8

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: P CDS
(B) STELLUNG: 1 ... 27
(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: E

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 8:

GTG GCC CGT ATC TTG GGC ATG GTG TGA 27
Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Stop
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 9:

GTAAAACGAC GGCCAGT 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 10:

CAGGAAACAG CTATGAC 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 60 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 11:

CTCGAGGCCA TGGCGGCCGC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 12:

GCGGCCGCCA TGGCCTCGAG 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 19 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 13:

AGTCTCCAAG TGCCTCACT 19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 14:

CGAGGCCATG GCGGCC 16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 15:

ATGACAGAG AACTCCGA 18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 16:

ACACCATGCC CAGGATGC 18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 17:

CCCTAGACTG GATCAC 16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 18:

TCACACCATG CCCAAGATAC GGGCCAC 27

Patentansprüche

1. Menschliches Chondromodulin-I-Protein, umfassend eine Aminosäuresequenz dargestellt in SEQ ID NO: 2, 3 oder 4, mit der Fähigkeit, das Wachstum von Chondrozyten zu stimulieren.

2. Isolierte DNA, die das menschliche Chondromodulin-I-Protein von Anspruch 1 codiert.

3. DNA gemäß Anspruch 2, wobei das DNA-Molekül die in SEQ ID NO: 2 bis 7 dargestellte Nukleotidsequenz umfaßt.

4. Expressionsvektor, der das Gen gemäß den Ansprüchen 2 und 3 exprimieren kann.

5. Transformante, transformiert mit einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 4.

6. Verfahren zur Erzeugung des Chondromodulin-I-Proteins, das das Kultivieren der Transformante von Anspruch 5 in einem geeigneten Medium für die Expression der DNA, codierend das Chondromodulin-I-Protein, und das Gewinnen des Chondromodulin-I-Proteins aus der resultierenden kultivierten Brühe umfaßt.

7. Rekombinantes menschliches Chondromodulin-I-Protein, umfassend eine Aminosäuresequenz wie dargestellt in SEQ ID NO: 2, 3 oder 4.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als Wirkstoff eine effektive Menge eines Chondromodulin-I-Proteins gemäß Anspruch 1 zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, Exzipienten oder Lösungsmittel.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 8, die zur Stimulation des Wachstums von Chondrozyten verwendet wird.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 8, wobei es sich um ein Antitumorarzneimittel handelt.

11. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß Anspruch 8 für die Herstellung eines Medikaments zur Stimulation des Wachstums von Chondrozyten.

12. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß Anspruch 8 für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen