



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/00, 9/52	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/22574 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06002 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Oktober 1997 (30.10.97) (30) Prioritätsdaten: 96118490.0 19. November 1996 (19.11.96) EP <i>(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist:</i> DE usw. 97101085.5 24. Januar 1997 (24.01.97) EP <i>(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist:</i> DE usw. (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BURTSCHER, Helmut [AT/DE]; Am Ährenanger 10, D-82392 Habach (DE). AMBROSIUS, Dorothee [DE/DE]; Minorstrasse 2, D-81477 München (DE). HESSE, Friederike [DE/DE]; Ganghoferstrasse 23, D-80339 München (DE).	(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Werk Penzberg, Patentabteilung (RE-TB), Postfach 11 52, D-82372 Penzberg (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	

(54) Title: TYPE I RECOMBINANT CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM COLLAGENASE AND ITS USE FOR ISOLATING CELLS AND CELL AGGREGATES

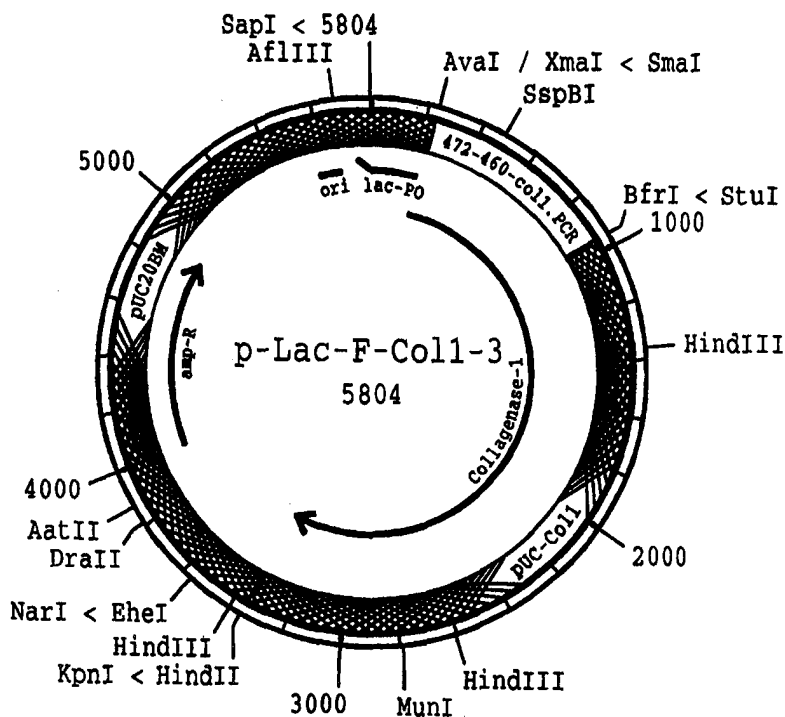
(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE COLLAGENASE TYP I AUS CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM UND IHRE VERWENDUNG ZUR ISOLIERUNG VON ZELLEN UND ZELLVERBÄNDEN

(57) Abstract

A polypeptide having the properties of a Class I Clostridium histolyticum collagenase (CHC I) and the amino acid sequence SEQ ID NO:2, the N terminal of which has been optionally extended in one or more amino acids of the sequence SEQ ID NO:3, is advantageously adequate for isolating cells in tissues from mammals and human tissues.

(57) Zusammenfassung

Ein Polypeptid mit den Eigenschaften einer Collagenase Class I aus Clostridium histolyticum (CHC I) und der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2, welche gegebenenfalls N-terminal um eine oder mehrere Aminosäuren der Sequenz SEQ ID NO:3 verlängert ist, ist zur Isolierung von Zellen aus Gewebe von Säugetieren und aus Humangewebe vorteilhaft geeignet.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Rekombinante Collagenase Typ I aus Clostridium histolyticum
und ihre Verwendung zur Isolierung von Zellen und Zellverbänden**

Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante Collagenase Typ I (CHC I) aus Clostridium histolyticum und ihre Verwendung zur Isolierung von Zellen und Zellverbänden.

Bakterielle Collagenasen, z.B. aus Clostridium histolyticum, werden zum Verdau von Geweben und zur Gewinnung von Einzelzellen oder Zellverbänden (z.B. Inseln) verwendet (Inseln: Sutton et al., Transplantation 42 (1986) 689 - 691; Leber: Quibel et al., Anal. Biochem. 154 (1986) 26 - 28; Knochen: Hefley et al., J. Bone Mineral Res. 2 (1987) 505 - 516; Nabelschnur: Holzinger et al., Immunol. Lett. 35 (1993) 109 - 118). Aus Clostridium histolyticum sind zwei verschiedene Collagenase-Typen bekannt (M.F. French et al., J. Protein Chemistry 11 (1992) 83 - 97). Die Isolierung und Reinigung von Collagenasen aus Clostridium histolyticum ist beispielsweise beschrieben in E.L. Angleton und H.E. van Wart, Biochemistry 27 (1988) 7413 - 7418 und 7406 - 7412.

Collagenasen I wurden von M.D. Bond und H.E. Van Wart, Biochemistry 23 (1984) 3077 - 3085 und 3085 - 3091 sowie von H.E. Van Wart, Biochemistry 24 (1985) 6520 - 6526 isoliert und beschrieben. Danach sind als Collagenasen I die Collagenasen α (MG 68 kD), β (MG 115 kD), γ (MG 79 kD) und η (MG 130 kD) bekannt. Collagenasen I und Collagenasen II unterscheiden sich in ihrer relativen Aktivität gegen Collagen und gegen synthetische Peptide. Collagenasen I haben höhere Aktivitäten gegenüber Collagen und Gelatine und geringere Aktivitäten gegenüber den kurzkettigen Peptiden als Collagenase II (Bond und Wart, Biochemistry 23 (1984) 3085 - 3091).

Weitere Collagenasen sind beschrieben in den US-Patenten 5,418,157 und 5,177,011 mit einem Molekulargewicht von 68 kD. Die WO 91/14447 beschreibt ebenfalls eine Collagenase mit einem Molekulargewicht von 68 kD. In der WO 94/00580 wird eine rekombinante Collagenase mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kD beschrieben und eine Sequenz hierfür angegeben. Über deren Spezifität und insbesondere, ob es sich um eine Collagenase I oder II handelt, wird in der WO 94/00580 nichts ausgesagt. Neben einer Collagenase mit dem Molekulargewicht von 110 kD wird noch eine 125 kD-Collagenase erwähnt, die ebenfalls rekombi-

nant herstellbar sein soll. Nähere Angaben zu dieser Collagenase sind jedoch in der WO 94/00580 nicht enthalten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer hochaktiven stabilen Collagenase Class I aus *Clostridium histolyticum* (CHC I).

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, welches die Eigenschaften einer CHC I aus *Clostridium histolyticum* aufweist, eine vorgegebene Aminosäurezusammensetzung besitzt und erhältlich ist durch Expression einer exogenen Nukleinsäure in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen und Isolierung des gewünschten Polypeptids, wobei die Nukleinsäure für ein Polypeptid der Sequenz ID NO:2 oder ein Polypeptid, welches N-terminal um eine oder mehrere Aminosäuren der Sequenz ID NO:3 verlängert ist, codiert.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß eine erfindungsgemäße CHC I eine hohe Collagenase Class I-Aktivität zeigt und sehr stabil ist. Bevorzugt ist eine CHC I der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 und eine CHC I, welche N-terminal um eine oder mehrere Aminosäuren der SEQ ID NO:3 verlängert ist.

Die erfindungsgemäße CHC I ist ein hochreines Enzym, welches in größeren Mengen hergestellt werden kann. Die erfindungsgemäße CHC I enthält keine Verunreinigungen durch andere clostridiale Enzyme und ist frei von Toxinen.

Die erfindungsgemäße CHC I ist insbesondere zur Isolierung von Zellen aus Geweben von Säugetieren, vorzugsweise aus Humangewebe, für zelltherapeutische Anwendung (Transplantation, Immuntherapie) und für die gentherapeutische Anwendung in den Geweben: z.B. Pankreas, Leber, Knochen, Knorpel, Haut, Gehirn und Nervengewebe, Fettmuskel, Herz, Endothel, Niere, solide Tumoren und zur Reinigung von Ulcera geeignet.

Darüber hinaus ist dieses hochreine Enzym (vorzugsweise im Gemisch mit anderen hochreinen Enzymen (wie Collagenase II und neutrale Protease) für die Isolierung von Zellen, deren Oberflächenmoleküle/Marker (Antigene) nicht verändert werden sollen, besonders geeignet. Bevorzugte Anwendungen hierfür sind beispielsweise die Dissoziation von soliden Tumoren aller Art in vitro (z. B. Kolon, Brust etc.) für die adoptive Immuntherapie und zur allgemeinen Diagnostik, wie z. B. zum Nachweis von seltenen Zellen aus Geweben und soliden Tumoren über spezifische Oberflächenmarker/-Moleküle.

Die Herstellung der rekombinanten CHC I kann nach den dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen.

Dazu wird zunächst ein DNA-Molekül hergestellt, welches in der Lage ist, ein Protein zu produzieren, welches die Aktivität von CHC I besitzt. Die DNA-Sequenz wird in einen Vektor kloniert, der in eine Wirtszelle transferiert werden kann und dort replizierbar ist. Ein derartiger Vektor enthält zusätzlich zur CHC I-Sequenz Promotor/Operator-Elemente, die zur Expression der DNA-Sequenz erforderlich sind. Dieser Vektor, der die CHC I-Sequenz und die Promotor/Operator-Elemente enthält, wird in eine Wirtszelle transferiert, die in der Lage ist, die DNA von CHC I zu exprimieren. Die Wirtszelle wird unter Bedingungen, die zur Amplifikation des Vektors geeignet sind, kultiviert und CHC I gewonnen. Dabei wird durch geeignete Maßnahmen sichergestellt, daß das Protein eine aktive tertiäre Struktur einnehmen kann, in der es CHC I-Eigenschaften zeigt.

Nukleinsäuresequenz und Proteinsequenz können in üblichem Umfang modifiziert sein. Derartige Modifikationen sind beispielsweise:

- Veränderung der Nukleinsäure, um verschiedene Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen zur Erleichterung der Schritte der Ligation, Klonierung und Mutagenese einzuführen
- Veränderung der Nukleinsäure zum Einbau von bevorzugten Codons für die Wirtszelle
- Ergänzung der Nukleinsäure um zusätzliche Operator-Elemente, um die Expression in der Wirtszelle zu optimieren.
- Austausch oder Deletion von Aminosäuren unter Beibehaltung der Basizität und der Raumstruktur der CHC I. Vorteilhaft ist, wenn die ursprüngliche Aminosäuresequenz zu 85 % oder mehr, vorzugsweise zu 90 % oder mehr, erhalten bleibt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Polypeptid mit der Eigenschaft einer Collagenase Class I aus *Clostridium histolyticum* mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder ein um eine oder mehrere Aminosäuren der SEQ ID NO:3 N-terminal verlängertes Polypeptid. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine für ein derartiges Protein codierende Nukleinsäure.

Die Herstellung des Proteins erfolgt vorzugsweise rekombinant in Mikroorganismen, insbesondere in Prokaryonten, und dort in *E. coli*.

Die hierfür geeigneten Expressionsvektoren müssen einen Promotor enthalten, der die Expression des Proteins im Wirtsorganismus erlaubt. Derartige Promotoren sind dem Fachmann bekannt und sind beispielsweise lac Promotor (Chang et al., Nature 198 (1977) 1056), trp Promotor (Goeddel et al., Nuc. Acids Res. 8 (1980) 4057), λ pL Promotor (Shimatake et al., Nature 292 (1981) 128) und T5 Promotor (US-Patent 4,689,406). Ebenfalls geeignet sind synthetische Promotoren wie beispielsweise tac Promotor (US-Patent 4,551,433). Ebenso geeignet sind gekoppelte Promotorsysteme wie beispielsweise T7-RNA-Polymerase/Promotorsystem (Studier et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113). Ebenso geeignet sind hybride Promotoren aus einem Bacteriophagen-Promotor und der Operator-Region des Mikroorganismus (EP-A 0 267 851). Zusätzlich zum Promotor ist eine effektive Ribosomenbindungsstelle erforderlich. Für *E. coli* wird diese Ribosomenbindungsstelle als Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz bezeichnet (Sambrook et al., "Expression of cloned genes in *E. coli*" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA).

Zur Verbesserung der Expression ist es möglich, das Protein als Fusionsprotein zu exprimieren. In diesem Fall wird üblicherweise eine DNA-Sequenz, welche für den N-terminalen Teil eines endogenen bakteriellen Proteins oder ein anderes stabiles Protein codiert, an das 5'-Ende der für CHC I codierenden Sequenz fusioniert. Beispiele hierfür sind beispielsweise lacZ (Phillips and Silhavy, Nature 344 (1990) 882 - 884), trpE (Yansura, Meth. Enzymol. 185 (1990) 161 - 166).

Nach Expression des Vektors, vorzugsweise eines biologisch funktionellen Plasmids oder eines viralen Vektors, werden die Fusionsproteine vorzugsweise mit Enzymen (z.B. Faktor Xa) gespalten (Nagai et al., Nature 309 (1984) 810). Weitere Beispiele für die Spaltstellen die IgA-Protease-Spaltstelle (WO 91/11520, EP-A 0 495 398) und die Ubiquitin-Spaltstelle (Miller et al., Bio/Technology 7 (1989) 698).

Die auf diese Weise in Bakterien exprimierten Proteine werden durch Aufschluß der Bakterien und Proteinisolierung in üblicher Weise gewonnen.

In einer weiteren Ausführungsform ist es möglich, die Proteine als aktive Proteine aus den Mikroorganismen zu sezernieren. Hierzu wird vorzugsweise ein Fusionsprodukt verwendet,

welches aus der Signalsequenz, die für die Sekretion von Proteinen in den verwendeten Wirtsorganismen geeignet ist, und der Nukleinsäure, welche für das Protein codiert, besteht. Das Protein wird dabei entweder in das Medium (bei grampositiven Bakterien) oder in den periplasmatischen Raum (bei gramnegativen Bakterien) sezerniert. Zwischen der Signalsequenz und der für CHC I codierenden Sequenz ist zweckmäßig eine Spaltstelle angebracht, die entweder bei der Prozessierung oder in einem zusätzlichen Schritt die Abspaltung des Proteins erlaubt. Derartige Signalsequenzen stammen beispielsweise von *ompA* (Ghrayeb et al., EMBO J. 3 (1984) 2437), *phoA* (Oka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 7212).

Zusätzlich enthalten die Vektoren noch Terminatoren. Terminatoren sind DNA-Sequenzen, die das Ende eines Transkriptionsvorganges signalisieren. Sie zeichnen sich meist durch zwei strukturelle Eigenarten aus: eine umgekehrt repetitive G/C-reiche Region, die intramolekular eine Doppelhelix bilden kann, sowie eine Anzahl von U(bzw. T)-Resten. Beispiele sind der Haupt-Terminator in der DNA des Phagen fd (Beck und Zink, Gene 16 (1981) 35-58) sowie *rrnB* (Brosius et al., J. Mol. Biol. 148 (1981) 107 - 127).

Zusätzlich enthalten die Expressionsvektoren üblicherweise einen selektierbaren Marker, um transformierte Zellen zu selektieren. Derartige selektierbare Marker sind beispielsweise die Resistenzgene für Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin, Neomycin und Tetracyclin (Davies et al., Ann. Rev. Microbiol. 32 (1978) 469). Ebenso geeignete selektierbare Marker sind die Gene für essentielle Substanzen der Biosynthese von für die Zelle notwendigen Stoffen wie z.B. Histidin, Tryptophan und Leucin.

Es sind eine Vielzahl von geeigneten bakteriellen Vektoren bekannt. Beispielsweise sind für die folgenden Bakterien Vektoren beschrieben: *Bacillus subtilis* (Palva et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5582), *E. coli* (Aman et al., Gene 40 (1985) 183; Studier et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113), *Streptococcus cremoris* (Powell et al., Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 655), *Streptococcus lividans* und *Streptomyces lividans* (US-Patent 4,747,056).

Weitere gentechnologische Verfahren zur Herstellung und Expression von geeigneten Vektoren sind in J. Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y. beschrieben.

Eine Expression von rekombinanter CHC I ist außer in prokaryontischen Mikroorganismen auch in Eukaryonten (wie beispielsweise CHO-Zellen, Hefe oder Insektenzellen) möglich. Als eukaryontisches Expressionssystem wird das Hefesystem oder Insektenzellen bevorzugt. Die

Expression in Hefe kann über drei Arten von Hefevektoren (integrierende YIp (yeast integrating plasmids)-Vektoren, replizierende YRp (yeast replicon plasmids)-Vektoren und episomale YE_p (yeast episomal plasmids)-Vektoren erfolgen. Näheres hierzu ist beispielsweise in S.M. Kingsman et al, Tibtech 5 (1987) 53- 57 beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auflösung von Zellgewebe und Freisetzung von darin enthaltenen Zellen oder Zellverbänden durch Inkubation des Zellgewebes mit einer erfindungsgemäßen Collagenase Class I aus *Clostridium histolyticum*, bis zur Freisetzung der Zellen oder Zellverbände im gewünschten Umfang und Abtrennung der Zellen oder der Zellverbände von den Zellgewebeanteilen. Die Abtrennung der Zellen oder Zellverbände von den Zellgewebsanteilen erfolgt bevorzugt durch Zentrifugation mit einem Dichtegradienten.

Eine Isolierung von Zellen bzw. Zellverbänden aus Geweben (z.B. Pankreas, Leber, Haut, Endothel, Nabelschnur, Knochen, Tumorgewebe) erfolgt im allgemeinen durch Inkubation von Organen, Organteilen oder Geweben mit Enzymen, die die umgebende extrazelluläre Bindegewebe-Matrix auflösen (Inseln: Sutton et al., Transplantation 42 (1986) 689 - 691; Leber: Quibel et al., Anal. Biochem. 154 (1986) 26 - 28; Knochen: Hefley et al., J. Bone Mineral Res. 2 (1987) 505 - 516; Nabelschnur: Holzinger et al., Immunol. Lett. 35 (1993) 109 - 118). Derartig isolierte Tumorzellen können vorteilhaft zur Tumorstimmung und/oder adoptiven Immuntherapie verwendet werden. Eine Gewebsdesintegration kann auch durch Perfusion des gesamten Organs (Ricordi et al, Diabetes 37 (1988) 413 - 420) mit Enzymlösung erfolgen. Entscheidend neben der Zusammensetzung des Enzymgemisches ist dabei die Dauer, der pH-Wert und die Temperatur des Verdaus sowie auch die mechanische Einwirkung, z.B. durch Schütteln und Zusatz von Metallkugeln. Da extrazelluläre Bindegewebsmatrix oft einen hohen Collagen-Anteil aufweist, kommt den Collagenasen eine besondere Rolle zu (Wolters, Hormone and Metabolic Research 26 (1994) 80).

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Isolierung von Inseln oder Inselzellen aus Pankreasgewebe verwendet.

Daneben kann der Zusatz weiterer Enzyme, wie Proteinasen (z. B. neutrale Protease, vgl. Bsp. 5, oder andere Metalloproteasen; Serinproteasen, wie Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin etc.; Cysteinproteasen; Aspartat-Proteasen), Elastasen, Hyaluronidasen, Lipasen oder anderer Collagenasen für die Qualität des Verdaus von Vorteil sein.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele, die Figur und das Sequenzprotokoll näher erläutert.

In den Sequenzprotokollen bedeuten:

SEQ ID NO: 1: DNA-Fragment von CHC I

SEQ ID NO: 2: abgeleitetes Proteinfragment

SEQ ID NO: 3: N-terminale Verlängerung

SEQ ID NO: 4: 4 - 24: Primer und Peptidfragmente

Fig. 1 zeigt den Expressionsvektor p-Lac-F-Coll-3

Beispiel 1

Reinigung der Collagenase Class I (CHC I)

1 g Collagenase P (aus *Clostridium histolyticum*, Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 1 213 857) wurde in 20 ml H₂O (Milli Q-Qualität) gelöst und partikuläre Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Nach 60% Ammoniumsulfat-Fällung wurde der Niederschlag in 9.5 ml H₂O aufgenommen und über Nacht bei 4°C gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 dialysiert.

Das Dialysat wurde bei Raumtemperatur auf eine Zn-Chelat-Sepharose-Säule (Säulenvolumen SV = 50 ml, 2 cm Durchmesser) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 10 mM Tris HCl, pH 7,5, gewaschen.

Der Durchlaufpeak, der die CHC I-Fractionen enthält, wurde über eine Mono Q-Säule (Pharmacia) in 10 mM/l Tris HCl, pH 7,5, unter Verwendung eines linearen Gradienten bis 10 mM/l Tris, pH 7,5, 0,3 M/l NaCl weiter aufgetrennt. Der CHC I-Aktivität enthaltende Peak (Aktivität als Azocoll-Aktivität bestimmt, nach Chavira et al., Anal. Biochem. 136 (1984) 446 - 450) wird über die Reversed-Phase-HPLC weiter gereinigt (Laufmittel A: 0,12 % TFA (Trifluoressigsäure/H₂O, 25 % Acetonitril, Stufengradient bis 50 % Acetonitril in 5 min und bis 70 % Acetonitril in 15 min). Die den Hauptpeak enthaltende Fraktion der zweiten Gradientenstufe wird zur Trockene eingeeengt und nach Carboxymethylierung einem Verdau mit Endoproteinase LysC unterworfen. Die Trennung der Peptide erfolgte ebenfalls über Reversed-Phase-HPLC (Vydac C₄) mit einem Gradienten von 5 - 45 % Acetonitril/0,12 % TFA in 105 min. Die Peptide wurden gesammelt, zur Trockene eingeeengt und sequenziert.

Beispiel 2**Klonierung der Collagenase Class I aus *Clostridium histolyticum***

2.1 Abgeleitet von Peptidsequenzen, die durch den Verdau von gereinigter Collagenase I aus *Clostridium histolyticum* gem. Beispiel 1 gewonnen wurden, wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion ein 1,4 kB Stück des CHC I Gens isoliert. Dieses Stück, bzw. Fragmente davon, wurden zum Herstellen einer DNA-Sonde, die z.B. mit Dig markiert werden kann, verwendet. Eine solche Sonde dient zum Screenen von Genbanken, um den Rest des CHC I Gens zu isolieren.

Peptidsequenzen:

Coll-I-2Q: F N S P E E Y (SEQ ID NO:4)

Coll-I-72: E D G D V T I (SEQ ID NO:5)

Davon abgeleitete Primer:

Coll-1-2QF: 5' tty aay wsn ccn gar gar tay (SEQ ID NO:6)

Coll-1-2QR: 5' rta ytc ytc ngg nsw rtt raa (SEQ ID NO:7)

Coll-1-72F: 5' gar gay ggn gay gtn acn att (SEQ ID NO:8)

Coll-1-72R: 5' dat ngt nac rtc ncc rtc ytc (SEQ ID NO:9)

Es wurden vier Primer entworfen und in zwei verschiedenen PCR-Reaktionen eingesetzt (Primer-Kombinationen 2QF/72R und 2QR/72F). Nur die Kombination 2QF mit 72 R ergab ein PCR-Produkt (Länge 1,4 kB), das der Sequenz von Position 2418 bis 3806 der in SEQ ID NO:1 angegebenen Gesamtsequenz entsprach.

Die Identität dieses Stücks und des darauf liegenden Leserahmens wurde durch die Wieder-auffindung weiterer Peptidsequenzen der Collagenase I aus *Clostridium histolyticum* erhärtet:

Peptid 1-23: DWDEMSK (SEQ ID NO:10)

Peptid 1-33: VTGPSTGAVGRNIEFSGK (SEQ ID NO:11)

Peptid: 1-40: NTEYQNHQELVDK (SEQ ID NO:12)

2.2 Genbank-Screening:

Aus einer Genbank, die aus Stu I / Hind II geschnittener genomischer DNA von *Clostridium histolyticum* hergestellt wurde, konnte mit Hilfe eines Digoxigenin-markierten Fragments (abgeleitet von obigem 1,4 kB Fragment) ein DNA Fragment von 5,4 kB Länge isoliert werden, das die gesamte 1,4 kB Sonde enthielt.

Durch DNA-Sequenzierung von den Enden der bekannten 1,4 kB Sequenz, konnte die CHC I Sequenz am 3'-Ende vervollständigt, und am 5'-Ende bis zu einer Stu I Schnittstelle ergänzt werden.

Die Sequenz am 3'-Ende entspricht Position 3807 bis 4358 der in SEQ ID NO:1 angegebenen Gesamtsequenz:

In diesem Sequenzabschnitt konnte die Sequenz eines weiteren Peptides des Wildtyp-Enzyms wiedergefunden werden:

Peptid 1-67: EDGDVTIELPYSGSSNFTWLVY (SEQ ID NO:13)

Dieses Peptid überlappt zu einem großen Teil mit Peptid 1-72 (SEQ ID NO:5), enthält aber vier zusätzliche Aminosäuren, die auf dem ursprünglichen 1,4 kB DNA-Fragment noch nicht auffindbar sind.

Die Sequenz am 5'-Ende entspricht Position 1969 bis 2417 der in SEQ ID NO:1 angegebenen Gesamtsequenz.

Aus einer Bgl II Genbank konnte ebenfalls mit der markierten 1,4 kB Sonde ein DNA Fragment von 4,6 kB identifiziert werden. Dieses Fragment erwies sich als ganzes nicht klonierbar, konnte jedoch von der Stu I Site her ansequenziert werden und ergab weitere Sequenzinformationen über den 5' Bereich.

Die gefundene Sequenz entspricht Position 1630 bis 1974 der in SEQ ID NO:1 angegebenen Gesamtsequenz.

Die Zugehörigkeit dieser Sequenz zum Collagenase I Gen wurde durch das Auffinden eines weiteren Peptides bestätigt:

Peptid 1-42: QFRENLNQYAPDYVK (SEQ ID NO:14)

2.3 Inverse PCR:

In einem Versuch, den 5' Bereich des Gens über einen inversen PCR-Ansatz zu fassen, wurde *StuI* geschnittene genomische DNA aus *Clostridium histolyticum* im Agarosegel aufgetrennt, der Bereich von 1,9 - 2,7 kB wurde isoliert (aus dem Gel ausgeschnitten), religiert und via inverse PCR amplifiziert:

Verwendete Primer:

449-coll1: 5'-aga caa tgc ctt ggt atg g (SEQ ID NO:15)

453-coll1-R: 5'-gtg aaa gtt tct ata ccc ttc (SEQ ID NO:16)

Es wurde ein Fragment von 1,85 kB erhalten, das aber nicht als Ganzes klonierbar war, eine Teilsequenz konnte jedoch ermittelt werden.

Es handelt sich um Position 1384 bis Position 1570 der in SEQ ID NO:1 angegebenen Gesamtsequenz.

Diese Sequenz liegt in der Startregion und unmittelbar upstream der bisher beschriebenen Sequenz für das Collagenase I Gen von *Clostridium histolyticum*.

2.4 Klonierung des 5'-Bereichs des Collagenase I Gens aus *Clostridium histolyticum*:

Genomische DNA von *Clostridium histolyticum* wurde mit *HindIII*/*StuI* verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Der Bereich zwischen 1,7 und 2,2 kB wurde ausgeschnitten (nach Southern blot erwartetes Fragment liegt bei 1,9 kB). Die DNA wurde aus dem Gel nach konventionellen Methoden isoliert (QiaEx) und in pUC19 via *Hind III* / *Hind II* kloniert.

2.5 Genbank-Screening:

Die HindIII/StuI Genbank wurde gescreent mit einer ca. 400 bp großen Dig-markierten Sonde.

Die Sequenz der Sonde entspricht Position 1453 bis 1852 der in SEQ ID NO:1 angegebenen Gesamtsequenz.

Die Sonde wurde mit Hilfe zweier Primer hergestellt:

464-coll1: 5'-gta cag gtt ctc aaa agt tc (SEQ ID NO:17)

448-coll1-R: 5'-gtt cct tta acg taa tca gg (SEQ ID NO:18)

Unter ca. 2200 gescreenten Klonen fanden sich 14 mit positivem Signal, davon wurden nach gängigen Methoden Plasmid-Minipreps durchgeführt, die besten 4 Klone enthielten alle dasselbe Insert, welches der Position 1 - 1971 der in SEQ ID NO:1 angegebenen Gesamtsequenz entspricht.

Mit dieser Sequenz ergibt sich eine Gesamtlänge für das CHC I Gen und seine Upstream Region von ca. 4,4 kB. Die vollständige Sequenz ist in SEQ ID NO:1 wiedergegeben.

Auf dieser Sequenz liegt ein großer offener Leseraster, der im 3'-Bereich in den bereits beschriebenen Teil der Collagenase I mündet.

Potentielle Startpunkte für die Translation befinden sich an Position 1002 (ATG), 1029 (ATG), 1110 (ATG), sowie 1176 (GTG) und 1254 (GTG).

2.6. Im 5'-Bereich verlängerte Konstrukte:

Ein durch Proteinsequenzierung bestimmter N-Terminus einer möglichen reifen Form der Collagenase (IANTNSEK - SEQ ID NO:19) liegt bei Position 1332 von SEQ ID NO:1. Das entsprechende Polypeptid ist in SEQ ID NO:2 wiedergegeben. Da auch alle oben beschriebenen Translations-Startpunkte noch weiter 5' und im Raster liegen, wurden mehrere Expressions-Konstrukte hergestellt, und ihr Expressionsverhalten untersucht. Überraschenderweise zeigt es sich, daß Starts an mehreren Positionen jeweils zu aktiv exprimiertem Enzym führen.

Beispiele für solche Konstrukte:

Durch geeignete Wahl der Primer kann jeweils eine SmaI bzw. AvaI Schnittstelle 5' vor ATG 1002, 1029, 1110 oder auch GTG 1176 oder 1254 eingeführt werden. Verwendet man einen Gegenprimer der jenseits der BfrI Schnittstelle (1965 - 1970) liegt, so können aus einem

pUCBM20-Expressionsvektor alle weiteren durch Austausch über SmaI bzw. AvaI und BfrI Schnitt hergestellt werden.

Start an 1002: MTMITNSRA MKKNILKIL ... (SEQ ID NO:20)

Start an 1029: MTMITNSRA MDSYSKESK (SEQ ID NO:21)

Start an 1176: MTMITNSRA MKNIEEAKV (SEQ ID NO:22)

Die unterstrichene Sequenz ist jeweils ein konstruktionsbedingter Fusionsanteil aus pUCBM20.

Es ist bekannt, daß auch GTG-Sequenzen unter Umständen als Startposition in Frage kommen. Ein besonders bevorzugter Start ist bei GTG 1176, das durch Wahl eines geeigneten Primers in ein ATG verwandelt werden kann:

Primer 472-Col1: 5'-ttc cca att gcc cgg gct atg aaa aat ata gaa gag gca aag
(SEQ ID NO:23)

Dies führt zu Expressionsvektor placF-col1-3 (Fig. 1).

2.7 Weitere Expressionsmöglichkeiten:

Die bisher beschriebenen Expressionskonstrukte verwenden den lac Promoter und das homologe Signalpeptid. Ebenso gut können statt dessen andere Promotoren eingesetzt werden, wie mgl (EP-B 0 285 152) oder tac (EP-B 0 067 540).

Das Signalpeptid kann auch durch andere, z.B. das mgl-Signalpeptid, ersetzt werden. Die Einsetzung eines solchen heterologen Signalpeptids sollte bevorzugt direkt vor dem reifen 5'-Ende des Collagenase-Gens erfolgen. Es zeigt sich aber auch hier, daß mehrere Positionen denkbar sind. So führt sowohl ein mgl-Signal vor Peptidsequenz IANTNSEK (SEQ ID NO:19) als auch vor AYLTMENTS (SEQ ID NO:24) zu aktiver Expression der CHC I. Der konstruktionsbedingte Fusionsanteil aus pUCBM20 ist ebenfalls nicht erforderlich. Expression erfolgt auch, wenn dieser Fusionsanteil verkürzt oder ganz entfernt wird. Denkbar ist auch die völlige Entfernung des Signals und die cytoplasmatische Expression der CHC I.

2.8 Stämme:

Zur Expression der CHC I dienen bevorzugt bekannte E. coli K12-Stämme, wie z.B. C600, HB101 und ähnliche. Andere prokaryontische Systeme, auch grampositive (z.B. Bacillus oder Streptomyces) sowie Expression in eukaryontischen Zellsystemen sind ebenfalls denkbar.

2.9 Molekulargewicht:

gereinigt (Wildtyp):	ca. 115 kDa (nach SDS-Gelelektrophorese)
gereinigt (rec):	ca. 115 kDa (nach SDS-Gelelektrophorese)
theoret. (IANTNSEK):	113897
theoret. (AYLTMNTS):	122547

Beispiel 3**Expression von Collagenase Class I****10 l Fermentation des E.coli Expressionsklons für CHC I und Hochdruckaufschluß**

Aus Stammkulturen (Plattenausstrich, Ampullen oder Pailletten) werden Vorkulturen angesetzt, die geschüttelt bei 30 - 37°C inkubiert werden.

Das Überimpfungsvolumen in die nächsthöhere Dimension beträgt jeweils 1 - 10 Vol%.

Zur Selektion gegen Plasmidverlust wird in Vor- und Hauptkultur Ampicillin (50 - 100 mg/l) eingesetzt.

Als Nährstoffe können enzymatisch verdautes Eiweiß und/oder Hefeextrakt als N- und C-Quelle sowie Glycerin und/oder Glucose als zusätzliche C-Quelle verwendet werden. Das Medium wird auf pH 7 gepuffert, und Metallsalze können zur Stabilisierung des Fermentationsprozesses in physiologisch verträglichen Konzentrationen zugesetzt werden.

Die Fermentation wird als Fedbatch mit einer gemischten Eiweiß/Hefeextrakt Dosage durchgeführt. Durch die Dosagegeschwindigkeit wird die Wachstumsgeschwindigkeit geregelt und mittels Glycerin und/oder Glucose als Säureregulans wird der pH-Wert gesteuert. Über Belüftungsrate, Drehzahlregulierung und Dosagegeschwindigkeit wird der Gelöst-Sauerstoffpartialdruck (pO_2) > 20 % gehalten, um anaerobe Bedingungen zu vermeiden. Die Fermentationstemperatur beträgt 25 - 37°C.

Das Wachstum wird über Ermittlung der optischen Dichte bei 528 nm bestimmt. Mittels IPTG oder Lactose wird die Expression der CHC I induziert. Nach einer Fermentationsdauer von ca. 30 - 40 Std. wird bei OD-Stillstand die Biomasse durch Zentrifugation geerntet.

Die Biomasse wird in einem geeigneten Puffer aufgenommen und über eine kontinuierliche Hochdruckpresse bei 1000 Bar aufgeschlossen. Die so erhaltene Suspension wird erneut abzentrifugiert und der Überstand, der die gelöste CHC I enthält, wird weiterverarbeitet.

Beispiel 4

Isolierung von Inseln aus Schweine-Pankreas

Aus einem frisch geschlachteten Schwein wird der Pankreas präpariert und in eiskaltem HBSS-Puffer (Gibco) bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt. In den Ductus pancreaticus wird eine Braunüle eingeführt und befestigt, die Dichtigkeit des Pankreas wird mit HBSS-Puffer geprüft. Eine Enzymlösung in HBSS-Puffer + Ca^{2+} , die die gereinigte rekombinante Collagenase Typ I allein oder in Verbindung mit einer gereinigten nativen oder rekombinanten neutralen Protease und/oder Collagenase Typ II aus *Clostridium histolyticum* enthält, wird eingespritzt. Der so behandelte Pankreas wird an die ebenfalls obige Enzymlösung enthaltende Perfusionseinheit (diskontinuierliche Perfusion) angeschlossen. Der Verdau erfolgt zwischen 40°C - 37°C in einem Zeitraum von 5 bis 120 Minuten. Nach der als optimal angenommenen Zeit wird die Pumpe gestoppt und das den Pankreas enthaltende Gefäß 3 bis 20 Minuten lang vorsichtig per Hand geschüttelt. Im Bedarfsfall vorher zugegebene Metallkugeln erleichtern zusätzlich die mechanische Dissoziation des Gewebes und die Freisetzung der Inseln aus dem umgebenden exokrinen Gewebe.

Der Verdau wird durch Zugabe von eiskaltem HBSS/10 % FKS (fötales Kälberserum) gestoppt und die Suspension durch ein Sieb (Maschengröße 300 µm) filtriert, um die Grobteile abzutrennen. Die im Durchfluß befindlichen Inseln werden 10 Minuten bei 100 g in 250 ml Nalgene-Rundbodenflaschen abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das die Inseln enthaltende Pellet in 50 ml FKS resuspendiert.

Eine weitere Aufreinigung der Inseln kann über einen per Hand hergestellten Dichtegradienten erfolgen. In 250 ml Nalgene-Rundbodenflaschen werden zunächst 7 ml der Inselfusion gegeben. Diese wird zunächst mit 93 ml einer Ficoll-Lösung® ($\rho = 1.077 \text{ g/cm}^3$), darauffolgend mit 50 ml Medium (RPMI 1640) überschichtet. Diese Gradienten werden im Aus-

schwingrotor bei 100 g für 10 Minuten zentrifugiert. Fraktionen á 10 ml werden abgenommen, die Größe, Reinheit und Ausbeute der mit Dithizon gefärbten Inseln wird in jeder Fraktion mikroskopisch oder mit Hilfe der Bildanalytik bestimmt.

Referenzliste

- Amann et al., Gene 40 (1985) 183
Angleton, E.L. und Van Wart, H.E., Biochemistry 27 (1988) 7413 - 7418 und 7406 - 7412
Beck und Zink, Gene 16 (1981) 35-58
Bond, M.D. und Van Wart, H.E., Biochemistry 23 (1984) 3077 - 3085
Bond, M.D. und Van Wart, H.E., Biochemistry 23 (1984) 3085 - 3091
Brosius et al., J. Mol. Biol. 148 (1981) 107 - 127
Chang et al., Nature 198 (1977) 1056
Davies et al., Ann. Rev. Microbiol. 32 (1978) 469
EP-A 0 267 851
EP-A 0 495 398
French, M.F., et al., J. Protein Chemistry 11 (1992) 83 - 97
Ghrayeb et al., EMBO J. 3 (1984) 2437
Goeddel et al., Nuc. Acids Res. 8 (1980) 4057
Hefley et al., J. Bone Mineral Res. 2 (1987) 505 - 516
Holzinger et al., Immunol. Lett. 35 (1993) 109 - 118
Kingsman, S.M., et al, Tibtech 5 (1987) 53- 57
Miller et al., Bio/Technology 7 (1989) 698
Nagai et al., Nature 309 (1984) 810
Oka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 7212
Palva et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5582
Phillips and Silhavy, Nature 344 (1990) 882 - 884
Powell et al., Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 655
Quibel et al., Anal. Biochem. 154 (1986) 26 - 28
Ricordi et al., Diabetes 37 (1988) 413 - 420
Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
Shimatake et al., Nature 292 (1981) 128
Studier et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113
Sutton et al., Transplantation 42 (1986) 689 - 691
US-Patent 4,551,433

US-Patent 4,689,406

US-Patent 4,747,056

US-Patent 5,177,011

US-Patent 5,418,157

Van Wart, H.E., Biochemistry 24 (1985) 6520 - 6526

WO 91/11520

WO 91/14447

WO 94/00580

Wolters, Hormone and Metabolic Research 26 (1994) p. 80

Yansura, Meth. Enzymol. 185 (1990) 161 - 166

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-68305
- (G) TELEFON: 08856/60-3446
- (H) TELEFAX: 08856/60-3451

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Collagenase Typ I aus Clostridium histolyticum und ihre Verwendung zur Isolierung von Zellen und Zellverbaenden

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 24

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4358 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:1332..4358

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AAGCTTTTAT AATTCTCACT ATACTCTCTA GATGGTATAA TAAGAGCCCA AAATACGAAG	60
AATATAATAA AATATAATTT AAAAAGGATG ATTTCAATGC GAAAAAGAGT TTTTTTGAAT	120
ATATTTTTTTA TTTTATGTTC CTCAATTTTT TTTATGTCCT GCACAGGAAA ATTTTCAGGTT	180
ATAGATCGGG GTGATGGGGG AGATGAAATT TATTTAAACA AACAAGATGG TGTGAGTTTT	240
GAGATTCCTA AAGTGTGGGA TAAAAATTAT AAGATTATCA CTTCTAGAGA TAAAAGATAT	300

ACT	TTC	ACT	GAG	GTT	TTA	AGA	GCT	GGT	TTT	TAT	TTA	GGG	TAC	TAT	AAT	1610
Thr	Phe	Thr	Glu	Val	Leu	Arg	Ala	Gly	Phe	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Tyr	Asn	
		80					85					90				
GAT	GGT	TTA	TCT	TAT	TTA	AAT	GAT	AGA	AAC	TTC	CAA	GAT	AAA	TGT	ATA	1658
Asp	Gly	Leu	Ser	Tyr	Leu	Asn	Asp	Arg	Asn	Phe	Gln	Asp	Lys	Cys	Ile	
	95					100					105					
CCT	GCA	ATG	ATT	GCA	ATT	CAA	AAA	AAT	CCT	AAC	TTT	AAG	CTA	GGA	ACT	1706
Pro	Ala	Met	Ile	Ala	Ile	Gln	Lys	Asn	Pro	Asn	Phe	Lys	Leu	Gly	Thr	
110					115					120					125	
GCA	GTT	CAA	GAT	GAA	GTT	ATA	ACT	TCT	TTA	GGA	AAA	CTA	ATA	GGA	AAT	1754
Ala	Val	Gln	Asp	Glu	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Ile	Gly	Asn	
				130					135					140		
GCT	TCT	GCT	AAT	GCT	GAA	GTA	GTT	AAT	AAT	TGT	GTA	CCA	GTT	CTA	AAA	1802
Ala	Ser	Ala	Asn	Ala	Glu	Val	Val	Asn	Asn	Cys	Val	Pro	Val	Leu	Lys	
			145					150					155			
CAA	TTT	AGA	GAA	AAC	TTA	AAT	CAA	TAT	GCT	CCT	GAT	TAC	GTT	AAA	GGA	1850
Gln	Phe	Arg	Glu	Asn	Leu	Asn	Gln	Tyr	Ala	Pro	Asp	Tyr	Val	Lys	Gly	
		160					165					170				
ACA	GCT	GTA	AAT	GAA	TTA	ATT	AAA	GGT	ATT	GAA	TTC	GAT	TTT	TCT	GGT	1898
Thr	Ala	Val	Asn	Glu	Leu	Ile	Lys	Gly	Ile	Glu	Phe	Asp	Phe	Ser	Gly	
	175					180					185					
GCT	GCA	TAT	GAA	AAA	GAT	GTT	AAG	ACA	ATG	CCT	TGG	TAT	GGA	AAA	ATT	1946
Ala	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Thr	Met	Pro	Trp	Tyr	Gly	Lys	Ile	
190					195					200					205	
GAT	CCA	TTT	ATA	AAT	GAA	CTT	AAG	GCC	TTA	GGT	CTA	TAT	GGA	AAT	ATA	1994
Asp	Pro	Phe	Ile	Asn	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Tyr	Gly	Asn	Ile	
				210					215					220		
ACA	AGT	GCA	ACT	GAG	TGG	GCA	TCT	GAT	GTT	GGA	ATA	TAC	TAT	TTA	AGT	2042
Thr	Ser	Ala	Thr	Glu	Trp	Ala	Ser	Asp	Val	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Ser	
			225					230					235			
AAA	TTC	GGG	CTT	TAC	TCA	ACT	AAC	CGA	AAT	GAC	ATA	GTA	CAG	TCA	CTT	2090
Lys	Phe	Gly	Leu	Tyr	Ser	Thr	Asn	Arg	Asn	Asp	Ile	Val	Gln	Ser	Leu	
		240					245					250				
GAA	AAG	GCT	GTA	GAT	ATG	TAT	AAG	TAT	GGT	AAA	ATA	GCC	TTT	GTA	GCA	2138
Glu	Lys	Ala	Val	Asp	Met	Tyr	Lys	Tyr	Gly	Lys	Ile	Ala	Phe	Val	Ala	
	255					260					265					
ATG	GAG	AGA	ATA	ACT	TGG	GAT	TAT	GAT	GGG	ATT	GGT	TCT	AAT	GGT	AAA	2186
Met	Glu	Arg	Ile	Thr	Trp	Asp	Tyr	Asp	Gly	Ile	Gly	Ser	Asn	Gly	Lys	
270					275					280					285	
AAG	GTG	GAT	CAC	GAT	AAG	TTC	TTA	GAT	GAT	GCT	GAA	AAA	CAT	TAT	CTG	2234
Lys	Val	Asp	His	Asp	Lys	Phe	Leu	Asp	Asp	Ala	Glu	Lys	His	Tyr	Leu	
				290					295					300		

CCA	AAG	ACA	TAT	ACT	TTT	GAT	AAT	GGA	ACC	TTT	ATT	ATA	AGA	GCA	GGG	2282
Pro	Lys	Thr	Tyr	Thr	Phe	Asp	Asn	Gly	Thr	Phe	Ile	Ile	Arg	Ala	Gly	
			305					310					315			
GAT	AAG	GTA	TCC	GAA	GAA	AAA	ATA	AAA	AGG	CTA	TAT	TGG	GCA	TCA	AGA	2330
Asp	Lys	Val	Ser	Glu	Glu	Lys	Ile	Lys	Arg	Leu	Tyr	Trp	Ala	Ser	Arg	
		320					325					330				
GAA	GTG	AAG	TCT	CAA	TTC	CAT	AGA	GTA	GTT	GGC	AAT	GAT	AAA	GCT	TTA	2378
Glu	Val	Lys	Ser	Gln	Phe	His	Arg	Val	Val	Gly	Asn	Asp	Lys	Ala	Leu	
	335					340					345					
GAG	GTG	GGA	AAT	GCC	GAT	GAT	GTT	TTA	ACT	ATG	AAA	ATA	TTT	AAT	AGC	2426
Glu	Val	Gly	Asn	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Thr	Met	Lys	Ile	Phe	Asn	Ser	
350					355					360					365	
CCA	GAA	GAA	TAT	AAA	TTT	AAT	ACC	AAT	ATA	AAT	GGT	GTA	AGT	ACT	GAT	2474
Pro	Glu	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asn	Thr	Asn	Ile	Asn	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	
				370					375					380		
AAT	GGT	GGT	CTA	TAT	ATA	GAA	CCA	AGA	GGG	ACT	TTC	TAC	ACT	TAT	GAG	2522
Asn	Gly	Gly	Leu	Tyr	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Thr	Phe	Tyr	Thr	Tyr	Glu	
			385					390					395			
AGA	ACA	CCT	CAA	CAA	AGT	ATA	TTT	AGT	CTT	GAA	GAA	TTG	TTT	AGA	CAT	2570
Arg	Thr	Pro	Gln	Gln	Ser	Ile	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Phe	Arg	His	
		400					405					410				
GAA	TAT	ACT	CAC	TAT	TTA	CAA	GCG	AGA	TAT	CTT	GTA	GAT	GGT	TTA	TGG	2618
Glu	Tyr	Thr	His	Tyr	Leu	Gln	Ala	Arg	Tyr	Leu	Val	Asp	Gly	Leu	Trp	
	415					420					425					
GGG	CAA	GGT	CCA	TTT	TAT	GAA	AAA	AAT	AGA	TTA	ACT	TGG	TTT	GAT	GAA	2666
Gly	Gln	Gly	Pro	Phe	Tyr	Glu	Lys	Asn	Arg	Leu	Thr	Trp	Phe	Asp	Glu	
430					435					440					445	
GGT	ACA	GCT	GAA	TTC	TTT	GCA	GGA	TCT	ACC	CGT	ACA	TCT	GGT	GTT	TTA	2714
Gly	Thr	Ala	Glu	Phe	Phe	Ala	Gly	Ser	Thr	Arg	Thr	Ser	Gly	Val	Leu	
				450					455					460		
CCA	AGA	AAA	TCA	ATA	TTA	GGA	TAT	TTG	GCT	AAG	GAT	AAA	GTA	GAT	CAT	2762
Pro	Arg	Lys	Ser	Ile	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Asp	His	
			465					470					475			
AGA	TAC	TCA	TTA	AAG	AAG	ACT	CTT	AAT	TCA	GGG	TAT	GAT	GAC	AGT	GAT	2810
Arg	Tyr	Ser	Leu	Lys	Lys	Thr	Leu	Asn	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	
		480					485					490				
TGG	ATG	TTC	TAT	AAT	TAT	GGA	TTT	GCA	GTT	GCA	CAT	TAC	CTA	TAT	GAA	2858
Trp	Met	Phe	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Phe	Ala	Val	Ala	His	Tyr	Leu	Tyr	Glu	
	495					500					505					

AAA Lys 510	GAT Asp	ATG Met	CCT Pro	ACA Thr	TTT Phe	ATT Ile	AAG Lys	ATG Met	AAT Asn	AAA Lys	GCT Ala	ATA Ile	TTG Leu	AAT Asn	ACA Thr	2906
					515					520					525	
GAT Asp	GTG Val	AAA Lys	TCT Ser	TAT Tyr	GAT Asp	GAA Glu	ATA Ile	ATA Ile	AAA Lys	AAA Lys	TTA Leu	AGT Ser	GAT Asp	GAT Asp	GCA Ala	2954
				530					535						540	
AAT Asn	AAA Lys	AAT Asn	ACA Thr	GAA Glu	TAT Tyr	CAA Gln	AAC Asn	CAT His	ATT Ile	CAA Gln	GAG Glu	TTA Leu	GTA Val	GAT Asp	AAA Lys	3002
			545					550					555			
TAT Tyr	CAA Gln	GGA Gly	GCT Ala	GGA Gly	CTA Leu	CCT Pro	CTA Leu	GTA Val	TCA Ser	GAT Asp	GAT Asp	TAC Tyr	TTA Leu	AAA Lys	GAT Asp	3050
		560					565					570				
CAT His	GGA Gly	TAT Tyr	AAG Lys	AAA Lys	GCA Ala	TCT Ser	GAA Glu	GTA Val	TAT Tyr	TCT Ser	GAA Glu	ATT Ile	TCA Ser	AAA Lys	GCT Ala	3098
	575					580					585					
GCT Ala	TCT Ser	CTT Leu	ACA Thr	AAC Asn	ACT Thr	AGT Ser	GTA Val	ACA Thr	GCA Ala	GAA Glu	AAA Lys	TCT Ser	CAA Gln	TAC Tyr	TTT Phe	3146
590					595					600					605	
AAC Asn	ACA Thr	TTC Phe	ACT Thr	TTA Leu	AGA Arg	GGA Gly	ACT Thr	TAT Tyr	ACA Thr	GGT Gly	GAA Glu	ACT Thr	TCT Ser	AAA Lys	GGT Gly	3194
				610					615					620		
GAA Glu	TTT Phe	AAA Lys	GAT Asp	TGG Trp	GAT Asp	GAA Glu	ATG Met	AGT Ser	AAA Lys	AAA Lys	TTA Leu	GAT Asp	GGA Gly	ACT Thr	TTG Leu	3242
			625				630						635			
GAG Glu	TCC Ser	CTT Leu	GCT Ala	AAA Lys	AAT Asn	TCT Ser	TGG Trp	AGT Ser	GGA Gly	TAC Tyr	AAA Lys	ACC Thr	TTA Leu	ACA Thr	GCA Ala	3290
		640					645					650				
TAC Tyr	TTT Phe	ACG Thr	AAT Asn	TAT Tyr	AGA Arg	GTT Val	ACA Thr	AGC Ser	GAT Asp	AAT Asn	AAA Lys	GTT Val	CAA Gln	TAT Tyr	GAT Asp	3338
	655					660					665					
GTA Val	GTT Val	TTC Phe	CAT His	GGG Gly	GTT Val	TTA Leu	ACA Thr	GAT Asp	AAT Asn	GGG Gly	GAT Asp	ATT Ile	AGT Ser	AAC Asn	AAT Asn	3386
670				675						680					685	
AAG Lys	GCT Ala	CCA Pro	ATA Ile	GCA Ala	AAG Lys	GTA Val	ACT Thr	GGA Gly	CCA Pro	AGC Ser	ACT Thr	GGT Gly	GCT Ala	GTA Val	GGA Gly	3434
				690					695					700		
AGA Arg	AAT Asn	ATT Ile	GAA Glu	TTT Phe	AGT Ser	GGA Gly	AAA Lys	GAT Asp	AGT Ser	AAA Lys	GAT Asp	GAA Glu	GAT Asp	GGT Gly	AAA Lys	3482
			705				710					715				
ATA Ile	GTA Val	TCA Ser	TAT Tyr	GAT Asp	TGG Trp	GAT Asp	TTT Phe	GGC Gly	GAT Asp	GGT Gly	GCA Ala	ACT Thr	AGT Ser	AGA Arg	GGC Gly	3530
		720					725					730				

AAA AAT TCA GTA CAT GCT TAC AAA AAA GCA GGA ACA TAT AAT GTT ACA	3578
Lys Asn Ser Val His Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Thr Tyr Asn Val Thr	
735 740 745	
TTA AAA GTA ACT GAC GAT AAG GGT GCA ACA GCT ACA GAA AGC TTT ACT	3626
Leu Lys Val Thr Asp Asp Lys Gly Ala Thr Ala Thr Glu Ser Phe Thr	
750 755 760 765	
ATA GAA ATA AAG AAC GAA GAT ACA ACA ACA CCT ATA ACT AAA GAA ATG	3674
Ile Glu Ile Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys Glu Met	
770 775 780	
GAA CCT AAT GAT GAT ATA AAA GAG GCT AAT GGT CCA ATA GTT GAA GGT	3722
Glu Pro Asn Asp Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val Glu Gly	
785 790 795	
GTT ACT GTA AAA GGT GAT TTA AAT GGT TCT GAT GAT GCT GAT ACC TTC	3770
Val Thr Val Lys Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp Thr Phe	
800 805 810	
TAT TTT GAT GTA AAA GAA GAT GGT GAT GTT ACA ATT GAA CTT CCT TAT	3818
Tyr Phe Asp Val Lys Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr	
815 820 825	
TCA GGG TCA TCT AAT TTC ACA TGG TTA GTT TAT AAA GAG GGA GAC GAT	3866
Ser Gly Ser Ser Asn Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly Asp Asp	
830 835 840 845	
CAA AAT CAT ATT GCA AGT GGT ATA GAT AAG AAT AAC TCA AAA GTT GGA	3914
Gln Asn His Ile Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys Val Gly	
850 855 860	
ACA TTT AAA GCT ACA AAA GGA AGA CAT TAT GTG TTT ATA TAT AAA CAC	3962
Thr Phe Lys Ala Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr Lys His	
865 870 875	
GAT TCT GCT TCA AAT ATA TCC TAT TCT TTA AAC ATA AAA GGA TTA GGT	4010
Asp Ser Ala Ser Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly Leu Gly	
880 885 890	
AAC GAG AAA TTG AAG GAA AAA GAA AAT AAT GAT TCT TCT GAT AAA GCT	4058
Asn Glu Lys Leu Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala	
895 900 905	
ACA GTT ATA CCA AAT TTC AAT ACC ACT ATG CAA GGT TCA CTT TTA GGT	4106
Thr Val Ile Pro Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly	
910 915 920 925	
GAT GAT TCA AGA GAT TAT TAT TCT TTT GAG GTT AAG GAA GAA GGC GAA	4154
Asp Asp Ser Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu	
930 935 940	

- 23 -

GTT AAT ATA GAA CTA GAT AAA AAG GAT GAA TTT GGT GTA ACA TGG ACA	4202
Val Asn Ile Glu Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr	
945 950 955	
CTA CAT CCA GAG TCA AAT ATT AAT GAC AGA ATA ACT TAC GGA CAA GTT	4250
Leu His Pro Glu Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val	
960 965 970	
GAT GGT AAT AAG GTA TCT AAT AAA GTT AAA TTA AGA CCA GGA AAA TAT	4298
Asp Gly Asn Lys Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys Tyr	
975 980 985	
TAT CTA CTT GTT TAT AAA TAC TCA GGA TCA GGA AAC TAT GAG TTA AGG	4346
Tyr Leu Leu Val Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg	
990 995 1000 1005	
GTA AAT AAA TAA	4358
Val Asn Lys *	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1009 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Ile Ala Asn Thr Asn Ser Glu Lys Tyr Asp Phe Glu Tyr Leu Asn Gly	
1 5 10 15	
Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Thr Asn Leu Ile Lys Asn Ile Lys Trp Asn	
20 25 30	
Gln Ile Asn Gly Leu Phe Asn Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Lys Phe Phe	
35 40 45	
Gly Asp Lys Asn Arg Val Gln Ala Ile Ile Asn Ala Leu Gln Glu Ser	
50 55 60	
Gly Arg Thr Tyr Thr Ala Asn Asp Met Lys Gly Ile Glu Thr Phe Thr	
65 70 75 80	
Glu Val Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Tyr Asn Asp Gly Leu	
85 90 95	
Ser Tyr Leu Asn Asp Arg Asn Phe Gln Asp Lys Cys Ile Pro Ala Met	
100 105 110	
Ile Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Ala Val Gln	
115 120 125	

- 24 -

Asp	Glu	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Ile	Gly	Asn	Ala	Ser	Ala	
130						135					140					
Asn	Ala	Glu	Val	Val	Asn	Asn	Cys	Val	Pro	Val	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg	
145					150					155					160	
Glu	Asn	Leu	Asn	Gln	Tyr	Ala	Pro	Asp	Tyr	Val	Lys	Gly	Thr	Ala	Val	
				165					170					175		
Asn	Glu	Leu	Ile	Lys	Gly	Ile	Glu	Phe	Asp	Phe	Ser	Gly	Ala	Ala	Tyr	
			180					185					190			
Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Thr	Met	Pro	Trp	Tyr	Gly	Lys	Ile	Asp	Pro	Phe	
		195					200					205				
Ile	Asn	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Tyr	Gly	Asn	Ile	Thr	Ser	Ala	
	210					215					220					
Thr	Glu	Trp	Ala	Ser	Asp	Val	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Lys	Phe	Gly	
225					230					235					240	
Leu	Tyr	Ser	Thr	Asn	Arg	Asn	Asp	Ile	Val	Gln	Ser	Leu	Glu	Lys	Ala	
				245					250					255		
Val	Asp	Met	Tyr	Lys	Tyr	Gly	Lys	Ile	Ala	Phe	Val	Ala	Met	Glu	Arg	
			260					265					270			
Ile	Thr	Trp	Asp	Tyr	Asp	Gly	Ile	Gly	Ser	Asn	Gly	Lys	Lys	Val	Asp	
		275					280					285				
His	Asp	Lys	Phe	Leu	Asp	Asp	Ala	Glu	Lys	His	Tyr	Leu	Pro	Lys	Thr	
	290					295					300					
Tyr	Thr	Phe	Asp	Asn	Gly	Thr	Phe	Ile	Ile	Arg	Ala	Gly	Asp	Lys	Val	
305					310					315					320	
Ser	Glu	Glu	Lys	Ile	Lys	Arg	Leu	Tyr	Trp	Ala	Ser	Arg	Glu	Val	Lys	
				325					330					335		
Ser	Gln	Phe	His	Arg	Val	Val	Gly	Asn	Asp	Lys	Ala	Leu	Glu	Val	Gly	
			340					345					350			
Asn	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Thr	Met	Lys	Ile	Phe	Asn	Ser	Pro	Glu	Glu	
		355					360					365				
Tyr	Lys	Phe	Asn	Thr	Asn	Ile	Asn	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Asn	Gly	Gly	
	370					375					380					
Leu	Tyr	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Thr	Phe	Tyr	Thr	Tyr	Glu	Arg	Thr	Pro	
385					390					395					400	
Gln	Gln	Ser	Ile	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Phe	Arg	His	Glu	Tyr	Thr	
				405					410					415		

- 25 -

His Tyr Leu Gln Ala Arg Tyr Leu Val Asp Gly Leu Trp Gly Gln Gly
 420 425 430
 Pro Phe Tyr Glu Lys Asn Arg Leu Thr Trp Phe Asp Glu Gly Thr Ala
 435 440 445
 Glu Phe Phe Ala Gly Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Leu Pro Arg Lys
 450 455 460
 Ser Ile Leu Gly Tyr Leu Ala Lys Asp Lys Val Asp His Arg Tyr Ser
 465 470 475 480
 Leu Lys Lys Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Asp Asp Ser Asp Trp Met Phe
 485 490 495
 Tyr Asn Tyr Gly Phe Ala Val Ala His Tyr Leu Tyr Glu Lys Asp Met
 500 505 510
 Pro Thr Phe Ile Lys Met Asn Lys Ala Ile Leu Asn Thr Asp Val Lys
 515 520 525
 Ser Tyr Asp Glu Ile Ile Lys Lys Leu Ser Asp Asp Ala Asn Lys Asn
 530 535 540
 Thr Glu Tyr Gln Asn His Ile Gln Glu Leu Val Asp Lys Tyr Gln Gly
 545 550 555 560
 Ala Gly Leu Pro Leu Val Ser Asp Asp Tyr Leu Lys Asp His Gly Tyr
 565 570 575
 Lys Lys Ala Ser Glu Val Tyr Ser Glu Ile Ser Lys Ala Ala Ser Leu
 580 585 590
 Thr Asn Thr Ser Val Thr Ala Glu Lys Ser Gln Tyr Phe Asn Thr Phe
 595 600 605
 Thr Leu Arg Gly Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ser Lys Gly Glu Phe Lys
 610 615 620
 Asp Trp Asp Glu Met Ser Lys Lys Leu Asp Gly Thr Leu Glu Ser Leu
 625 630 635 640
 Ala Lys Asn Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr
 645 650 655
 Asn Tyr Arg Val Thr Ser Asp Asn Lys Val Gln Tyr Asp Val Val Phe
 660 665 670
 His Gly Val Leu Thr Asp Asn Gly Asp Ile Ser Asn Asn Lys Ala Pro
 675 680 685
 Ile Ala Lys Val Thr Gly Pro Ser Thr Gly Ala Val Gly Arg Asn Ile
 690 695 700

- 26 -

Glu	Phe	Ser	Gly	Lys	Asp	Ser	Lys	Asp	Glu	Asp	Gly	Lys	Ile	Val	Ser	705	710	715	720
Tyr	Asp	Trp	Asp	Phe	Gly	Asp	Gly	Ala	Thr	Ser	Arg	Gly	Lys	Asn	Ser	725	730	735	
Val	His	Ala	Tyr	Lys	Lys	Ala	Gly	Thr	Tyr	Asn	Val	Thr	Leu	Lys	Val	740	745	750	
Thr	Asp	Asp	Lys	Gly	Ala	Thr	Ala	Thr	Glu	Ser	Phe	Thr	Ile	Glu	Ile	755	760	765	
Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Thr	Thr	Pro	Ile	Thr	Lys	Glu	Met	Glu	Pro	Asn	770	775	780	
Asp	Asp	Ile	Lys	Glu	Ala	Asn	Gly	Pro	Ile	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Val	785	790	795	800
Lys	Gly	Asp	Leu	Asn	Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Asp	Thr	Phe	Tyr	Phe	Asp	805	810	815	
Val	Lys	Glu	Asp	Gly	Asp	Val	Thr	Ile	Glu	Leu	Pro	Tyr	Ser	Gly	Ser	820	825	830	
Ser	Asn	Phe	Thr	Trp	Leu	Val	Tyr	Lys	Glu	Gly	Asp	Asp	Gln	Asn	His	835	840	845	
Ile	Ala	Ser	Gly	Ile	Asp	Lys	Asn	Asn	Ser	Lys	Val	Gly	Thr	Phe	Lys	850	855	860	
Ala	Thr	Lys	Gly	Arg	His	Tyr	Val	Phe	Ile	Tyr	Lys	His	Asp	Ser	Ala	865	870	875	880
Ser	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Leu	Asn	Ile	Lys	Gly	Leu	Gly	Asn	Glu	Lys	885	890	895	
Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Asn	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Ile	900	905	910	
Pro	Asn	Phe	Asn	Thr	Thr	Met	Gln	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Asp	Asp	Ser	915	920	925	
Arg	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Glu	Val	Lys	Glu	Glu	Gly	Glu	Val	Asn	Ile	930	935	940	
Glu	Leu	Asp	Lys	Lys	Asp	Glu	Phe	Gly	Val	Thr	Trp	Thr	Leu	His	Pro	945	950	955	960
Glu	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Gln	Val	Asp	Gly	Asn	965	970	975	
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Val	Lys	Leu	Arg	Pro	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Leu	Leu	980	985	990	

Val Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Val Asn Lys
995 1000 1005

*

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 110 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Lys Lys Asn Ile Leu Lys Ile Leu Met Asp Ser Tyr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Ile Gln Thr Val Arg Arg Val Thr Ser Val Ser Leu Leu Ala
20 25 30

Ala Tyr Leu Thr Met Asn Thr Ser Ser Leu Val Leu Ala Lys Pro Ile
35 40 45

Glu Asn Thr Asn Asp Thr Ser Ile Lys Asn Val Glu Lys Leu Arg Asn
50 55 60

Ala Pro Asn Glu Glu Asn Ser Lys Lys Val Glu Asp Ser Lys Asn Asp
65 70 75 80

Lys Val Glu His Val Lys Asn Ile Glu Glu Ala Lys Val Glu Gln Val
85 90 95

Ala Pro Glu Val Lys Ser Lys Ser Thr Leu Arg Ser Ala Ser
100 105 110

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- 28 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Phe Asn Ser Pro Glu Glu Tyr
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

TTYAAYWSNC CNGARGARTA Y

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

RTAYTCYTCN GGNSWRTTRA A

21

- 29 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GARGAYGGNG AYG TNACNAT T

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

DATNGTNACR TCNCCRTCYT C

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Asp Trp Asp Glu Met Ser Lys

1

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Val Thr Gly Pro Ser Thr Gly Ala Val Gly Arg Asn Ile Glu Phe Ser
1 5 10 15
Gly Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Asn Thr Glu Tyr Gln Asn His Ile Gln Glu Leu Val Asp Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser Ser Asn
1 5 10 15
Phe Thr Trp Leu Val Tyr
20

- 31 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gln	Phe	Arg	Glu	Asn	Leu	Asn	Gln	Tyr	Ala	Pro	Asp	Tyr	Val	Lys
1				5				10					15	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

AGACAATGCC TTGGTATGG

19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

GTGAAAGTTT CTATACCCTT C

21

- 32 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

GTACAGGTTC TCAAAAGTTC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

GTTTCCTTTAA CGTAATCAGG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Ile Ala Asn Thr Asn Ser Glu Lys
1 5

- 33 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Met	Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Arg	Ala	Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Leu	Lys
1				5					10					15	
Ile Leu															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Met	Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Arg	Ala	Met	Asp	Ser	Tyr	Ser	Lys	Glu
1				5					10					15	
Ser Lys															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- 34 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Met	Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Arg	Ala	Met	Lys	Asn	Ile	Glu	Glu	Ala
1				5					10					15	
Lys Val															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

TTCCCAATTG CCCGGGCTAT GAAAAATATA GAAGAGGCAA AG

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Ala	Tyr	Leu	Thr	Met	Asn	Thr	Ser
1				5			

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Polypeptid mit den Eigenschaften einer Collagenase Class I aus *Clostridium histolyticum* (CHC I) und der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2, welche gegebenenfalls N-terminal um eine oder mehrere Aminosäuren der Sequenz SEQ ID NO:3 verlängert ist.
2. Polypeptid nach Anspruch 1, für welches die codierende Nukleinsäure mit Nukleotid 1002, 1029, 1110, 1176 oder 1254 von SEQ ID NO: 1 beginnt.
3. Nukleinsäure, welche für ein Polypeptid mit den Eigenschaften einer Collagenase Class I aus *Clostridium histolyticum* (CHC I) mit SEQ ID NO:2, welche gegebenenfalls um eine oder mehrere Aminosäuren von SEQ ID NO:3 am N-Terminus verlängert ist, codiert.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 3, welche mit Nukleotid 1002, 1029, 1110, 1176 oder 1254 von SEQ ID NO:1 beginnt.
5. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids mit den Eigenschaften einer Collagenase Class I aus *Clostridium histolyticum* (CHC I) durch Expression einer exogenen Nukleinsäure in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen und Isolierung des gewünschten Peptids, wobei die Nukleinsäure für ein Polypeptid mit der SEQ ID NO:2 oder für ein Polypeptid, welches N-terminal um eine oder mehrere Aminosäuren der SEQ ID NO:3 verlängert ist, codiert.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure mit Nukleotid 1002, 1029, 1110, 1176 oder 1254 von SEQ ID NO:1 beginnt.
7. Verwendung eines Polypeptids nach den Ansprüchen 1 oder 2 zur Isolierung von Zellen aus Gewebe von Säugetieren und aus Humangewebe.

Fig. 1

