



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 622 T2** 2006.08.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 687 296 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 622.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE94/00160**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 909 373.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/020610**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.02.1994**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **15.09.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.12.1995**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **08.02.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/20** (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9300686 **01.03.1993** **SE**

9300722 **04.03.1993** **SE**

(73) Patentinhaber:

Arexis AB, Göteborg, SE

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**BLÄCKBERG, Lars, S-902 44 Umeå, SE; EDLUND,
Michael, S-906 42 Umeå, SE; HANSSON, Lennart,
S-902 37 Umeå, SE; HERNELL, Olle, S-907 42
Umeå, SE; LUNDBERG, Lennart, S-427 36 Billdal,
SE; STRÖMQVIST, Mats, S-904 35 Umeå, SE;
TÖRNELL, Jan, S-421 59 Västra Frölunda, SE**

(54) Bezeichnung: **VARIANTEN DER GALLENÄURE-STIMULIERTEN LIPASE, DNA DIE DAFÜR KODIERT, UND
TRANSGENE NICHT-HUMANE SÄUGETIERE**

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

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Polypeptide, welche Varianten von Gallensalzstimulierter Lipase bzw. "Bile Salt-Stimulated Lipase" (BSSL; EC 3.1.1.1) sind. Sie betrifft ebenfalls Nukleinsäuremoleküle, welche die Polypeptide codieren, und Unterprodukte, welche die DNA-Moleküle umfassen. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung der BSSL-Varianten und zur Herstellung von transgenen nicht-menschlichen Säugetieren, die zur Expression der BSSL-Varianten in der Lage sind. Darüber hinaus betrifft die Erfindung derartige transgene Tiere sowie Kleinkind-Formulierungen, umfassend Milch, welche die Polypeptide aus solchen transgenen Tieren umfasst. Die Erfindung betrifft des Weiteren pharmazeutische Zusammensetzungen, welche die Polypeptide umfassen; sowie die Verwendung der Polypeptide und DNA-Moleküle für die Herstellung von Medikamenten.

TECHNISCHER HINTERGRUND

Hydrolyse von Lipiden in der Nahrung

[0002] Lipide in der Nahrung sind eine wichtige Energiequelle. Die energiereichen Triacylglycerole machen mehr als 95 % dieser Lipide aus. Einige der Lipide, z.B. bestimmte Fettsäuren und die fettlöslichen Vitamine, sind essentielle Nahrungsbestandteile. Vor der gastrointestinalen Absorption erfordern die Triacylglycerole wie auch die Nebenkompanten, d. h. veresterte fettlösliche Vitamine und Cholesterol, sowie Diacylphosphatidylglycerole, eine Hydrolyse der Esterbindungen, um weniger hydrophobe absorbierbare Produkte entstehen zu lassen. Diese Reaktionen werden von einer spezifischen Gruppe von Enzymen katalysiert, welche Lipasen genannt werden.

[0003] Im Menschen wird angenommen, dass die wesentlichen beteiligten Lipasen Magen-Lipase, Pankreatische Colipase-abhängige Lipase (Hydrolyse von Tri- und Diacylglycerolen), Pankreatische Phospholipase A2 (Hydrolyse von Diacylphosphatidylglycerolen) und Carbonsäureester-Hydrolase (CEH) (Hydrolyse von Cholesteryl- und fettlöslichen Vitamin-Estern, aber auch Tri-, Di- und Monoacylglycerolen) sind. Im an der Brust gestillten Neugeborenen spielt Gallensalz-stimulierte Lipase (BSSL) eine wesentliche Rolle in der Hydrolyse von mehreren der obenstehend erwähnten Lipiden. Zusammen mit Gallensalzen bilden die Produkte aus dem Lipidverdau gemischte Mizellen oder unilamellare Vesikel (Hernell et al., 1990), aus welchen die Absorption stattfindet.

Gallensalz-stimulierte Lipase

[0004] Gallensalz-stimulierte Lipase (BSSL) ist ein Bestandteil von Milch in einer begrenzten Anzahl von Spezies, z.B. Menschen, Gorillas, Katzen und Hunde (Hernell et al., 1989, Hamosh et al., 1986). Bei Vermischung mit Gallen im Inhalt des oberen Dünndarms wird BSSL spezifisch durch primäre Gallensalze aktiviert (Hernell, 1975). BSSL, welche ungefähr 1 % des Gesamtmilchproteins ausmacht (Bläckberg & Hernell, 1981), wird nicht während der Passage mit der Milch durch den Magen abgebaut, und sie wird im Duodenum-Inhalt durch Gallensalze vor einer Inaktivierung durch pankreatische Proteasen, wie Trypsin und Chymotrypsin, geschützt.

[0005] Eine Wärmebehandlung von menschlicher Milch (Pasteurisierung bei 62,5 °C, 30 Minuten), welche BSSL vollständig inaktiviert (Björkstén et al., 1980), verringert den Koeffizienten der Fettabsorption um ungefähr ein Drittel in zu früh geborenen Kleinkindern (Williamson et al., 1978, Atkinson et al., 1981). Somit ist die überlegene Verwertung von frischem Menschenmilch-Triacylglycerol, im Vergleich zu derjenigen von Formulierungen bzw. Zubereitungen für Kleinkinder mit ähnlicher Fettzusammensetzung, auf BSSL zurückzuführen (Hernell et al., 1991, Chapel et al., 1986).

[0006] BSSL ist eine nicht-spezifische Lipase (EC 3.1.1.1) dahingehend, dass sie nicht nur Triacylglycerol sondern auch Di- und Monoacylglycerol, Cholesterylester und fettlösliche Vitaminester hydrolysiert (Bläckberg & Hernell, 1983). Nach der Aktivierung besitzt BSSL somit das Potenzial, die meisten menschlichen Milchlipide von sich aus zu hydrolysieren, obwohl die wirkungsvollste Verwertung von Triacylglycerol aus menschlicher Milch die synergistische Wirkung von Magen-Lipase (EC 3.1.1.3), Colipase-abhängiger pankreatischer Lipase (EC 3.1.1.3) und BSSL erfordert (Bernbäck et al., 1990).

[0007] Jüngere Untersuchungen legten nahe, dass das Milchenzym von besonderer Bedeutung für die Verwertung langkettiger mehrfach-ungesättigter Fettsäuren durch das neugeborene Kleinkind ist (Hernell et al.,

1993). Diese Fettsäuren sind wichtige Vorläufer von Eicosanoiden und für die Neuronen-Entwicklung. Neugeborene Kleinkinder, insbesondere im Falle von Frühgeburten, besitzen eine beschränkte Kapazität für die Synthese dieser Fettsäuren aus ihren Vorläufern. Somit werden sie für eine noch nicht definierte Zeitdauer nach der Geburt als essentiell angesehen.

[0008] In jüngeren Untersuchungen aus mehreren Laboratorien sind die cDNA-Strukturen sowohl der Milchlipase als auch der Pankreas-Carbonsäureester-Hydrolase (CEH) (E.C. 3.1.1.1) charakterisiert worden (Baba et al., 1991; Hui et al., 1991; Nilsson et al., 1990; Reue et al., 1991), und die Schlussfolgerung besteht darin, dass das Milchenzym und das Pankreasenzym Produkte desselben Gens sind. Die cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des BSSL/CEH-Gens (SEQ ID Nr.: 1) werden ebenfalls offenbart in WO 91/15234 (Oklahoma Medical Research Foundation) und in WO 91/18923 (Aktiebolaget Astra).

[0009] BSSL ist ein einzelkettiges Glycoprotein. Das abgeleitete Protein (SEQ ID Nr.: 3) enthält 722 Aminosäurereste und ist in hohem Maße glycosyliert (Abouakil et al., 1989). Die N-terminale Hälfte des Proteins zeigt eine erstaunliche Homologie zu Acetylcholinesterase und einigen anderen Esterasen (Nilsson et al., 1990).

[0010] Ein vermeintlicher Aktive-Stelle-Serinrest liegt am Serin-194; die Sequenz um dieses Serin herum stimmt mit der Konsensussequenz der aktiven Stelle von Serin-Hydrolasen überein. Die einzelne vermeintliche N-Glycosylierungs-Stelle ist nur sieben Reste N-terminal zum Aktive-Stelle-Serin positioniert (Nilsson et al., 1990).

[0011] Die BSSL-Sequenz enthält in ihrem C-terminalen Teil 16 prolinreiche Wiederholungen bzw. Repeats von jeweils 11 Aminosäureresten. Eine Variation in der Anzahl an Wiederholungen scheint eine Hauptklärung für die Unterschiede in der molekularen Größe und Aminosäurezusammensetzung zwischen entsprechenden Enzymen aus unterschiedlichen Spezies zu sein (Han et al., 1987, Fontaine et al., 1991, Kyger et al., 1989). Diese Wiederholungen tragen den Großteil der 15-20 % an Kohlenhydrat des Proteins (Baba et al., 1991, Abouakil et al., 1989).

[0012] Die einzigartige Strukturdifferenz zwischen BSSL und typischen Esterasen liegt im C-terminalen Teil der Polypeptidkette, d. h. den 16 prolinreichen Wiederholungen von 11 Aminosäureresten. Die entsprechenden pankreatischen Enzyme aus der Kuh und der Ratte besitzen nur 3 bzw. 4 Wiederholungen (Han et al., 1987, Kyger et al., 1989). Eine wahrscheinliche Hypothese bestand deshalb darin, dass der C-terminale Teil, oder wenigstens ein Bereich davon, für die Lipaseaktivität, d. h. Aktivität gegenüber emulgiertem langkettigen Triacylglycerol, unverzichtbar ist.

Mangelhafte Lipid-Absorption

[0013] Übliche Ursachen von Lipid-Mangelabsorption und folglich Unterernährung, sind verringerte intraluminale Spiegel an Pankreatischer Colipase-abhängiger Lipase und/oder Gallensalzen. Typische Beispiele eines solchen Lipasemangels sind Patienten, welche unter cystischer Fibrose, einer häufigen genetischen Erkrankung, welche zu einem lebenslangen Mangel in 80 % der Patienten führt, und chronischer Pankreatitis, oftmals wegen chronischem Alkoholismus, leiden.

[0014] Die derzeitige Behandlung von Patienten, welche unter einem Mangel an pankreatischer Lipase leiden, ist die orale Verabreichung von sehr hohen Dosierungen einer rohen Präparation von Schweine-Pankreasenzymen. Allerdings wird Colipase-abhängige Pankreatische Lipase durch den niedrigen pH-Wert inaktiviert, der im Magen vorherrscht. Dieser Effekt kann durch die Verwendung von großen Dosen an Enzym nicht vollständig überwunden werden. Somit sind die verabreichten großen Dosierungen für die meisten Patienten unangemessen, und darüber hinaus sind die Präparationen unrein und übel schmeckend.

[0015] Es sind bestimmte Tabletten formuliert worden, welche durch die sauren Regionen des Magens hindurchwandern und das Enzym nur in der verhältnismäßig alkalischen Umgebung des Jejunums abgeben. Allerdings besitzen viele Patienten, welche unter pankreatischen Erkrankungen leiden, ein abnormal saures Jejunum, und in diesen Fällen können die Tabletten darin versagen, das Enzym abzugeben.

[0016] Darüber hinaus besteht, da die derzeit auf dem Markt befindlichen Präparationen von einer nicht-menschlichen Herkunft sind, eine Gefahr für Immunreaktionen, welche schädliche Auswirkungen auf die Patienten auslösen oder zu einer verringerten Therapieeffizienz führen können. Ein weiterer Nachteil bei den derzeitigen Präparationen ist, dass ihr Gehalt an von Colipase-abhängiger Lipase verschiedenen lipolytischen Aktivitäten nicht angegeben wird. Tatsächlich enthalten die meisten von ihnen sehr niedrige Spiegel an

BSSL/CEH-Aktivität. Dies kann ein Grund sein, warum viele Patienten, welche unter cystischer Fibrose leiden, trotz einer Ergänzungstherapie unter Mangelerscheinungen an fettlöslichen Vitaminen und essentiellen Fettsäuren leiden.

[0017] Somit besteht ein großer Bedarf nach Produkten mit Eigenschaften und einer Struktur, welche aus humanen Lipasen abgeleitet sind, und mit einer breiten Substratspezifität, wobei die Produkte oral an Patienten verabreicht werden können, welche unter einem Mangel an einem oder mehreren der pankreatischen lipolytischen Enzyme leiden. Produkte, welche aus der Anwendung der vorliegenden Erfindung abgeleitet werden können, erfüllen diese Notwendigkeit von sich selbst aus oder in Kombination mit Präparationen, die andere Lipasen enthalten.

KURZE BESCHREIBUNG DES ERFINDUNGSKONZEPTEES

[0018] Rekombinante BSSL-Varianten gemäß der Erfindung behielten katalytische Aktivität, aber enthalten weniger Glycosylierungsstellen als Vollängen-BSSL und werden daher mit einem potenziell verringerten Grad an Kohlenhydrat-Heterogenität hergestellt. Diese verminderte Komplexität erleichtert die Reinigung und Charakterisierung des rekombinanten Proteins, was zu einer kostengünstigeren Herstellung von Polypeptiden mit BSSL-Aktivität führen wird.

[0019] In einem anderen Aspekt ist der verringerte Glycosylierungsgrad für den Wirt weniger beanspruchend und gestattet eine höhere Produktion in mehreren Wirtszellen. In noch einem anderen Aspekt gestattet die reduzierte Anzahl an Glycosylierungsstellen in einer BSSL-Variante eine effiziente Produktion in niederen Eukaryoten und begrenzt das potenzielle Risiko einer abweichenden Glycosylierung, welche immunologische Reaktionen hervorrufen kann. Die verringerte Größe und weniger komplexe Glycosylierung bringen ebenfalls mit sich, dass das Wirtsspektrum breiter ist als für ein Protein mit sehr komplexen und schweren Kohlehydratresten.

[0020] Die therapeutische Verwendung einer BSSL-Variante, welche von geringerer Größe ist, aber gleich aktiv ist, bedeutet, dass das Gewicht der Substanz, welches zur Supplementierung benötigt wird, vermindert wird. Ein weiterer möglicher Vorteil mit einer rekombinanten BSSL-Variante, der die meisten oder alle der O-glycosylierten Wiederholungen fehlen, ist eine verringerte Gefahr für eine immunologische Antwort in dem Empfängerindividuum. Dies beruht auf der Tatsache, dass der O-verknüpfte Zucker, abhängig von der Zelle, in der er hergestellt wird, sehr heterogen sein kann.

[0021] Es gibt Angaben in der wissenschaftlichen Literatur, dass natives BSSL an die Darmschleimhaut bindet und von ihr aufgenommen wird. Eine BSSL-Variante, welche hinsichtlich des Aufweisens einer verringerten Aufnahme selektiert wurde, wird während einer längeren Zeitdauer auf die Nahrungs-Lipidsubstrate einwirken, was zu einer effizienteren intraluminalen Verdauung führt. Beispiele derartiger Varianten sind Moleküle mit verringerter Glycosylierung.

[0022] Wie oben stehend erwähnt, ist vorgeschlagen worden, dass BSSL eine besondere Bedeutung für die Verwertung von langkettigen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (Hernell et al., 1993), die von großer Bedeutung für die Neuronenentwicklung des neugeborenen Kleinkindes sind, und von Vitamin A besitzt. Eine BSSL-Variante gemäß der Erfindung, welche in diesen Hinsichten wirksamer ist, kann durch bekannte Verfahren ausgewählt werden. Es ist wahrscheinlich, dass ein trunkiertes oder verkürztes Enzym in Hinsicht auf die Konformation unterschiedlich ist, was die Spezifität gegenüber verschiedenen Lipidsubstraten beeinflussen kann.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0023] In einem Aspekt betrifft die Erfindung ein Nukleinsäuremolekül, codierend ein Polypeptid mit einer Gallensalz-aktivierten hydrolytischen Aktivität gegenüber langkettigem Triacylglycerol, wobei das Polypeptid eine BSSL-Variante ist, die dahingehend kürzer als das native, 722 Aminosäuren große Vollängen-BSSL-Polypeptid ist, dass sie nur einen Teil der Aminosäuresequenz, gezeigt als Reste 536-722 in SEQ ID Nr.: 3, umfasst, und wobei die BSSL-Variante weniger als 16 Wiederholungseinheiten umfasst, wobei der Begriff "Wiederholungseinheit" eine der wiederkehrenden Einheiten von je 33 Nukleotiden bezeichnet, welche in SEQ ID Nr.: 1 in der Sequenzaufzählung angegeben sind.

[0024] Der Begriff "Teil der Aminosäuresequenz" soll so verstanden werden, dass er eine einzelne Aminosäure sowie eine Sequenz von mehreren Aminosäuren oder mehrere derartige Sequenzen in Kombination um-

fasst.

[0025] Der Begriff "BSSL-Variante" soll als ein Polypeptid verstanden werden, welches BSSL-Aktivität aufweist und einen Teil der Aminosäuresequenz von humaner BSSL, gezeigt als SEQ ID Nr.: 3 in der Sequenzaufzählung, umfasst.

[0026] Der Begriff "Polypeptid, aufweisend BSSL-Aktivität" versteht sich als ein Polypeptid, das wenigstens die folgenden Eigenschaften umfasst:

- (a) geeignet für orale Verabreichung;
- (b) aktiviert durch spezifische Gallensalze;
- (c) wirkend als eine nicht-spezifische Lipase im Inhalt des Dünndarms, d. h. Fähigkeit, Lipide verhältnismäßig unabhängig von ihrer chemischen Struktur und ihres physikalischen Zustands (emulgiert, mizellar, löslich) zu hydrolysieren;
- und gegebenenfalls eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften
- (d) Fähigkeit zum Hydrolysieren von Triacylglycerolen mit Fettsäuren von verschiedener Kettenlänge und verschiedenem Ungesättigtheits-Grad;
- (e) Fähigkeit zum Hydrolysieren auch von Diacylglycerol, Monoacylglycerol, Cholesterylestern, Lysophosphatidylacylglycerol und Retinyl- und anderen fettlöslichen Vitamin-Estern;
- (f) Fähigkeit zum Hydrolysieren nicht nur der sn-1(3)-Esterbindungen in einem Triacylglycerol, sondern ebenfalls der sn-2-Esterbindung;
- (g) Fähigkeit zum Wechselwirken mit nicht nur primären sondern auch sekundären Gallensalzen;
- (h) abhängig von Gallensalzen für optimale Aktivität;
- (i) stabil, in dem Sinn, dass der Mageninhalt die katalytische Effizienz nicht in irgendeinem wesentlichen Ausmaß beeinflussen wird;
- (j) stabil gegenüber Inaktivierung durch pankreatische Proteasen, z.B. Trypsin, vorausgesetzt, dass Gallensalze vorhanden sind;
- (k) Fähigkeit zur Bindung an Heparin und Heparinderivate, z.B. Heparansulfat;
- (l) Fähigkeit zum Binden an Lipid-Wasser-Interphasen;
- (m) stabil genug, um eine Lyophilisierung zu gestatten;
- (n) stabil bei Vermischung mit Nahrungsbestandteilen, wie in menschlicher Milch oder Milch-Formulierung.

[0027] In weiteren Aspekten betrifft die Erfindung ein Nukleinsäuremolekül gemäß dem oben Genannten, wobei die BSSL-Variante einen Phenylalaninrest in ihrer C-terminalen Position aufweist oder die Sequenz Gln-Met-Pro in ihrem C-terminalen Teil umfasst, wobei sie alternativ dazu die Aminosäuresequenz, gezeigt als Reste 712 – 722 in SEQ ID Nr.: 3, in ihrem C-terminalen Teil umfasst.

[0028] Im vorliegenden Zusammenhang bezeichnet der Begriff "C-terminale Position" die Position des letzten C-terminalen Rests, wohingegen der Begriff "C-terminaler Teil" verstanden werden soll als die ungefähr 50 Aminosäurereste, welche das C-terminale Ende der BSSL-Variante bilden.

[0029] Die Erfindung betrifft ferner ein Nukleinsäuremolekül gemäß dem oben stehenden, worin die BSSL-Variante weniger als 16 Wiederholungseinheiten umfasst, wobei der Begriff "Wiederholungseinheit" eine der wiederkehrenden Einheiten von je 33 Nukleotiden bezeichnet, welche in SEQ ID Nr.: 1 in der Sequenzaufzählung angegeben sind.

[0030] In weiteren Aspekten betrifft die Erfindung ein Nukleinsäuremolekül gemäß des oben stehenden, welches ein Polypeptid codiert, dessen Aminosäuresequenz zu wenigstens 90 % homolog mit der Aminosäuresequenz ist, die als SEQ ID Nr.: 5, 6 oder 9 in der Sequenzaufzählung gezeigt ist.

[0031] Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Polypeptid, gezeigt als SEQ ID Nr.: 5, 6, 7 oder 9 in der Sequenzaufzählung, sowie ein Polypeptid, codiert von einer Nukleinsäuresequenz gemäß des Obenstehenden.

[0032] Die Erfindung betrifft ferner ein Hybridgen, umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß des oben Genannten, einen replizierbaren Expressionsvektor, umfassend ein solches Hybridgen, und eine Zelle, welche ein solches Hybridgen beherbergt. Diese Zelle kann eine prokaryotische Zelle, ein einzelliger eukaryotischer Organismus oder eine Zelle sein, welche aus einem vielzelligen Organismus, z.B. einem Säuger, abgeleitet ist.

[0033] Im vorliegenden Kontext bezeichnet der Ausdruck "Hybridgen" eine Nukleinsäuresequenz, einerseits umfassend eine Nukleinsäuresequenz, codierend eine BSSL-Variante, wie oben stehend definiert, und andererseits eine Nukleinsäuresequenz des Gens, welche zur Vermittlung der Expression des Hybridgenprodukts

in der Lage ist. Der Begriff "Gen" bezeichnet ein gesamtes Gen sowie eine Teilsequenz davon, fähig zur Vermittlung und Lenkung der Expression des Hybridgens auf das Gewebe von Interesse. Normalerweise ist die Teilsequenz eine solche, welche mindestens eines oder mehrere aus einer Promotorregion, einer Transkriptionsstartstelle, nicht-codierenden 3'- und 5'-Regionen und Struktursequenzen beinhaltet.

[0034] Das Hybridgen wird vorzugsweise durch in-vitro-Inserieren der die BSSL-Variante codierenden Nukleinsäuresequenz in das Gen, welches zur Vermittlung der Expression in der Lage ist, durch Anwendung von im Fachgebiet bekannten Techniken gebildet. Alternativ dazu kann die Nukleinsäuresequenz, welche die BSSL-Variante codiert, in vivo mittels homologer Rekombination inseriert werden.

[0035] Im vorliegenden Zusammenhang bedeutet der Begriff "replizierbar", dass der Vektor fähig ist, in einem gegebenen Typ von Wirtszelle zu replizieren, in welche er eingebracht worden ist. Unmittelbar stromaufwärts der Nukleinsäuresequenz kann eine Sequenz vorgesehen sein, die ein Signalpeptid codiert, dessen Gegenwart die Sekretion der BSSL-Variante gewährleistet, welche von Wirtszellen, die den Vektor beinhalten, exprimiert wird. Die Signalsequenz kann diejenige sein, welche natürlicherweise mit der Nukleinsäuresequenz assoziiert ist, oder von anderer Herkunft sein.

[0036] Der Vektor kann ein beliebiger Vektor sein, welcher zweckmäßig rekombinanten DNA-Vorgehensweisen unterzogen werden kann, und die Auswahl des Vektors wird häufig von der Wirtszelle abhängen, in welche er eingebracht werden soll. Somit kann der Vektor ein autonom replizierender Vektor sein, d. h. ein Vektor, der als eine extrachromosomale Einheit existiert, deren Replikation unabhängig von der Chromosomenreplikation ist; Beispiele eines derartigen Vektors sind ein Plasmid, Phage, Cosmid, Mini-Chromosom oder Virus. Alternativ dazu kann der Vektor ein solcher sein, der bei Einbringung in eine Wirtszelle in das Wirtszellgenom integriert und zusammen mit den Chromosom(en) repliziert wird, in welche(s) er integriert worden ist. Beispiele für geeignete Vektoren sind ein bakterieller Expressionsvektor und ein Hefeexpressionsvektor. Der Vektor der Erfindung kann eine beliebige der Nukleinsäuresequenzen der Erfindung, wie oben definiert, tragen.

[0037] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren für die Herstellung eines rekombinanten Polypeptids, wobei das Verfahren folgendes umfasst: (i) Wachsenlassen einer Wirtszelle in oder auf einem Kulturmedium, in welche ein Nukleinsäuremolekül gemäß des Obenstehenden in einem Hybridgen eingebracht worden ist, welches zum Replizieren in einer spezifischen Wirtszelle in der Lage ist, oder Identifizieren und Reproduzieren eines Organismus, in welchen ein Nukleinsäuremolekül gemäß des oben Genannten in einem Hybridgen, welches fähig zum Replizieren in dem spezifischen Organismus ist, eingebracht worden ist, (ii) Exprimieren des Polypeptids; und (iii) Rückgewinnen des Polypeptids.

[0038] Das zur Aufzucht der Zellen verwendete Medium kann ein beliebiges herkömmliches Medium sein, das für den Zweck geeignet ist. Ein geeigneter Vektor kann ein beliebiger der obenstehend beschriebenen Vektoren sein, und eine passende Wirtszelle kann von einem beliebigen der obenstehend aufgelisteten Zelltypen sein. Die Verfahren, welche zum Konstruieren des Vektors und zur Bewirkung von dessen Einbringung in die Wirtszelle angewandt werden, können jedwede für derartige Zwecke bekannte Verfahren innerhalb des Gebiets der rekombinanten DNA sein. Die von den Zellen exprimierte, rekombinante humane BSSL-Variante kann sezerniert, d. h. über die Zellmembran exportiert werden, abhängig vom Typ der Zelle und der Zusammensetzung des Vektors.

[0039] Wenn die BSSL-Variante von dem rekombinanten Wirt intrazellulär produziert wird, d. h. nicht von der Zelle sezerniert wird, kann sie durch Standardvorgehen, umfassend das Zellaufbrechen durch mechanische Mittel, z.B. Schallbehandlung oder Homogenisierung, oder durch enzymatische oder chemische Mittel, gefolgt von der Aufreinigung, gewonnen werden.

[0040] Um sezerniert zu werden, sollte der DNA-Sequenz, welche die BSSL-Variante codiert, eine Sequenz vorangehen, die ein Signalpeptid codiert, dessen Gegenwart die Sekretion der BSSL-Variante aus den Zellen gewährleistet, so dass wenigstens ein signifikanter Anteil der exprimierten BSSL-Variante in das Kulturmedium sezerniert und gewonnen wird.

[0041] Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Expressionssystem, umfassend ein Hybridgen, welches in einer Wirtszelle oder einem Organismus exprimierbar ist, die/der das Hybridgen beinhaltet, so dass ein rekombinantes Polypeptid hergestellt wird, wenn das Hybridgen exprimiert wird, wobei das Hybridgen durch Inserieren einer Nukleinsäuresequenz gemäß dem oben Genannten in ein Gen, welches zur Vermittlung der Expression des Hybridgens in der Lage ist, hergestellt wird.

[0042] Ein mögliches Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten BSSL-Variante der Erfindung erfolgt durch die Verwendung von transgenen nicht-menschlichen Säugetieren, die zum Absondern der BSSL-Variante in ihre Milch in der Lage sind. Die Verwendung von transgenen nicht-menschlichen Säugetieren besitzt den Vorteil, dass große Ausbeuten an der rekombinanten BSSL-Variante bei vernünftigen Kosten erhältlich sind und dass, speziell wenn das nicht-menschliche Säugetier eine Kuh ist, die rekombinante BSSL-Variante in Milch hergestellt wird, welche der normale Bestandteil z.B. von Kleinkind-Formulierungen ist, so dass keine umfangreiche Aufreinigung benötigt wird, wenn die rekombinante BSSL-Variante als eine Nährstoff-Ergänzung in Produkten auf Milchbasis verwendet werden soll.

[0043] Weiterhin führt die Produktion in einem höheren Organismus, wie einem nicht-menschlichen Säugetier, normalerweise zur korrekten Prozessierung des Säuger-Proteins, z.B. bezüglich der post-translationalen Prozessierung, wie oben stehend erörtert, und zu einer korrekten Faltung. Auch können große Mengen einer im Wesentlichen reinen BSSL-Variante erhalten werden.

[0044] Folglich kann es sich bei dem Expressionssystem, auf das oben Bezug genommen wurde, um ein Säugetier-Expressionssystem handeln, umfassend eine für eine BSSL-Variante codierende DNA-Sequenz, welche in ein Gen inseriert ist, das ein Milchprotein eines nicht-menschlichen Säugetiers codiert, so dass ein Hybridgen gebildet wird, welches in der Brustdrüse eines erwachsenen Weibchens eines Säugetiers, welches das Hybridgen beherbergt, exprimierbar ist.

[0045] Die Brustdrüse als ein Gewebe zur Expression und Milchproteine codierende Gene werden im Allgemeinen als besonders geeignet zur Verwendung in der Herstellung von heterologen Proteinen in transgenen nicht-menschlichen Säugetieren angesehen, weil Milchproteine natürlicherweise bei hohen Expressionsspiegeln in der Brustdrüse produziert werden. Des Weiteren wird Milch leicht aufgefangen und ist in großen Mengen verfügbar. Im vorliegenden Zusammenhang besitzt die Verwendung von Milchprotein-Genen bei der Herstellung einer rekombinanten-BSSL-Variante den weiteren Vorteil, dass sie unter zu ihren natürlichen Herstellungsbedingungen ähnlichen Bedingungen bezüglich der Regulierung von Expression und der Produktionslokalisierung (der Brustdrüse) hergestellt wird.

[0046] Bei Verwendung in einem transgenen Säugetier umfasst das Hybridgen, auf welches oben stehend Bezug genommen wurde, vorzugsweise eine Sequenz, codierend ein Signalpeptid, so dass es ermöglicht wird, dass das Hybridgenprodukt korrekt in die Brustdrüse sezerniert wird. Das Signalpeptid wird typischerweise dasjenige sein, welches normalerweise in dem betreffenden Milchprotein-Gen gefunden wird, oder ein solches, welches mit der DNA-Sequenz assoziiert ist, welche die BSSL-Variante codiert. Allerdings sind auch andere Signalsequenzen relevant, welche zur Vermittlung der Sekretion des Hybridgenprodukts zu der Brustdrüse in der Lage sind. Selbstverständlich sollten die verschiedenen Elemente des Hybridgens auf eine solche Weise fusioniert werden, dass die korrekte Expression und Prozessierung des Genprodukts ermöglicht wird. Daher sollte normalerweise die DNA-Sequenz, welche das Signalpeptid der Wahl codiert, präzise an den N-terminalen Teil der DNA-Sequenz fusioniert werden, welche die BSSL-Variante codiert. In dem Hybridgen wird die DNA-Sequenz, welche die BSSL-Variante codiert, normalerweise ihr Stopp-Codon, jedoch nicht ihre eigene Message-Spaltungs- und Polyadenylierungs-Stelle umfassen. Stromabwärts der DNA-Sequenz, welche die BSSL-Variante codiert, werden normalerweise die mRNA-Prozessierungssequenzen des Milchprotein-Gens beibehalten werden.

[0047] Eine Reihe von Faktoren werden als für den tatsächlichen Expressionsspiegel eines jeweiligen Hybridgens verantwortlich in Erwägung gezogen. Das Vermögen des Promotors sowie anderer regulatorischer Sequenzen, wie oben stehend erwähnt, die Integrationsstelle des Expressionssystems im Genom des Säugetiers, die Integrationsstelle der DNA-Sequenz, welche die BSSL-Variante codiert, in dem Milchprotein-codierenden Gen, Elemente, die posttranskriptionale Regulation vermitteln, und andere ähnliche Faktoren können von entscheidender Bedeutung für den erhaltenen Expressionsspiegel sein. Auf der Basis der Kenntnis der verschiedenen Faktoren, welche den Expressionsspiegel des Hybridgens beeinflussen, wird der Fachmann auf dem Gebiet wissen, wie ein Expressionssystem zu entwerfen ist, das für die vorliegende Absicht brauchbar ist.

[0048] Das zu verwendende Milchprotein-Gen kann aus der gleichen Spezies abgeleitet sein, wie derjenigen, in welche das Expressionssystem eingebracht werden soll, oder es kann aus einer anderen Spezies abgeleitet werden. In diesem Zusammenhang ist es gezeigt worden, dass die regulatorischen Elemente, welche Genexpression zielgerichtet auf die Brustdrüse lenken, über Speziesgrenzen hinweg funktionell sind, was man auf einen möglichen gemeinsamen Vorfahren zurückführen kann (Hennighausen et al., 1990).

[0049] Beispiele für geeignete Gene, codierend ein Milchprotein oder effektive Teilsequenzen davon, welche in der Konstruktion eines Expressionssystems der Erfindung verwendet werden sollen, werden normalerweise unter Molke-Proteinen von unterschiedlicher Säugetier-Herkunft, z.B. einem Gen für saures Molke-Protein (WAP, whey acidic protein), vorzugsweise von Maus-Herkunft, und einem β -Lactoglobulin-Gen, vorzugsweise von Schaf-Herkunft, gefunden. Auch Casein-Gene von verschiedenerlei Herkunft können als für die transgene Herstellung einer BSSL-Variante geeignet befunden werden, z.B. Rinder- α S1-Casein und Kaninchen- β -Casein. Das gegenwärtig bevorzugte Gen ist ein Maus-WAP-Gen, da von diesem gefunden wurde, dass es zur Bereitstellung eines hohen Expressionsspiegels einer Reihe von menschlichen Fremdproteinen in Milch aus verschiedenen transgenen Tieren in der Lage ist (Hennighausen et al., 1990).

[0050] Eine andere Sequenz, welche vorzugsweise mit dem Expressionssystem der Erfindung assoziiert ist, ist eine so genannte expressionsstabilisierende Sequenz, welche fähig zur Vermittlung einer Expression von hohem Niveau ist. Es existieren starke Anzeichen, dass derartige stabilisierende Sequenzen in der Nachbarschaft von und stromaufwärts von Milchprotein-Genen gefunden werden.

[0051] Ebenfalls eingeschlossen in der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines transgenen nicht-menschlichen Säugetiers, fähig zum Exprimieren einer BSSL-Variante, umfassend (a) Einbringen eines Expressionssystems gemäß des oben Stehenden in ein befruchtetes Ei oder eine Zelle eines Embryos eines nicht-menschlichen Säugetiers, so dass das Expressionssystem in die Keimbahn des Säugetiers eingebunden wird, und (b) Entwickeln des resultierenden eingebrachten befruchteten Eies oder Embryos zu einem adulten weiblichen nicht-menschlichen Säugetier.

[0052] Die Einbindung des Expressionssystems in die Keimbahn des Säugetiers kann unter Anwendung einer beliebigen geeigneten Technik durchgeführt werden, z.B. wie beschrieben in "Manipulating the Mouse Embryo"; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. Zum Beispiel können einige hundert Moleküle des Expressionssystems direkt in ein befruchtetes Ei, z.B. ein befruchtetes Ein-Zell-Ei oder einen Pro-Nukleus davon, oder ein Embryo des Säugetiers der Wahl injiziert werden, und die mikroinjizierten Eier können dann in die Eileiter von pseudoschwangeren Leihmüttern transferiert und sich entwickeln gelassen werden.

[0053] Das Verfahren zur Herstellung eines transgenen nicht-menschlichen Säugetiers, fähig zum Exprimieren einer BSSL-Variante, kann auch ein Verfahren umfassen, worin das Säugetier im Wesentlichen unfähig zum Exprimieren von BSSL aus dem Säugetier selbst ist. Ein solches Verfahren umfasst (a) Zerstören des BSSL-Expressions-Vermögens des Säugetiers, so dass im Wesentlichen keine Säugetier-BSSL exprimiert wird, und Einbringen eines Expressionssystems gemäß des oben Genannten in die Keimbahn des Säugetiers auf eine solche Weise, dass eine BSSL-Variante in dem Säugetier exprimiert wird; und/oder (b) Ersetzen des Säugetier-BSSL-Gens oder eines Teils davon mit einem Expressionssystem, wie es obenstehend definiert ist.

[0054] Das Säugetier-BSSL-Expressions-Vermögen kann bequem durch Einführung von Mutationen in die DNA-Sequenz, welche für die Expression von BSSL verantwortlich ist, zerstört werden. Derartige Mutationen können Mutationen, welche die DNA-Sequenz aus dem Leseraster bringen, die Einführung eines Stopp-Codons oder eine Deletion von einem oder mehreren Nukleotiden der DNA-Sequenz umfassen.

[0055] Das Säugetier-BSSL-Gen oder ein Teil davon kann mit einem Expressionssystem, wie oben definiert, oder mit einer DNA-Sequenz, welche die BSSL-Variante codiert, durch Anwendung der gut bekannten Prinzipien der homologen Rekombination ersetzt werden.

[0056] In einem weiteren wichtigen Aspekt betrifft die Erfindung ein transgenes nicht-menschliches Säugetier, welches in seinem Genom eine DNA-Sequenz gemäß des oben Genannten beherbergt. Die DNA-Sequenz kann vorzugsweise in der Keimbahn des Säugers, und in einem Milchprotein-Gen des Säugers, vorhanden sein. Das transgene nicht-menschliche Säugetier kann vorzugsweise aus der Gruppe gewählt werden, welche aus Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schafen, Schweinen und Rindern besteht.

[0057] Ebenfalls eingeschlossen in der Erfindung sind Nachkommen eines transgenen nicht-menschlichen Säugetiers gemäß des oben Genannten sowie Milch, welche aus einem solchen transgenen nicht-menschlichen Säugetier erhalten wird.

[0058] Die Erfindung betrifft ferner eine Kleinkind-Formulierung, umfassend Milch gemäß des oben Genannten, und eine Kleinkind-Formulierung, umfassend eine BSSL-Variante, wie oben definiert. Die Kleinkind-Formulierung kann unter Anwendung herkömmlicher Vorgehensweisen hergestellt werden und jedwede notwen-

digen Additive, wie Mineralien, Vitamine etc. enthalten.

[0059] In weiteren Aspekten betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine BSSL-Variante, wie oben definiert, sowie eine derartige BSSL-Variante zum Einsatz in der Therapie.

[0060] In noch weiteren Aspekten betrifft die Erfindung die Verwendung einer BSSL-Variante, wie oben definiert, für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von einem pathologischen Zustand, zusammenhängend mit exokriner Pankreas-Insuffizienz; cystischer Fibrose; chronischer Pankreatitis; mangelhafter Fettabsorption; mangelhafter Absorption von fettlöslichen Vitaminen; mangelhafter Fettabsorption wegen physiologischer Gründe. Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung einer BSSL-Variante für die Herstellung eines Medikaments zur Verbesserung der Verwertung von in der Nahrung befindlichen Lipiden, insbesondere bei zu früh geborenen Kleinkindern.

BEISPIELE

1. EXPRESSION VON REKOMBINANTEM BSSL IN EUKARYOTISCHEN UND PROKARYOTISCHEN ZELLEN

1.1. EXPERIMENTELLE VORGEHENSWEISEN

1.1.1. Rekombinante Plasmide

[0061] Das Plasmid pS146, welches die 2,3 kb große humane BSSL-cDNA (Nilsson et al., 1990), kloniert in pUC19, enthält, wurde mit HindIII und Sall verdaut, und die BSSL-cDNA wurde in einen Rinder-Papillomavirus (BPV)-Expressionsvektor, pS147 (**Fig. 1**), eingeführt. Dieser Vektor enthält die humane BSSL-cDNA unter der Steuerung des murinen Metallothionein 1 (mMT-1)-Enhancer- und Promotorelements (Pavlakakis & Hamer, 1983). Die mRNA-Prozessierungssignale werden von einem genomischen Fragment vorgesehen, enthaltend einen Teil von Exon II, Intron II, Exon III und stromabwärts gelegene Elemente des Kaninchen- β -Globin-Gens. Diese Transkriptionseinheit wurde in einen Vektor kloniert, der das gesamte BPV-Genom enthielt. Die Transkription war unidirektional für BPV und die BSSL-Transkriptionseinheit. Zur Vermehrung des Vektors in *E. coli* enthält der Vektor ebenfalls pML2d, ein pBR322-Derivat (Sarver et al., 1982).

[0062] Der Expressionsvektor pS147 wurde mit einem Vektor, der das Neomycin-Resistenzgen codiert, gesteuert von dem Harvey-Sarcom-Virus-5'-"Long terminal repeat" und Affen-Virus-40-Polyadenylierungssignalen (Lusky & Botchan, 1984), cotransfiziert.

[0063] Für die Expression von BSSL in *E. coli* wurde die BSSL-cDNA als ein NdeI-BamHI-Fragment aus dem Plasmid pT7-7 (Ausubel et al., 1992) in das Plasmid pGEMEX-1 (Promega, Madison, WI, USA) (Studier & Moffat, 1986) subkloniert. Durch dieses Klonierungsverfahren wurde die für das T7-Gen 10 codierende Sequenz durch das BSSL-Gen, codierend für das reife Protein, welchem ein Start-Codon voranging, ersetzt. Der letztliche Expressionsvektor pGEMEX/BSSL, wurde durch DNA-Sequenzierung unter Verwendung von spezifischen internen BSSL-Primern bestätigt.

1.1.2. Mutagenese

[0064] Die Nukleotid-Nummer 1 wurde dem A in dem Initiationscodon ATG zugewiesen. Für die Aminosäurenummerierung ist das erste Methionin in dem Signalpeptid -23, und dem ersten Aminosäurerest des reifen Proteins, einem Alanin, wird die Nummer 1 zugewiesen.

[0065] Für die Konstruktion der Deletionsvariante A (SEQ ID Nr.: 4) wurden zwei PCR-Primer, PCR-1 und PCR-2 (Tabelle 1), synthetisiert. Die HindIII-, Sall- und BamHI-Stellen wurden für eine Klonierung in unterschiedliche Plasmide erzeugt. Die BclI-Stelle wurde in der BSSL-Sequenz erzeugt, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern. Dies wurde vorgenommen, um die Addition von synthetischer DNA zum Erhalten der anderen Varianten zu erleichtern. Der Primer PCR-2 enthält zwei synthetische Stop-Codons. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden mit BamHI und HindIII verdaut und zur Sequenzanalyse in pUC18 kloniert. Dieses Plasmid wurde pS157 genannt. Das korrekte PCR-Fragment wurde in den BPV-Expressionsvektor durch Fusion an die BSSL-Sequenz an der einmaligen Asp700-Stelle (Position 1405 in der BSSL-cDNA) und der Sall-Stelle vor dem β -Globin-Gen-Fragment inseriert, was zu pS257 führte.

[0066] Die B-Varianten-Konstruktion (SEQ ID Nr.: 5) wurde unter Verwendung der Oligonukleotide Nummer

3, 4, 7 und 8 (Tabelle 1) durchgeführt. Die annealten Oligonukleotide codieren die äußerste C-terminale Aminosäuresequenz, welche Lysin 712 bis Phenylalanin 722 im Vollängenprotein repräsentiert. Dieses Fragment wurde an Glutamin 535 fusioniert. Ein Translations-Stop wurde direkt nach dem letzten Phenylalanin inseriert. Dieses Fragment enthält eine BclI-Stelle im 5'-Ende und eine Sall-Stelle im 3'-Ende, was die Einführung in pS157 gestattet. Das resultierende Plasmid wurde mit Asp700 und Sall verdaut, und das 313 bp große Fragment wurde in den Expressionsvektor eingeführt, wie oben stehend beschrieben. Das resultierende Plasmid wurde pS258 genannt.

TABELLE 1.

[0067] Synthetische Oligonukleotide, welche verwendet wurden für die Konstruktion der BSSL-Varianten. Nukleotide von Restriktionsstellen sind unterstrichen. Translations-Stoppssignale sind durch fett gedruckte Buchstaben angegeben. Das veränderte Codon in Variante N ist in PCR-3 durch Fettdruckbuchstaben und einen Asterisken angegeben.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
PCR-1	<u>CGGGATCCGAAGCCCTTCGCCACCC</u> CGGACG
PCR-2	CGAAGCTT <u>GTTCGACTTACTACTGATCAGTCACTGTGGGCAGCGCCAG</u>
PCR-3	<u>CGGAATTC</u> <u>TGGCCATTGCTTGGGTGAAGAGGAATATCGCGGC</u> <u>TTCCG</u> GGGGACCCCAACCAGATCAGCTCTTCGGGGAGTCT
PCR-4	<u>CGGGATCC</u> CCACATAGTGCAGCATGGGGTACTCCAGGCC
1	<u>GATCAGGGGGCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCCGGG</u>
2	GGCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCCAAGGAAGCTCAGA
3	TGCCTGCAGTCATTAGGTTT <u>AGTAAGTCGACA</u>
4	<u>AGCTTGTTCGACTTACTAAAACCTAATGACTG</u>
5	CAGGCATCTGAGCTTCCTTGGAGTCACCCGTGGCGGCACGGGGGGGG CCCCGGA
6	GTCACCCGTGGCGGCACGGGGGGGGCCCC <u>T</u>
7	<u>GATCAGAAGGAAGCTCAGA</u>
8	CAGGCATCTGAGCTTCCT <u>TCT</u>

[0068] Um das Gen, welches die C-Variante (SEQ ID Nr.: 6) codiert, zu konstruieren, wurden die Oligonukleotide 1 bis 6 (Tabelle 1) verwendet. Das angelagerte bzw. annealte DNA-Fragment enthält zwei Repetitionen, die elf Aminosäuren codieren, identisch zum Konsensus (Nilsson et al., 1990), inseriert zwischen Glutamin 535 und der Lysin 712- bis Phenylalanin-722-Sequenz. Dieses Fragment enthält auch eine BclI-Stelle im 5'-Ende und eine Sall-Stelle im 3'-Ende, was dieselbe Klonierungsstrategie wie oben ermöglicht. Das resultierende Plasmid wurde als pS259 bezeichnet.

[0069] Für die Konstruktion von Variante N (nicht-N-glycosylierte Variante SEQ ID Nr.: 7) wurden zwei PCR-Primer (PCR-3 und PCR-4 in Tabelle 1) synthetisiert. Die EcoRI- und BamHI-Stellen wurden für die Klonierung des 360-bp-PCR-Produkts in pUC19 für eine Sequenzanalyse erzeugt. Die potenzielle N-verknüpfte Glycosylierungsstelle bei Asparagin 187 wurde zu einem Glutamin geändert. Die modifizierte Sequenz wurde als ein Ball-HindIII-Fragment isoliert und in mit SacI und HindIII verdauten pUC19 gemeinsam mit einem SacI- und Ball-Fragment kloniert, welches den mMT-1-Promotor und das 5'-Ende von BSSL-cDNA enthielt. Ein ungefähr 1,2 kb großes SacI-DraIII-Fragment wurde aus diesem Plasmid isoliert und in das mMT-1-Element bzw. die BSSL-cDNA-Sequenz, innerhalb des Expressionsvektors, inseriert. Das resultierende Plasmid wurde pS299 genannt.

1.1.3. Säugerzellkultur und Transfektionen

[0070] Die Vektoren wurden in die Maus-Zelllinie C127 (ATCC CRL 1616) nach dem Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren (Graham & Van der Eb, 1973) co-transfiziert.

[0071] Die C127-Zellen wurden in Ham's F 12 -Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) (1:1), ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum, kultiviert. Neomycin-resistente Zellklone wurden mit $1,5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ G418 selektiert, und nach 10 – 15 Tagen wurden resistente Zellklone von den Stammpplatten isoliert und für eine Analyse passagiert.

1.1.4. Bakterienstämme und Kulturbedingungen

[0072] Für Expressionsexperimente wurde der Vektor pGEMEX/BSSL in E. coli-Stämme JM109(DE3) und BL21(DE3)pLysS transformiert. Die Expressionsexperimente wurden ausgeführt, wie beschrieben von Studier et al. (1986). Nach Ernten von Bakterien wurden die Zellen mittels Zentrifugation ($5000 \times \text{g}$ während 10 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$) pelletiert. Für die Herstellung von Periplasma- und Cytoplasma-Fractionen wurde das Pellet in 4 ml 20 mM Tris-Cl/20 % Saccharose, pH 8,0, 200 μl 0,1 M EDTA und 40 μl Lysozym (15 mg/ml in Wasser) pro Gramm Pellet resuspendiert. Die Suspension wurde 40 Minuten lang auf Eis inkubiert. 160 μl 0,5 M MgCl_2 pro Gramm Pellet wurden zugesetzt, wonach die Suspension 20 Minuten lang bei $12000 \times \text{g}$ zentrifugiert wurde. Der resultierende Überstand enthält periplasmatische Proteine und das Pellet repräsentiert die cytoplasmatische Fraktion. Alternativ dazu wurden, für die Herstellung löslicher Proteine, die Zellen in 40 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, pH 8,2, suspendiert, gefriergetaut und mehrere Male schallbehandelt, um eine Lyse vorzunehmen. Das Zell-Lysat wurde zentrifugiert ($30000 \times \text{g}$ während 30 Minuten bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

1.1.5. Nukleinsäureanalyse

[0073] RNA und DNA wurden aus isolierten Säugetierzelllinien oder E.coli-Zellen hergestellt (Ausubel et al., 1992). Die RNA oder DNA wurden auf Agarosegelen fraktioniert und auf "GeneScreen Plus" (New England Nuclear) geblotet und gemäß den Anweisungen des Herstellers hybridisiert.

1.1.6. Herstellung von nativem Enzym

[0074] Gallensalz-stimulierte Lipase wurde aus menschlicher Milch gereinigt, wie es früher beschrieben wurde (Bläckberg & Hernell, 1981). Die gereinigte Präparation war homogen, wie mittels SDS-PAGE beurteilt, und wies eine spezifische Aktivität von $100 \text{ } \mu\text{mol freigesetzter Fettsäure} \times \text{min}^{-1}$ und mg^{-1} auf, wenn ein Assay mit langkettigem Triacylglycerol als Substrat ausgeführt wurde.

1.1.7. Enzym-Assay

[0075] Der Enzym-Assay erfolgte wie beschrieben (Bläckberg & Hernell, 1981) unter Verwendung von Triolein, emulgiert mit Gummi Arabicum, als Substrat. Die Inkubationen wurden mit 10 mM Natriumcholat als aktivierendes Gallensalz durchgeführt. Als die Gallensalz-Abhängigkeit getestet wurde, wurden Gallensalze (Natriumcholat oder Natriumdesoxycholat, Sigma Chem. Co.) zu den in [Fig. 3](#) angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

1.1.8. Western-Blotting

[0076] Um signifikante Reaktionen in den Blotting-Experimenten zu erhalten, wurden die konditionierten Medien mittels Chromatographie auf Blue-Sepharose (Pharmacia LKB Biotechnology) konzentriert. Die jeweiligen Medien wurden mit Blue-Sepharose vermischt (ungefähr 10 ml Medium pro ml Gel). Das Gel wurde (10 ml pro ml Gel) mit 0,5 M Tris-Cl-Puffer, pH 7,4, enthaltend 0,1 M KCl, gewaschen. Die Enzym-Aktivität wurde mit 1,5 M KCl im selben Puffer eluiert. Durch dieses Vorgehen wurde eine 25-30-fache Konzentrierung sowie eine 3-5-fache Aufreinigung erhalten. Eine SDS-PAGE wurde auf 10%igen Polyacrylamidgelen im Wesentlichen gemäß Laemmli (1970) durchgeführt. Nach Transfer auf Nitrozellulosemembranen und Inkubation mit einem polyklonalen Kaninchenantiserum gegen gereinigtes BSSL erfolgte eine Detektion unter Verwendung von Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, welches mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, und eines Entwicklungs-Kits von Bio-Rad.

1.1.9. Behandlung mit N-Glycosidase F

[0077] Zu 10 µl von Variante B, enthaltend eine BSSL-Aktivität von 2,5 µmol freigesetzter Fettsäure × min⁻¹, wurden 1 µl 1 M β-Mercaptoethanol und 0,5 µl 10 % (w/v) SDS zugesetzt. Nach 5 Minuten langem Kochen wurden 10 µl 0,1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 8,0, 6 µl 0,1 M EDTA, 4 µl 7,5 % (w/v) Nonidet P 40 und 5 µl (1U) N-Glycosidase F (Boehringer Mannheim) zugegeben. Als eine Kontrolle wurde die gleiche Menge an Variante B identisch behandelt, außer dass keine Glycosidase zugesetzt wurde. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Proben auf SDS-PAGE laufen gelassen und unter Verwendung des polyklonalen Kaninchen-BSSL-Antiserums geblottet.

1.2. ERGEBNISSE

1.2.1. Konstruktion der BSSL-Varianten

[0078] Die Modifikationen der BSSL-Varianten in Bezug auf das Volllängen-BSSL sind in der Tabelle 2 und der Fig. 1 zusammengefasst. Die zur Erzeugung dieser Varianten verwendeten Strategien sind im Abschnitt 1.1 beschrieben. Für die Variante A (SEQ ID Nr.: 4) wurde ein Stop-Codon nach dem Glutamin an Position 535 eingeführt, wodurch die letzten 187 Aminosäuren des Volllängenproteins entfernt wurden. Für die Variante B (SEQ ID Nr.: 5) wurde die Domäne, welche die äußersten 11 C-terminalen Aminosäuren und das originale Translations-Stopp codierte, an Glutamin-535 fusioniert. Somit fehlten dieser Variante alle Wiederholungseinheiten. Für die Variante C (SEQ ID Nr.: 6) wurde ein Fragment, enthaltend zwei Wiederholungseinheiten mit einer zum Konsensus (Nilsson et al., 1990) identischen Sequenz, zwischen Glutamin-535 und die Lysin-712-an die Phenylalanin-722-Sequenz inseriert.

[0079] Um die Bedeutung der einzigen vermeintlichen N-verknüpften Kohlenhydrat-Struktur, welche nahe zum Aktiven-Stellen-Serin-194 positioniert ist, zu analysieren, wurde eine Variante konstruiert. Die Variante N (SEQ ID Nr.: 7) wurde durch Verändern der potenziellen N-Glycosylierungsstelle am Asparagin-187 zu einem Glutamin erhalten.

TABELLE 2

Die Aminosäuresequenz der BSSL-Varianten in Bezug auf diejenige von menschlicher BSSL.

Variante	Deletierte Reste	Veränderte Reste
A (SEQ ID Nr.: 4)	536-722	
B (SEQ ID Nr.: 5)	536-711	
C (SEQ ID Nr.: 6)	536-568, 591-711	
N (SEQ ID Nr.: 7)		Asn 187 → Gln

1.2.2. Charakterisierung von rekombinanter DNA in den Säugetierzelllinien

[0080] DNA-Proben wurden aus den Zelllinien hergestellt, die mit den Expressionsvektoren transfiziert waren, welche die verschiedenen BSSL-Varianten codierten. Die präparierte DNA wurde mit BamHI verdaut, auf Agarosegelen fraktioniert und auf Membranen für die Hybridisierung überführt. Die verwendete Sonde war ³²P-markierte BSSL-cDNA. Die Hybridisierungsergebnisse bestätigten das Vorliegen der rekombinanten Gene und auch, dass die Vektor-Kopienzahl in den verschiedenen Zelllinien ungefähr gleich war (Fig. 2). Die Positionen der hybridisierenden Fragmente spiegelten die unterschiedlichen Längen der verschiedenen BSSL-Sequenzen wider und standen in Übereinstimmung mit den erwarteten Größen. Die Positionen waren ebenfalls ähnlich zu der Bakterien-abgeleiteten DNA, welche im Transfektionsexperiment eingesetzt wurde, was zeigt, dass kein größeres Rearrangement der Vektor-DNA in den Zelllinien stattgefunden hatte (Fig. 2). Die oberen Hybridisierungssignale in der DNA-Probe, welche die Variante A repräsentiert, beruhten wahrscheinlich auf einem partiellen Verdau.

1.2.3. Expression von mRNA für Volllängen- und mutierte BSSL in Säugetierzellen

[0081] Um die Expression der verschiedenen rekombinanten BSSL-Gene zu analysieren, wurde RNA aus den isolierten Zelllinien hergestellt. Northern-Blot-Experimente und Hybridisierung mit ³²P-markierter

BSSL-cDNA zeigten, dass rekombinante mRNA in allen Zelllinien nachweisbar war, welche einen BSSL-Vektor beinhalteten (Fig. 3). Keine Hybridisierung wurde in der Kontrollprobe gefunden, welche aus einer Zelllinie abgeleitet wurde, die einen identischen Vektor, mit Ausnahme der BSSL-cDNA, enthielt (Fig. 3).

[0082] Die unterschiedlichen Längen der hybridisierenden mRNAs standen in Übereinstimmung mit den Modifikationen der cDNAs. Die Steady-State-Level der rekombinanten BSSL-mRNA-Varianten in den verschiedenen Proben waren ungefähr die gleichen, außer für die Variante A (Fig. 3). Der Grund für die verringerte Akkumulation von Variante-A-mRNA ist nicht bekannt, aber sie wurde bei zwei Populationen von Zelllinien sowie bei isolierten Klonen beobachtet. Das Vorliegen gleicher Mengen von RNA in den verschiedenen Proben wurde durch Hybridisierung an eine Maus- β -Actin-Sonde bestätigt (Fig. 3, untere Tafel).

1.2.4. Herstellung von Vollängen- und Varianten von BSSL in Säugetierzellen

[0083] Medien aus individuellen Klonen der C127-Zellen, transfiziert mit Vollängen-BSSL und den verschiedenen mutierten Formen, wurden abgesammelt und hinsichtlich BSSL-Aktivität getestet (Fig. 4). Für das Vollängenmolekül und die Varianten N, B und C lagen die Aktivitäten in den Klonen mit der höchsten Expression im Bereich von 0,7 bis 2,3 $\mu\text{mol freigesetzte Fettsäure} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml Medium}^{-1}$. Bei einer spezifischen Aktivität, vergleichbar zu derjenigen der nativen Milch-BSSL, würde dies Expressionsspiegeln von 7-23 $\mu\text{g} \times \text{ml Medium}^{-1}$ entsprechen. Für die Variante A besaßen alle analysierten Klone Aktivitäten unter 0,05 $\mu\text{mol freigesetzte Fettsäure} \times \text{min}^{-1}$ und ml Medium^{-1} . Die Konzentrierung auf Blue-Sepharose und das Lyophilisieren des Klons, welcher die höchste Aktivität zeigte, enthüllten, dass tatsächlich ein aktives Enzym exprimiert wurde, wenngleich bei sehr niedrigen Spiegeln. Die Möglichkeit, dass die mit der Variante A erhaltene geringe Aktivität zum Teil durch eine beträchtlich geringere spezifische Aktivität erklärt werden könnte, konnte nicht ausgeschlossen werden.

[0084] Western-Blots von Klonen der verschiedenen Transfektionsexperimente sind in der Fig. 5A gezeigt. Das scheinbare M_r der BSSL-Varianten war wie erwartet. Es sollte jedoch bemerkt werden, dass für Vollängen-BSSL sowie für die Varianten B und C ein Doppelbande beobachtet wurde. Weil bei allen Dreien die einzige N-Glykosylierungsstelle unversehrt war, wohingegen der Variante N, welche keine Doppelbande zeigte, diese Stelle fehlte, bestand eine wahrscheinliche Erklärung darin, dass die Doppelbande aus Unterschieden in der N-Glykosylierung resultierte. Deshalb wurde die Variante B einem Verdau mit N-Glykosidase F unterzogen. Wie in der Fig. 5B gezeigt, verblieben lediglich Spuren Mengen der oberen Bande, wohingegen die untere Bande an Stärke zunahm, was anzeigt, dass nur ein Teil der exprimierten Variante N-glykosyliert war.

[0085] Eines der Merkmale von BSSL ist ihre spezifische Aktivierung durch primäre Gallensalze, z.B. Cholat (Hernell, 1975). All die unterschiedlichen rekombinanten Formen von BSSL zeigten die gleiche Konzentrationsabhängigkeit für Cholat-Aktivierung (Fig. 6). Eine maximale Aktivität wurde in dem verwendeten Assaysystem bei etwa 10 mM erhalten. Als Cholat durch Desoxycholat ausgetauscht wurde (ein sekundäres Gallensalz), fand keine derartige Aktivierung statt. Somit zeigten die rekombinante Vollängen-Form wie auch die verschiedenen Varianten dieselbe Spezifität in Bezug auf Gallensalz-Aktivierung.

1.2.5. Expression und biochemische Charakterisierung von Vollängen-BSSL in E. coli

[0086] Zwei E.coli-Stämme, JM109(DE3) und BL21(DE3)pLysS (Studier et al., 1986), wurden mit dem Expressionsvektor pGEMEX/BSSL transformiert, welcher die humane BSSL-cDNA unter der Steuerung des T7-Promotors enthielt. Transformanten aus beiden Stämmen wurden identifiziert, kultiviert und etwa 90 Minuten lang mit IPTG induziert (Studier et al., 1986). Eine Analyse der Gesamt-mRNA durch Northern-Blot unter Verwendung der BSSL-cDNA als eine ^{32}P -markierte Sonde demonstrierte, dass die Expression in beiden Stämmen effizient induziert wurde und dass die Transkription strikt reguliert war (Fig. 7A). Die scheinbare Größe der rekombinanten BSSL-mRNA, ungefähr 2,4 kb, steht in Übereinstimmung mit der erwarteten Länge. Eine SDS-PAGE-Trennung der Proteinproben und Immunodetektion mit Anti-BSSL-Antikörpern zeigten, dass Vollängen-BSSL effizient in E. coli produziert wurde (Fig. 7B). In dem BL21(DE3)pLysS-Stamm wurde mehr Protein in das Periplasma sezerniert als in JM109(DE3) (Fig. 7B).

[0087] IPTG-induzierte E.coli-Kulturen enthielten aktives lösliches BSSL, entsprechend 0,5 – 4 $\mu\text{g BSSL-Protein/ml Kultur}$. Ein Western-Blotting zeigte, dass zwischen 20 und 60 % des reaktiven Materials in dem unlöslichen Pellet vorlagen. Nicht-induzierte Bakterien enthielten keine signifikante BSSL-Aktivität.

[0088] Die Lipaseaktivität aus kultivierten Bakterien zeigte die gleiche Gallensalz-Abhängigkeit wie native Milch-BSSL.

2. REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON REKOMBINANTEN VOLLLÄNGEN- UND MUTIERTEN FORMEN VON GALLENSALZ-STIMULIERTER LIPASE

2.1. EXPERIMENTELLE VORGEHENSWEISEN

2.1.1. Enzyme und Enzymvarianten

[0089] Rekombinantes Volllängen-BSSL und BSSL-Varianten B, C und N wurden konstruiert und exprimiert, wie vorangehend beschrieben. Im Vergleich zu dem nativen Enzym fehlten der Variante B (SEQ ID Nr.: 5) alle 16 einmaligen, O-glykosylierten, prolinreichen C-terminalen Wiederholungseinheiten (aa 536-711), wobei jedoch das äußerste C-terminale Fragment (aa 712-722) an Glutamin-535 fusioniert war. Die Variante C (SEQ ID Nr.: 6) enthält das gleiche C-terminale Fragment und zwei Wiederholungseinheiten von 11 Resten zwischen Glutamin-535 und Lysine-712. In der Variante N (nicht-N-glykosylierte Variante, SEQ ID Nr.: 7) wurde das für den einzigen N-verknüpften Zucker verantwortliche Asparagin-187 durch einen Glutamin-Rest ausgetauscht. Native BSSL wurde aus menschlicher Milch gereinigt, wie beschrieben (Bläckberg & Hernell, 1981).

2.1.2. Enzym-Assay

[0090] Lipaseaktivität wurde geassayt, wie beschrieben (Bläckberg & Hernell, 1981), wobei in Gummi Arabicum emulgiertes Triolein als Substrat verwendet wurde. Natriumcholat (10 mM) wurde als aktivierendes Gallensalz verwendet. Verschiedene Modifikationen des Assays sind in den Legenden zu den Figuren angegeben.

2.1.3. Herstellung von Immunosorbens

[0091] Gereinigte Milch-BSSL (5 mg) wurde unter Verwendung von CNBr, wie beschrieben vom Hersteller, an Sepharose gekoppelt. 40 ml eines polyklonalen Antiserums, welches in Kaninchen gegen gereinigte Milch-BSSL gewonnen worden war, wurden durch die Säule laufen gelassen. Spezifische Antikörper wurden mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5, eluiert. Der pH-Wert wurde unverzüglich mit festem Tris auf ungefähr 8 eingestellt. Nach dem Entsalzen und Lyophilisieren wurden 6 mg der affinitätsgereinigten Antikörper an Sepharose gekoppelt, wie oben stehend beschrieben.

2.1.4. Reinigungsvorgehen

[0092] Konditionierte Kulturmedien, enthaltend 5 – 25 µg rekombinant exprimierte BSSL oder BSSL-Variante, wurden mit Blue-Sepharose (Pharmacia, Schweden) bei 10 ml Medium pro ml abgesetztem Gel gemischt. Nach 30 Minuten langem Kopfüber-Mischen wurde das Gel mit 0,05 M Tris-Cl, pH 7,0, 0,05 M KCl gespült, und die Lipase-Aktivität wurde mit 0,05 M Tris-Cl, pH, 7,0, 1,5 M KCl eluiert. Der Aktivitäts-Peak wurde vereinigt und gegen 5 mM Natrium-Veronal, pH 7,4, 0,05 M NaCl dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 0,05 bis 1,0 M NaCl in 5 mM Natrium-Veronal-Puffer, pH 7,4, eluiert. Fraktionen, welche Lipase-Aktivität enthielten, wurden vereinigt und auf eine Immunosorbens-Säule aufgetragen. Nach Spülen mit 0,05 M Tris-Cl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, wurde gebundene Lipase mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5, eluiert. Der pH-Wert der Fraktionen wurde unverzüglich mit festem Tris auf ungefähr 8 eingestellt.

2.1.5. Elektrophorese

[0093] Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde im Wesentlichen gemäß Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proteine wurden mit Commassie-Brilliant-Blue gefärbt.

2.1.6. N-terminale Sequenzanalyse

[0094] Die Aminosäure-Sequenzanalyse wurde auf einer Applied Biosystems Inc. 477A-Puls-Flüssigkeitsphasen-Sequenziervorrichtung und einem "on-line" Phenylthiohydantoin-120A-Analysegerät mit regulären Zyklusprogrammen und Chemikalien vom Hersteller durchgeführt. Aus einem sequenzierten Standardprotein (β -Lactoglobulin) berechnete Anfangs- und Wiederholungs-Ausbeuten beliefen sich auf 47 % bzw. 97 %.

2.2. ERGEBNISSE

2.2.1. Reinigung rekombinanter BSSL und BSSL-Varianten

[0095] Die Chromatographie von konditionierten Medien auf Blue-Sepharose wurde hauptsächlich als ein Konzentrierungsschritt eingesetzt. Die nachfolgende Chromatographie auf Heparin-Sepharose ergab eine anfängliche Aufreinigung hauptsächlich durch Entfernung des Großteils des im Kulturmedium vorhandenen Albumins. Dieser Schritt zeigte auch, dass die rekombinanten BSSL-Moleküle alle die Heparinbindung beibehielten. Nach dem Immunosorbens erschienen alle BSSL-Varianten zu mehr als 90 % rein, wie mittels SDS-PAGE beurteilt wurde (**Fig. 8**). Das Volllängenenzym wie auch die Varianten B und C wanderten als eine Doppelbande. Das scheinbare M_r der verschiedenen Varianten wird in der Tabelle 3 gezeigt.

[0096] Eine N-terminale Sequenzanalyse ergab eine einzelne Sequenz für alle Varianten bei 8 Zyklen: Ala-Lys-Leu-Gly-Ala-Val-Tyr-Thr-.

2.2.2. Lipase-Aktivität

[0097] In der Tabelle 3 ist das scheinbare Molekulargewicht der verschiedenen Präparationen gezeigt. Die spezifischen Aktivitäten der Präparationen lagen im Bereich von 75 bis 120 μmol freigesetzte freie Fettsäure pro Minute und mg Protein. Folglich konnte kein signifikanter Unterschied in der Aktivität zwischen Volllängen-BSSL und den BSSL-Varianten beobachtet werden.

[0098] Die Präparationen zeigten alle ein absolutes Erfordernis nach primärem Gallensalz (Natriumcholat) für eine Aktivität gegenüber emulgiertem langkettigen Triacylglycerol (**Fig. 9A**). Natriumdesoxycholat machte jede der Varianten aktiv (Daten nicht gezeigt). Allerdings hatte Desoxycholat, bei Kombinieren der verschiedenen Gallensalze, zwei Effekte (**Fig. 9B** und **C**). Zum Ersten verringerte es die zur Aktivierung benötigte Konzentration an Cholat und, zum Zweiten, inhibierte es die Enzymaktivität bei höherer Gallensalzkonzentration.

TABELLE 3.

Scheinbares M_r von rekombinanter Volllängen-BSSL und BSSL-Varianten.

Enzym	M_r (kDa), ermittelt durch SDS-PAGE
Volllängenform	105, 107
Variante B	63, 65
Variante C	60, 62
Variante N	95

2.2.3. Stabilität der rekombinanten BSSL und BSSL-Varianten

[0099] Rekombinante BSSL sowie die BSSL-Varianten zeigten die gleiche pH-Stabilität wie native Milch-BSSL (**Fig. 10**). Eine Inaktivierung fand in allen Fällen bei einem pH-Wert um 2,5 – 3 statt. Über einem pH-Wert von 3 waren alle Varianten vollständig stabil, vorausgesetzt die Proteinkonzentration war hoch genug. Dies wurde mittels Hinzusetzen von Rinderserumalbumin oder Ovalbumin bewirkt (Daten nicht gezeigt). Verdünnte Proben waren bei allen getesteten pH-Werten weniger stabil, aber die Schwelle blieb die gleiche (Daten nicht gezeigt). Die **Fig. 11** zeigt die Wärmestabilität der rekombinanten Enzyme im Vergleich zu dem nativen Milchenzym. Bei einer Temperatur von 37 – 40 °C beginnt die Aktivität zu sinken. Die Varianten (B, C, N) erschienen etwas weniger stabil als das rekombinante Volllängenenzym und das Milchenzym zu sein. Wenn jedoch die Proteinkonzentration durch Hinzufügen von Rinderserumalbumin erhöht wurde, waren alle Varianten auch bei 40 °C stabil (**Fig. 11**).

[0100] Native Milch-BSSL und alle rekombinanten Varianten waren sämtlich gegenüber Trypsin empfindlich. Es wurde eine zeitabhängige Inaktivierung erhalten (**Fig. 12**). Wenn jedoch Gallensalze, d. h. Cholat, in den Puffer eingeschlossen wurden, waren die Lipasevarianten geschützt, und die Lipaseaktivität blieb bestehen (**Fig. 12**).

[0101] In Hinsicht auf eine Reihe von in vitro-Merkmalen, d. h. Gallensalz-Aktivierung, Heparinbindung, pH- und Temperaturstabilität und Gallensalz-Schutz gegen Inaktivierung durch Proteasen, wurden somit keine signifikanten Unterschiede beobachtet, als die verschiedenen BSSL-Varianten mit nativer Milch-BSSL verglichen wurden.

3. EXPRESSION IN TRANSGENEN TIEREN

3.1. KONSTRUKTION VON EXPRESSIONSVEKTOREN

[0102] Um einen Expressionsvektor für die Herstellung von rekombinanter humaner BSSL-Variante in Milch aus transgenen Tieren zu konstruieren, wurde die folgende Strategie angewandt ([Fig. 13](#)).

[0103] Drei Plasmide, enthaltend verschiedene Teile des humanen BSSL-Gens (pS309, pS310 und pS311) wurden unter Anwendung der Verfahren erhalten, welche in Lidberg et al. (1992) beschrieben wurden. Das Plasmid pS309 enthält ein SphI-Fragment, welches das BSSL-Gen von der 5' gelegenen nicht-transkribierten Region bis zu einem Teil des vierten Introns abdeckt. Das Plasmid pS310 enthält ein SacI-Fragment, welches eine BSSL-Varianten-Gensequenz von einem Teil des ersten Introns bis zu einem Teil des sechsten Introns abdeckt. Das Plasmid pS311 enthält schließlich ein BamHI-Fragment, welches das BSSL-Gen von einem Hauptteil des fünften Introns ab sowie den Rest der Intron/Exon-Struktur mit Deletionen im Exon 11 abdeckt. Bei den deletierten Sequenzen handelt es sich um 231 bp, was zu einer Sequenz führt, die eine BSSL-Variante codiert, welche exakt 77 Aminosäuren oder sieben Wiederholungseinheiten weniger als die Vollängen-BSSL aufweist. Die Nukleotidsequenz der resultierenden BSSL-Variante ("Variante T") ist in der Sequenzauflistung als SEQ ID Nr.: 8 gezeigt. Die Aminosäuresequenz von Variante T ist in der Sequenzauflistung als SEQ ID Nr.: 9 gezeigt.

[0104] Aufgrund der hochrepetitiven Sequenz im Exon 11 des humanen BSSL-Gens können verhältnismäßig hohe Häufigkeiten für Rearrangements vorhergesehen werden, wenn diese Sequenz in ein Plasmid kloniert und in Bakterien vermehrt wird. Basierend auf dieser Annahme wurde eine gewünschte BSSL-Variante, welche ein trunkiertes Exon 11 enthält, identifiziert, isoliert und einer Sequenzanalyse unterzogen.

[0105] Ein weiteres Plasmid, pS283, enthaltend einen Teil der menschlichen BSSL-cDNA, kloniert in das Plasmid pUC19 an den HindIII und SacI-Stellen, wurde für die Fusion von den genomischen Sequenzen verwendet. Das Plasmid pS283 wurde ebenfalls verwendet, um eine geeignete Restriktionsenzymstelle, KpnI, lokalisiert in der 5' gelegenen nicht-translatierten Leader-Sequenz von BSSL, zu erlangen.

[0106] Das Plasmid pS283 wurde mit NcoI und SacI verdaut und ein Fragment von etwa 2,7 kb wurde durch Elektrophorese isoliert. Das Plasmid pS309 wurde mit NcoI und BspEI verdaut, und ein Fragment von etwa 2,3 kb, welches den 5'-Teil des BSSL-Gens enthält, wurde isoliert. Das Plasmid pS310 wurde mit BspEI und SacI verdaut, und ein Fragment von etwa 2,7 kb, enthaltend einen Teil der mittleren Region des BSSL-Gens, wurde isoliert. Diese drei Fragmente wurden ligiert und in kompetente E. coli, Stamm TG2, transformiert, und Transformanten wurden mittels Ampicillinselektion isoliert.

[0107] Plasmide wurden aus einer Anzahl von Transformanten hergestellt, und ein als pS312 ([Fig. 14](#)) bezeichnetes Plasmid, welches das gewünschte Konstrukt enthält, wurde für weitere Experimente verwendet.

[0108] Um eine Modifikation von pS311 zu erhalten, in welchem die stromabwärts des Stop-Codons gelegene BamHI-Stelle in eine Sall-Stelle umgewandelt war, um eine weitere Klonierung zu erleichtern, wurde das folgende Verfahren angewandt: Das Plasmid pS311 wurde durch partiellen BamHI-Verdau linearisiert. Das linearisierte Fragment wurde isoliert, und ein synthetischer DNA-Linker, welcher BamHI zu einer Sall-Stelle umwandelt (5'-GATCGTTCGAC-3'), wodurch die BamHI-Stelle zerstört wird, wurde inseriert. Da es zwei potentielle Positionen für die Integration des synthetischen Linkers gab, wurden die resultierenden Plasmide durch Restriktionsenzym-Spaltung analysiert. Ein Plasmid, bei welchem der Linker an der gewünschten Position stromabwärts von Exon 11 inseriert worden war, wurde isoliert und als pS313 bezeichnet.

[0109] Um das letztendliche Expressionsvektorkonstrukt, beinhaltend die genomischen humanen BSSL-Varianten-Sequenzen, zu erhalten, wurde ein existierender Expressionsvektor pS314 verwendet, der entworfen war, um eine stadium- und gewebespezifische Expression in den Brustdrüsenzellen während Lactations-Perioden zu vermitteln. Das Plasmid pS314 enthält ein genomisches Fragment aus dem Gen für Saures Maus-Molkeprotein (WAP) (Campbell et al., 1984), welches als ein NotI-Fragment kloniert ist. Das genomische Fragment besitzt ungefähr 4,5 kb an stromaufwärts gelegenen regulatorischen Sequenzen (URS, upstream

regulatory sequences), alle vier Maus-WAP-Exons und alle Intronsequenzen sowie etwa 3 kb an Sequenz, stromabwärts zum letzten Exon. Eine einmalige KpnI-Stelle ist im ersten Exon 24 bp stromaufwärts des natürlichen WAP-Translations-Initiationscodons lokalisiert. Eine andere einmalige Restriktionsenzymstelle ist die Sall-Stelle, welche in Exon 3 lokalisiert ist.

[0110] Die genomische menschliche BSSL-Varianten-Sequenz wurde zwischen diese Stellen, KpnI und Sall, durch die folgende Strategie inseriert: Zuerst wurde pS314 mit KpnI und Sall verdaut, und ein Fragment, repräsentierend das gespaltene Plasmid, wurde elektrophoretisch isoliert. Als Zweites wurde pS312 mit KpnI und BamHI verdaut, und ein ungefähr 4,7 kb großes Fragment, repräsentierend den 5'-Teil des menschlichen BSSL-Gens, wurde isoliert. Drittens, wurde pS313 mit BamHI und Sall verdaut, und der 3'-Teil des menschlichen BSSL-Gens wurde isoliert. Diese drei Fragmente wurden ligiert, in kompetente E. coli-Bakterien transformiert, und Transformanten wurden nach Ampicillin-Selektion isoliert.

[0111] Plasmide wurden aus mehreren Transformanten hergestellt und sorgfältig mittels Restriktionsenzym-Kartierung und Sequenzanalyse analysiert. Ein Plasmid, welches den gewünschten Expressionsvektor repräsentiert, wurde definiert und als pS317 bezeichnet ([Fig. 15](#)).

[0112] Um die prokaryotischen Plasmidsequenzen zu entfernen, wurde pS317 mit NotI verdaut. Das rekombinante Vektorelement, bestehend aus Maus-WAP-Sequenz, flankierend das genomische humane BSSL-Varianten-Fragment, wurde dann durch Agarose-Elektrophorese isoliert. Das isolierte Fragment wurde weiter unter Anwendung von Elektroelution gereinigt, bevor es in Maus-Embryonen injiziert wurde.

[0113] Das rekombinante Gen für die Expression der humanen BSSL-Variante in Milch aus transgenen Mäusen ist in der [Fig. 16](#) gezeigt.

3.2. ERZEUGUNG VON TRANSGENEN TIEREN

[0114] Ein NotI-Fragment wurde aus dem Plasmid pS317 gemäß Abschnitt 3.1 isoliert. Dieses DNA-Fragment enthielt den Maus-WAP-Promotor, verknüpft an eine genomische Sequenz, welche die humane BSSL-Variante codiert. Das isolierte Fragment wurde bei einer Konzentration von 3 ng/μl in den Pronukleus von 350 C57B1/6JxCBA/2J-f₂-Embryonen injiziert, welche aus Spendermäusen erhalten wurden, die für eine Superovulation mit 5 IU an Serum-Gonadotropin aus schwangeren Stuten gepriemt worden waren. Die C57B1/6JxCBA/2J-f₁-Tiere wurden vom "Bomholtgård Breeding and Research Centre" LTD, Ry, Dänemark, erhalten. Nach Auffangen der Embryonen aus den Eileitern, wurden sie von den Cumuluszellen durch Behandlung mit Hyaluronidase im Medium M2 (Hogan et al., 1986) getrennt. Nach Waschen wurden die Embryonen in das Medium M16 (Hogan et al., 1986) überführt und in einem Inkubator mit 5 % CO₂-Atmosphäre gehalten. Die Injektionen wurden in einem Mikrotröpfchen von M2 unter Leicht-Paraffinöl durch Verwendung von hydraulischen Narishigi-Mikromanipulatoren und eines inversen Nikon-Mikroskops, welches mit einer Optik von Nomarski ausgestattet war, durchgeführt. Nach der Injektion wurden 267 gesund aussehende Embryonen in 12 pseudoschwangere C57B1/6JxCBA/2J-f₁-Empfänger implantiert, denen man 0,37 ml 2,5 % Avertin intraperitoneal verabreichte. Mäuse, welche das Transgen integriert hatten, wurden mittels PCR-Analyse von DNA aus Schwanzbiopsieproben identifiziert, welche drei Wochen nach der Geburt der Tiere erhalten wurden. Positive Ergebnisse wurden mittels Southern-Blot-Analyse bestätigt.

[0115] Für das Absammeln der Milch erhielten weibliche Taktierende Tiere intraperitoneal eine Injektion mit 2 IU Oxytocin und wurden 10 Minuten später mit 0,40 ml 2,5 % Avertin intraperitoneal betäubt. Eine Milchsammelvorrichtung wurde über einen silikonisierten Schlauch an der Zitze angebracht, und Milch wurde durch sanftes Massieren der Brustdrüse in ein 1,5 ml großes Eppendorf-Röhrchen abgesammelt. Die Menge an Milch schwankte abhängig vom Tag der Laktation zwischen 0,1 und 0,5 ml pro Maus und Absammlung.

3.3. EXPRESSION VON BSSL-VARIANTE IN TRANSGENEN MÄUSEN

[0116] Transgene Mäuse wurden durch Analyse von DNA identifiziert, welche aus herausgeschnittenen Schwanzproben präpariert worden war. Die Gewebeproben wurden mit Proteinase K inkubiert und mittels Phenol/Chloroform extrahiert. Die isolierte DNA wurde in Polymerasekettenreaktionen mit Primern verwendet, welche spezifische Fragmente amplifizieren, wenn die heterologe, eingeführte DNA vorhanden ist, welche das Expressionsvektor-Fragment repräsentiert. Die Tiere wurden auch mittels DNA-Hybridisierungs-Experimenten analysiert, um die PCR-Daten zu bestätigen und hinsichtlich möglicher Rearrangements, der Struktur der integrierten Vektorelemente zu testen und Informationen über die Kopienzahl an integrierten Vektorelementen zu erhalten.

[0117] In einem Satz von Experimenten wurden 31 Mäuse mit den zwei Verfahren analysiert, und die Ergebnisse zeigten, dass 1 Maus das aus pS317 abgeleitete heterologe DNA-Vektorelement trug. Das Ergebnis aus der PCR-Analyse und den Hybridisierungsergebnissen war identisch (**Fig. 17**). Insgesamt wurde von 10 aus 65 getesteten Tieren gefunden, dass sie hinsichtlich pS317 transgenisch waren.

[0118] Die Maus, von welcher identifiziert wurde, das Vektor-DNA-Element zu tragen (Gründertier), wurde dann gekreuzt, und der F1-Wurf wurde hinsichtlich des Transgens mittels der gleichen Verfahrensweisen analysiert.

[0119] Aus verschiedenen Geweben von pS317-transgenen Weibchen während der Laktation isolierte RNA ist durch Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Membranen gebロットet und mit ³²P-markierter BSSL-cDNA als einer Sonde hybridisiert worden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass während der Laktation die Expression auf die Brustdrüse begrenzt ist (**Fig. 18**).

[0120] Milchproben wurden aus dem betäubten Gründertier, welches zur Induktion der Laktation mit Oxytocin behandelt worden war, gesammelt und hinsichtlich des Vorliegens von rekombinanter menschlicher BSSL-Variante analysiert. Dies wurde durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulosemembranen und Inkubation mit polyklonalen Antikörpern bewerkstelligt, welche gegen native humane BSSL erzeugt worden waren. Die erhaltenen Ergebnisse demonstrierten die Expression von rekombinanter humaner BSSL-Variante in Milch aus transgenen Mäusen. Die **Fig. 19** verdeutlicht das Vorliegen von rekombinanter humaner BSSL-Variante in Milch aus transgenen Mäusen. SDS-PAGE-Trennung und Immunoblotting von Milchproben, welche aus verschiedenen pS317-transgenen Mäusen abgeleitet wurden, zeigen eine effiziente Produktion einer rekombinanten BSSL-Variante mit reduziertem scheinbarem Molekulargewicht im Vergleich zu rekombinanter Vollängen-BSSL, die aus der Milch einer Maus abgeleitet worden war, die hinsichtlich pS314 transgenisch war. Das Plasmid pS314 ist ähnlich zu pS317 mit der Ausnahme, dass pS314 menschliche Vollängen-BSSL-cDNA anstatt der genomischen Variante enthält. Die Doppelbande, welche in allen Mäusemilchproben offensichtlich ist, repräsentiert Maus-BSSL und zeigt daher die Kreuzreaktivität des Antiserums. Diese Folgerung wird ferner durch die Beobachtung unterstützt, dass diese Doppelbande in der Spur 9 von **Fig. 19** offensichtlich ist, welche gereinigtes Maus-BSSL enthält.

[0121] Stabile Linien von transgenen Tieren werden erzeugt.

[0122] In einer ähnlichen Weise können andere transgene Tiere, wie Kaninchen, Kühe oder Schafe, welche zur Expression von menschlichen BSSL-Varianten in der Lage sind, hergestellt werden.

HINTERLEGUNGEN

[0123] Die folgenden Plasmide sind gemäß des Budapester Vertrags bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) hinterlegt worden:

Plasmid	Hinterlegungs-Nr.	Datum der Hinterlegung
pS309	DSM 7101	12. Juni 1992
pS310	DSM 7102	
pS311	DSM 7103	
pS317	DSM 7104	
pS147	DSM 7495	26. Februar 1993
pS257	DSM 7496	
pS299	DSM 7497	
pS258	DSM 7501	3. März 1993
pS259	DSM 7502	

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0124] **Fig. 1**

A. Karte des BPV-basierenden Vektors, welcher für die Expression der verschiedenen BSSL-Varianten ver-

wendet wurde.

B. Schematische Wiedergabe der verschiedenen analysierten BSSL-Varianten. FL bezeichnet die Volllängen-BSSL. Die aktive Stelle ist durch einen Kreis angegeben, und die Stelle für das potentielle N-verknüpfte Kohlenhydrat ist durch ein Dreieck gezeigt. Die Region, welche die Wiederholungseinheiten enthält, ist als eine gestreifte Fläche und der konservierte C-Terminus als eine ausgefüllte Fläche gezeigt.

[0125] Fig. 2 Southern-Blot-Analyse von DNA aus Zelllinien, welche BSSL-Varianten exprimieren. DNA, hergestellt aus Zelllinien, exprimierend Volllängen-BSSL (FL), Variante A (A), Variante B (B), Variante C (C) und Variante N (N), wurde analysiert. 5 µg der jeweiligen präparierten zellabgeleiteten DNA (links) und 1 ng gereinigte aus Bakterien abgeleitete Vektor-DNA (rechts) wurde mit BamHI verdaut. Die DNA-Proben wurden auf einem Agarosegel getrennt, auf 'GeneScreen Plus'-Membran überführt und mit ³²P-markierter menschlicher BSSL-cDNA hybridisiert.

[0126] Fig. 3 Northern-Blot-Analyse von RNA aus isolierten Zelllinien, welche rekombinante BSSL-Varianten exprimieren. 10 µg Gesamt-RNA, hergestellt aus Zelllinien, welche Volllängen-BSSL (FL), Variante A (A), Variante B (B), Variante C (C), Variante N (N) herstellen, wurden analysiert. RNA aus einer C127-Zelllinie, welche einen BPV-Vektor beinhaltet, identisch zu dem Vektor in **Fig. 1** mit der Ausnahme, dass er ein zu BSSL nicht-verwandtes Protein codiert, wurde als Negativkontrolle (–) (obere Tafel) verwendet. Die Filter wurden mit ³²P-markierter hybridisiert. Der Filter wurde dann mit einer Maus-β-Actin-cDNA-Sonde nochmals hybridisiert. Die β-Actin-mRNA-Signale (untere Tafeln) wurden als eine interne Kontrolle für die Mengen an RNA, welche auf jede Spur aufgetragen wurden, verwendet.

[0127] Fig. 4 Expression von BSSL-Aktivität in C127-Zellen, welche mit Volllängen- und mutierten Formen von humanem BSSL transfiziert worden waren. C127-Zellen wurden mit verschiedenen BSSL-Konstrukten transfiziert: Volllängen-BSSL (FL), Variante N (N), Variante C (C), Variante B (B), Variante A (A). Nach der anfänglichen Wachstumsperiode wurden individuelle Klone selektiert und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Die Anzahl an selektierten Klonen (n) ist in der Figur angegeben. Lipaseaktivität wurde auf den konditionierten Medien bestimmt. Die Werte sind als µmol freigesetzte freie Fettsäure × min⁻¹ × ml konditioniertes Medium⁻¹ ausgedrückt.

[0128] Fig. 5

A. Western-Blotting von Volllängen- und mutierter rekombinanter BSSL. Die Mengen an Lipaseaktivität, ausgedrückt als µmol freigesetzte Fettsäure × min⁻¹, welche auf das Gel aufgetragen wurden, beliefen sich auf: Volllänge 0,2 (Spur 1), Variante N 0,16 (Spur 2), Variante C 0,6 (Spur 3), Variante B 0,8 (Spur 4) und native BSSL 0,1 (Spur 5). Das verwendete Antiserum wurde in Kaninchen gegen BSSL, welche aus menschlicher Milch gereinigt worden war, herangezogen. Die Position von Größen-Markern (vorgefärbte SDS-PAGE-Standards, 'Low Range', BioRad) sind auf der linken Seite angezeigt.

B. Western-Blot von mit N-Glycosidase F behandelte Variante B. Die Variante B wurde mit N-Glycosidase F verdaut, wie beschrieben in "Experimentelle Vorgehensweisen". Die Spur 1 zeigt unbehandelte und die Spur 2 behandelte Variante B.

[0129] Fig. 6 Gallensalzabhängigkeit von Volllängen- und mutierter BSSL. Die Lipase-Aktivität wurde in Gegenwart von variierenden Konzentrationen an Natriumcholat (durchgezogene Linien) oder Natriumdesoxycholat (unterbrochene Linien) auf konditionierten Medien von rekombinanter Volllängen-BSSL (*), Variante A (□), Variante B (▲), Variante C (■), Variante N (•) und gereinigter menschlicher Milch-BSSL (o) bestimmt. Für die A-Variante wurde konditioniertes Medium auf Blue-Sepharose konzentriert, wie beschrieben unter "Experimentelle Vorgehensweisen". Die Menge der jeweiligen Enzymquelle wurde gewählt, um den gleichen Spiegel an Maximalaktivität zu erhalten, außer für Variante A, welche eine Maximalaktivität von lediglich einem Zehntel der anderen aufwies. Kontrollexperimente zeigten, dass die Wachstumsmedien den Spiegel an Aktivität oder die Gallensalz-Abhängigkeit von nativer BSSL nicht beeinflussten (Daten nicht gezeigt).

[0130] Fig. 7

A. Northern-Blot von BSSL, hergestellt durch verschiedene Stämme von E. coli unter Verwendung von pGEMEX. Die Bakterien wurden mittels IPTG induziert, wie beschrieben in "Experimentelle Vorgehensweisen". Die Experimentbedingungen waren, wie in der Legende zu **Fig. 2** beschrieben, beschaffen. Spur 1: Stamm BL21(DE3)pLysS, nicht induziert; Spur 2: Stamm BL21(DE3)pLysS, induziert; Spur 3: Stamm JM109(DE3), nicht induziert; Spur 4: Stamm JM109(DE3), induziert.

B. Western-Blot, unter Verwendung von Antikörpern gegen gereinigte Milch-BSSL, von einer 8-18 % SDS-PAGE, welche die Expression von rekombinanter BSSL in verschiedenen Stämmen von E. coli unter Verwendung von pGEMEX zeigt. Die Bakterien wurden mit IPTG induziert, und zytoplasmatische und peri-

plasmatische Proteine wurden aus dem Lysat präpariert, wie beschrieben in den experimentellen Vorgehensweisen. Die Mengen an Bakterienproteinen, aufgetragen in Spur 2-5 (periplasmatische Präparationen) und 7 – 10 (zytoplasmatische Präparationen), repräsentieren das gleiche Kulturvolumen, was die Färbung proportional zum Produktionsniveau sein lässt. Spur 1: Pharmacia-Molekular-Größenmarker; Spuren 2 und 8: Stamm JM109(DE3), induziert; Spuren 3 und 7: Stamm JM109(DE3), nicht induziert; Spuren 4 und 10: Stamm BL21(DE3)pLysS, induziert; Spuren 5 und 9: Stamm BL21(DE3)pLysS, nicht induziert; Spur 6: 25 ng gereinigte native Milch-BSSL.

[0131] Fig. 8 SDS-PAGE gereinigter rekombinanter BSSL und BSSL-Varianten. Rekombinante Vollängen-BSSL (FL) und BSSL-Varianten N, B und C wurden wie beschrieben gereinigt. Jeweils 3 µg, außer für Variante B, von welcher 1,5 µg verwendet wurden, wurden aufgetragen. 5 µg gereinigte native Milch-BSSL (NAT) wurde aufgetragen. Die Position der Größenmarker ist auf der linken Seite angezeigt.

[0132] Fig. 9 Effekt von Natriumdesoxycholat auf die Aktivierung von rekombinanter BSSL und BSSL-Varianten durch Natriumcholat. Gereinigte Präparationen von rekombinanter Vollängen-BSSL (•), rekombinanten BSSL-Varianten B (o), C (■) und N (▲) sowie gereinigter nativer Milch-BSSL (□) wurden hinsichtlich Lipase-Aktivität bei verschiedenen Konzentrationen an Natriumcholat in Abwesenheit (linke Tafel) und in Gegenwart von 5 mM (mittlere Tafel) oder 10 mM (rechte Tafel) Desoxycholat geassayt.

[0133] Fig. 10 Stabilität rekombinanter BSSL und BSSL-Varianten bei unterschiedlichem pH-Wert. Native BSSL, rekombinante Vollängen-BSSL und BSSL-Varianten wurden bei 37 °C in unterschiedlichen Puffern mit pH 2 – 8 inkubiert. Alle Puffer enthielten 1 mg/ml Rinderserumalbumin. Nach 30 Minuten wurden Aliquots entnommen und hinsichtlich Lipase-Aktivität geassayt. Für die Erklärung der Symbole siehe die Legende zu [Fig. 9](#).

[0134] Fig. 11 Wärmestabilität rekombinanter BSSL und BSSL-Varianten. Gereinigte rekombinante Vollängen-BSSL, BSSL-Varianten und native Milch-BSSL wurden bei den angegebenen Temperaturen in 50 mM Tris-Cl-Puffer, pH 7,5 inkubiert. Zu einem Satz von Proben wurde Rinderserumalbumin (BSA) zu 1 mg/ml zugegeben. Nach 30 Minuten wurden Proben entnommen und hinsichtlich Lipase-Aktivität geassayt. Die Aktivitäten sind als Prozentsatz der Aktivität für jede Probe bei 0 Minuten ausgedrückt. Für die Erklärung von Symbolen siehe die Legende zu [Fig. 9](#).

[0135] Fig. 12 Effekt von Gallensalzen auf die Inaktivierung rekombinanter BSSL- und BSSL-Varianten durch Trypsin. Gereinigte rekombinante Vollängen-BSSL, BSSL-Varianten und native Milch-BSSL (15 µl, enthaltend 1 – 4 µg) wurden zu 60 µl 1,0 M Tris-Cl, pH 7,4, mit 10 µg Trypsin (TPCK-Trypsin, Boehringer-Mannheim) bei 25 °C in Abwesenheit (unterbrochene Linien) und in Gegenwart (durchgezogene Linien) von 10 mM Natriumcholat zugegeben. An den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und hinsichtlich Lipase-Aktivität geassayt. Die Werte sind als Prozentsatz von Werten ausgedrückt, welche in Kontroll-Inkubationen in Abwesenheit von Trypsin erhalten wurden. Für eine Erklärung der Symbole siehe die Legende zu [Fig. 9](#).

[0136] Fig. 13 Verfahren zur Herstellung des Plasmids pS317. Für weitere Details, siehe Abschnitt 3.1.

[0137] Fig. 14 Schematische Struktur des Plasmids pS312.

[0138] Fig. 15 Schematische Struktur des Plasmids pS317.

[0139] Fig. 16 Physikalische Karte, welche die physikalische Einführung einer humanen genomischen BSSL-Varianten-Struktur in das erste Exon des WAP-Gens, wie beschrieben in Abschnitt 3.1, repräsentiert.

[0140] Fig. 17

A. Schematische Wiedergabe der Lokalisierung von PCR-Primern, welche für die Identifizierung von transgenen Tieren verwendet wurden. Der 5'-Primer ist innerhalb der WAP-Sequenz positioniert, beginnend an der Position –148 bp stromaufwärts der Fusion zwischen dem WAP und der BSSL-Variante. Der 3'-Primer ist im ersten BSSL-Variante-Intron, endend 400 bp stromabwärts vom Fusionspunkt, lokalisiert.

B. Die Sequenzen der verwendeten PCR-Primer.

C. Agarosegel, welches eine typische Analyse der PCR-Analyse der potentiellen Gründertiere zeigt. M: Molekulargewichtsmarker. Spur 1: Kontroll-PCR-Produkt, erzeugt von dem Plasmid pS317. Spuren 2-13: PCR-Reaktionen, durchgeführt mit DNA-Präparationen aus potentiellen Gründertieren.

[0141] Fig. 18 Northern-Blot-Analyse von RNA, hergestellt aus verschiedenen Geweben, welche aus einer

weiblichen Maus isoliert wurden, die hinsichtlich pS317 transgenisch ist. Die Gewebe wurden am Tag 4 der Laktation isoliert. 10 µg Gesamt-RNA aus jedem Gewebe wurden mittels Agarose-Formaldehyd-Trennung analysiert, auf Membranen überführt und mit ³²P-markierter menschlicher BSSL-cDNA hybridisiert. Die Spuren enthalten Mg: Brustdrüse; Li: Leber; Ki: Niere; Sp: Milz; He: Herz; Lu: Lunge; Sg: Speicheldrüse; Br: Gehirn. RNA-Größen in Nukleotiden sind auf der linken Seite angegeben.

[0142] **Fig. 19** Western-Blotting von Milch, welche aus pS317-transgenen Mäusen und Mäusen, welche hinsichtlich eines Vollängen-cDNA-Vektors pS314 transgenisch sind, und aus Kontrolltieren erhalten wurde. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Immobilon-Filter überführt und mit Antiserum immunogelottet, welches gegen native humane BSSL erzeugt worden war. Spur 1: Molekulargewichtsmarker; Spuren 2, 3 und 4: 2 µl Milch aus drei F1-Töchtern (F1 30, 31 und 33) von pS317-Gründer F0 #91; Spur 5: 2 µl Milch aus pS314-Gründer #90. Spuren 6, 7 und 8: 2 µl Milch aus drei nicht-BSSL-transgenen Tieren; Spur 9: gereinigte Maus-BSSL; Spur 10: gereinigte humane native BSSL.

LITERATUR-BEZUGSTELLEN

- Abouakil, N., Rogalska, E., und Lombardo, D. (1989): *Biochim. Biophys. Acta* 1002, 225-230
- Atkinson, S.A., Bryan, M.H., und Andersson, G.H. (1981): *J. Pediatr.* 99, 617-624
- Ausubel, AM., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Hrsg.) in: *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York; Ausgabe von 1992)
- Baba, T., Downs, D., Jackson, K.W., Tang, J., und Wang, C.S. (1991): *Biochemistry* 30, 500-510.
- Bernbäck, S., Bläckberg, L., und Hernell, O. (1990): *J. Clin. Invest.* 85, 1221-1226
- Björkstén, B., Burman, L.G., deChateau, P., Fredrikzon, B., Gothefors, L. & Hernell, O. (1980): *Br. Med. J.* 201, 267-272.
- Bläckberg, L. & Hernell, O. (1981): *Eur. J. Biochem* 116, 221-225.
- Bläckberg, L. und Hernell, O. (1983): *FEBS Lett.* 157, 337-341
- Campbell, S.M., Rosen, J.M., Hennighausen, L.G., Strehl-Jurk, U., und Sippel, A.E. (1984): *Nucleic Acid Res.* 12, 8685-8697.
- Chappell, J.E., Clandinin, M.T., Kearney-Volpe, C., Reichman, B., und Swyer, P. W. (1986): *J. Pediatr.* 108, 439-447
- Fontaine, R., Carter, C., und Hui, D. (1991): *Biochemistry* 30, 7008-1014
- Graham, F.L. und Van der Eb, A.J. (1973): *Virology* 52, 456-467
- Hamosh, M., Freed, L.M., York, C.M., Sturman, J.A., und Hamosh, P (1986): *Fed. Proc.* 45, 1452
- Han, J.H., Stratowa, C., und Rutter, W.J. (1987): *Biochemistry* 26, 1617-1625
- Hennighausen, L., Ruiz, L. & Wall, R. (1990): *Current Opinion in Biotechnology* 1, 74-78.
- Hernell, O. (1975): *Eur. J. Clin. Invest.* 5, 267-272
- Hernell, O., Bläckberg, L., und Lindberg, T. in: *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy* (Hrsg.: Le-benthal, E.) S. 209-217 (Raven Press, New York 1989)
- Hernell, O., Staggers, J.E. und Carey, M.C. (1990): *Biochemistry* 29, 2041-2056
- Hernell, O. und Bläckberg, L. in: *Encyclopedia of human biology* (Hrsg.: Dulbecco, R.) Band 3, S. 47-56 (Aca-demic Press, San Diego 1991)
- Hernell, O., Bläckberg, L., Chen, Q., Sternby, B. und Nilsson, Å. (1993): *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (im Druck)
- Hogan, B., Constantini, F. und Lacy, E. (1986): *Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hui, D. und Kissel, J.A. (1990): *Febs Lett.* 276, 131-134.
- Kyger, E.M., Wiegand, R.C., und Lange, L.G. (1989): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 1302-1309
- Laemmli, U.K. (1970): *Nature (London)* 227, 680-685
- Lidberg, U., Nilsson, J., Strömberg, K., Stenman, G., Sahlin, P, Enerbäck, S.G. und Bjursell, G. (1992): *Geno-mics* 13, 630-640
- Lusky, M., und Botchan, M.R. (1984): *Cell* 36, 391-401
- Nilsson, J., Bläckberg, L., Carlsson, P., Enerbäck, S., Hernell, O. und Bjursell, G. (1990): *Eur. J. Biochem.* 192, 543-550.
- Pavlakakis, G.N., und Hamer, D.H. (1983): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 397-401
- Reue, K., Zambaux, J., Wong, H., Lee, G., Leete, T.H., Ronk, M., Shively, J.E., Sternby, B., Borgström, B., Ameis, D. und Schott, M.C. (1991): *J. Lipid. Res.* 32, 267-276.
- Sarver, N., Byrne, J.C., und Howell, P.M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7147-7151
- Studier, F.W. und Moffat, B.A. (1986): *J. Mol. Biol.* 189, 113-130
- Williamson, S., Finucane, E., Ellis, H., und Gamsu, H.R. (1978): *Arch. Dis. Childhood* 53, 555-563

SEQUENZAUFLISTUNG

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER

- (A) NAME: AB ASTRA
- (B) STRASSE: Kvarnbergagatan 16
- (C) STADT: Sodertalje
- (E) LAND: Schweden
- (F) POSTLEITZAHL (ZIP): S-151 85
- (G) TELEFON: +46-8-553 260 00
- (H) TELEFAX: +46-8-553 288 20
- (I) TELEX: 19237 astra s

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Neue Polypeptide

(iii) ANZAHL VON SEQUENZEN: 9

(iv) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) MEDIUMTYP: Floppy-Diskette
- (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(vi) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN :

- (A) ANMELDUNGS-NUMMER: SE 9300686-4
- (B) EINREICHUNGSDATUM: 01-MÄRZ-1993

(vi) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN :

- (A) ANMELDUNGS-NUMMER: SE 9300722-7
- (B) EINREICHUNGSDATUM: 04-MÄRZ-1993

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 1:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2428 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) ORIGINAL-QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(F) GEWEBETYP: Brustdrüse

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LOKALISIERUNG: 82..2319

(D) WEITERE INFORMATION: /product= "gallensalz-stimulierte Lipase"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon

(B) LOKALISIERUNG: 985..1173

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon

(B) LOKALISIERUNG: 1174..1377

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon

(B) LOKALISIERUNG: 1378..1575

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon

(B) LOKALISIERUNG: 1576..2415

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: reifes_peptid

(B) LOKALISIERUNG: 151..2316

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: polyA_signal

(B) LOKALISIERUNG: 2379..2402

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_region
- (B) LOKALISIERUNG: 1756..2283

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LOKALISIERUNG: 1..81

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1756..1788

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1789..1821

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1822..1854

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1855..1887

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1888..1920

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1921..1953

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1954..1986

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1987..2019

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 2020..2052

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 2053..2085

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 2086..2118

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 2119..2151

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 2152..2184

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 2185..2217

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 2218..2250

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 2251..2283

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 1:

ACCTTCTGTA TCAGTTAACT GTCAAGATGG AAGGAACRGC AGTCTCAAGA TAATGCAAAG	60
AGTTTATTCA TCCAGAGGCT G ATG CTC ACC ATG GGG CGC CTG CAA CTG GTT Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val -23 -20 -15	111
GTG TTG GGC CTC ACC TGC TGC TGG GCA GTG GCG AGT GCC GCG AAG CTG Val Leu Gly Leu Thr Cys Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu -10 -5 1	159
GGC GCC GTG TAC ACA GAA GGT GGG TTC GTG GAA GGC GTC AAT AAG AAG Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys 5 10 15	207
CTC GGC CTC CTG GGT GAC TCT GTG GAC ATC TTC AAG GGC ATC CCC TTC Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe 20 25 30 35	255
GCA GCT CCC ACC AAG GCC CTG GAA AAT CCT CAG CCA CAT CCT GGC TGG Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp 40 45 50	303
CAA GGG ACC CTG AAG GCC AAG AAC TTC AAG AAG AGA TGC CTG CAG GCC Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala 55 60 65	351
<hr/>	
ACC ATC ACC CAG GAC AGC ACC TAC GGG GAT GAA GAC TGC CTG TAC CTC Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu 70 75 80	399
AAC ATT TGG GTG CCC CAG GGC AGG AAG CAA GTC TCC CGG GAC CTG CCC Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro 85 90 95	447
GTT ATG ATC TGG ATC TAT GGA GGC GCC TTC CTC ATG GGG TCC GGC CAT Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His 100 105 110 115	495
GGG GCC AAC TTC CTC AAC AAC TAC CTG TAT GAC GGC GAG GAG ATC GCC Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala 120 125 130	543
ACA CGC GGA AAC GTC ATC GTG GTC ACC TTC AAC TAC CGT GTC GGC CCC Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro 135 140 145	591

CTT GGG TTC CTC AGC ACT GGG GAC GCC AAT CTG CCA GGT AAC TAT GGC Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly 150 155 160	639
CTT CGG GAT CAG CAC ATG GCC ATT GCT TGG GTG AAG AGG AAT ATC GCG Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg Asn Ile Ala 165 170 175	687
GCC TTC GGG GGG GAC CCC AAC AAC ATC ACG CTC TTC GGG GAG TCT GCT Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala 180 185 190 195	735
GGA GGT GCC AGC GTC TCT CTG CAG ACC CTC TCC CCC TAC AAC AAG GGC Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr Asn Lys Gly 200 205 210	783
CTC ATC CGG CGA GCC ATC AGC CAG AGC GGC GTG GCC CTG AGT CCC TGG Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu Ser Pro Trp 215 220 225	831
GTC ATC CAG AAA AAC CCA CTC TTC TGG GCC AAA AAG GTG GCT GAG AAG Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val Ala Glu Lys 230 235 240	879
GTG GGT TGC CCT GTG GGT GAT GCC GCC AGG ATG GCC CAG TGT CTG AAG Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln Cys Leu Lys 245 250 255	927
GTT ACT GAT CCC CGA GCC CTG ACG CTG GCC TAT AAG GTG CCG CTG GCA Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Pro Leu Ala 260 265 270 275	975
GGC CTG GAG TAC CCC ATG CTG CAC TAT GTG GGC TTC GTC CCT GTC ATT Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val Pro Val Ile 280 285 290	1023
GAT GGA GAC TTC ATC CCC GCT GAC CCG ATC AAC CTG TAC GCC AAC GCC Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr Ala Asn Ala 295 300 305	1071
GCC GAC ATC GAC TAT ATA GCA GCC ACC AAC AAC ATG GAC GGC CAC ATC Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp Gly His Ile 310 315 320	1119
TTC GCC AGC ATC GAC ATG CCT GCC ATC AAC AAG GGC AAC AAG AAA GTC Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn Lys Lys Val 325 330 335	1167
ACG GAG GAG GAC TTC TAC AAG CTG GTC AGT GAG TTC ACA ATC ACC AAG Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr Ile Thr Lys 340 345 350 355	1215
GGG CTC AGA GGC GCC AAG ACG ACC TTT GAT GTC TAC ACC GAG TCC TGG Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr Glu Ser Trp 360 365 370	1263
GCC CAG GAC CCA TCC CAG GAG AAT AAG AAG AAG ACT GTG GTG GAC TTT Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val Val Asp Phe 375 380 385	1311
GAG ACC GAT GTC CTC TTC CTG GTG CCC ACC GAG ATT GCC CTA GCC CAG Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala Leu Ala Gln 390 395 400	1359
CAC AGA GCC AAT GCC AAG AGT GCC AAG ACC TAC GCC TAC CTG TTT TCC His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr Leu Phe Ser 405 410 415	1407

CAT His 420	CCC Pro	TCT Ser	CGG Arg	ATG Met	CCC Pro 425	GTC Val	TAC Tyr	CCC Pro	AAA Lys	TGG Trp 430	GTG Val	GGG Gly	GCC Ala	GAC Asp	CAT His 435	1455
GCA Ala	GAT Asp	GAC Asp	ATT Ile	CAG Gln 440	TAC Tyr	GTT Val	TTC Phe	GGG Gly	AAG Lys 445	CCC Pro	TTC Phe	GCC Ala	ACC Thr	CCC Pro 450	ACG Thr	1503
GCC Gly	TAC Tyr	CGG Arg	CCC Pro 455	CAA Gln	GAC Asp	AGG Arg	ACA Thr	GTC Val 460	TCT Ser	AAG Lys	GCC Ala	ATG Met	ATC Ile 465	CCC Ala	TAC Tyr	1551
TGG Trp	ACC Thr	AAC Asn 470	TTT Phe	GCC Ala	AAA Lys	ACA Thr	GGG Gly 475	GAC Asp	CCC Pro	AAC Asn	ATG Met	GGC Gly 480	GAC Asp	TCG Ser	GCT Ala	1599
GTG Val 485	CCC Pro	ACA Thr	CAC His	TGG Trp	GAA Glu 490	CCC Pro	TAC Tyr	ACT Thr	ACG Thr	GAA Glu 495	AAC Asn	AGC Ser	GGC Gly	TAC Tyr	CTG Leu	1647
GAG Glu 500	ATC Ile	ACC Thr	AAG Lys	AAG Lys	ATG Met 505	GGC Gly	AGC Ser	AGC Ser	TCC Ser	ATG Met 510	AAG Lys	CGG Arg	AGC Ser	CTG Leu	AGA Arg 515	1695
ACC Thr	AAC Asn	TTC Phe	CTG Leu	CGC Arg 520	TAC Tyr	TGG Trp	ACC Thr	CTC Leu	ACC Thr 525	TAT Tyr	CTG Leu	GCG Ala	CTG Leu	CCC Pro 530	ACA Thr	1743
GTG Val	ACC Thr	GAC Asp	CAG Gln 535	GAG Glu	GCC Ala	ACC Thr	CCT Pro	GTG Val 540	CCC Pro	CCC Pro	ACA Thr	GGG Gly	GAC Asp 545	TCC Ser	GAG Glu	1791
GCC Ala	ACT Thr	CCC Pro 550	GTG Val	CCC Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Asp 555	GAC Asp	TCC Ser	GAG Glu	ACC Thr	GCC Ala 560	CCC Pro	GTG Val	CCG Pro	1839
CCC Pro 565	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	GGG Gly 570	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val	CCG Pro 575	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	1887
GGG Gly 580	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val	CCG Pro 585	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser 590	GGG Gly	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val 595	1935
CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp 600	TCC Ser	GGG Gly	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val 605	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp 610	1983
TCC Ser	GGG Gly	GCC Ala	CCC Pro 615	CCC Pro	GTG Val	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr 620	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	GGG Gly 625	GCC Ala 625	CCC Pro	CCC Pro	2031
GTG Val	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	GGC Gly 635	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val 640	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	2079
GAC Asp 645	GCC Ala	GGG Gly	CCC Pro	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val 650	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp 655	TCC Ser	GGC Gly	GCC Ala	CCC Pro	2127
CCC Pro 660	GTG Val	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly 665	GAC Asp	TCC Ser	GGG Gly	GCC Ala	CCC Pro 670	CCC Pro	GTG Val	ACC Thr	CCC Pro	ACG Thr 675	2175
GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	GAG Glu	ACC Thr 680	GCC Ala	CCC Pro	GTG Val	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr 685	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	GGG Gly 690	GCC Ala	2223

```

CCC CCT GTG CCC CCC ACG GGT GAC TCT GAG GCT GCC CCT GTG CCC CCC      2271
Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro Val Pro Pro
      695              700              705

ACA GAT GAC TCC AAG GAA GCT CAG ATG CCT GCA GTC ATT AGG TTT TAGCGTCCCA  2326
Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe
      710              715              720

TGAGCCTTGG TATCAAGAGG CCACAAGAGT GGGACCCAG GGGCTCCCT CCCATCTTGA      2386

GCTCTTCTCTG AATAAAGCCT CATACCCCTA AAAAAAAAAA AA                        2428

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 2:**(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:**

- (A) LÄNGE: 745 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein**(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 2:**

```

Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val Val Leu Gly Leu Thr Cys
-23      -20      -15      -10

Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu
  -5      1      5

Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp
  10      15      20      25

Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala
      30      35      40

Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala
      45      50      55

Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser
      60      65      70

Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln
      75      80      85

Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr
  90      95      100      105

Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn
      110      115      120

Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile
      125      130      135

Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr
      140      145      150

Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met
      155      160      165

Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro
      170      175      180      185

Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser
      190      195      200

Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile
      205      210      215

```

Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro
 220 225 230
 Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly
 235 240 245
 Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala
 250 255 260 265
 Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met
 270 275 280
 Leu His Tyr Val Gly Phe Val Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro
 285 290 295
 Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile
 300 305 310
 Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met
 315 320 325
 Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr
 330 335 340 345
 Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys
 350 355 360
 Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln
 365 370 375
 Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe
 380 385 390
 Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys
 395 400 405
 Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro
 410 415 420 425
 Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr
 430 435 440
 Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp
 445 450 455
 Arg Thr Val Ser Lys Ala Met Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys
 460 465 470
 Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu
 475 480 485
 Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met
 490 495 500 505
 Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr
 510 515 520
 Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala
 525 530 535
 Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro
 540 545 550
 Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly
 555 560 565
 Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro
 570 575 580 585

Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser
590 595 600

Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val
605 610 615

Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp
620 625 630

Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ala Gly Pro Pro Pro
635 640 645

Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly
650 655 660 665

Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Thr Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala
670 675 680

Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr
685 690 695

Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu
700 705 710

Ala Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe
715 720

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 3:**(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:**

- (A) LÄNGE: 722 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) ORIGINAL-QUELLE:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
(F) GEWEBETYP: Brustdrüse

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 3:

Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val
1 5 10 15

Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly
20 25 30

Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His
35 40 45

Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys
50 55 60

Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly
100 105 110

Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu
 115 120 125
 Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg
 130 135 140
 Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg
 165 170 175
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly
 180 185 190
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu
 210 215 220
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln
 245 250 255
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val
 260 265 270
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val
 275 280 285
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr
 290 295 300
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp
 305 310 315 320
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn
 325 330 335
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr
 340 345 350
 Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr
 355 360 365

 Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val
 370 375 380
 Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala
 385 390 395 400
 Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr
 405 410 415
 Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly
 420 425 430
 Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala
 435 440 445
 Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met
 450 455 460
 Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly
 465 470 475 480

Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser
 485 490 495
 Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg
 500 505 510
 Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala
 515 520 525
 Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly
 530 535 540
 Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala
 545 550 555 560
 Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr
 565 570 575
 Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala
 580 585 590
 Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro
 595 600 605
 Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly
 610 615 620
 Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro
 625 630 635 640
 Pro Thr Gly Asp Ala Gly Pro Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser
 645 650 655
 Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val
 660 665 670
 Thr Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp
 675 680 685
 Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro
 690 695 700
 Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile
 705 710 715 720
 Arg Phe

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 4:**(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:**

- (A) LÄNGE: 535 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) ORIGINAL-QUELLE:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 (F) GEWEBETYP: Brustdrüse

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
 (B) LOKALISIERUNG: 1..535

(D) WEITERE INFORMATION: /label= Variante_A

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 4:

Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val
 1 5 10 15
 Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly
 20 25 30
 Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His
 35 40 45
 Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys
 50 55 60
 Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg
 85 90 95
 Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly
 100 105 110
 Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu
 115 120 125
 Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg
 130 135 140
 Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg
 165 170 175
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly
 180 185 190
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu
 210 215 220
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val
 225 230 235 240
~~Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln~~
~~245 250 255~~
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val
 260 265 270
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val
 275 280 285
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr
 290 295 300
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp
 305 310 315 320
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn
 325 330 335
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr
 340 345 350

Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr
355 360 365

Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val
370 375 380

Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala
385 390 395 400

Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr
405 410 415

Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly
420 425 430

Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala
435 440 445

Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met
450 455 460

Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly
465 470 475 480

Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser
485 490 495

Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg
500 505 510

Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala
515 520 525

Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln
530 535

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 5:**(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:**

- (A) LÄNGE: 546 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein**(iii) HYPOTHETISCH: NEIN****(vi) ORIGINAL-QUELLE:**

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
(F) GEWEBETYP: Brustdrüse

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
(B) LOKALISIERUNG: 1..546
(D) WEITERE INFORMATION: /label= Variante_B

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 5:

Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val
1 5 10 15

Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly
20 25 30

Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His
35 40 45

Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys
50 55 60

Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly
100 105 110

Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu
115 120 125

Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg
130 135 140

Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly
145 150 155 160

Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg
165 170 175

Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly
180 185 190

Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr
195 200 205

Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu
210 215 220

Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val
225 230 235 240

Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln
245 250 255

Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val
260 265 270

Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val
275 280 285

Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr
290 295 300

Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp
305 310 315 320

Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn
325 330 335

Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr
340 345 350

Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr
355 360 365

Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val
370 375 380

Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala
385 390 395 400

Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr
405 410 415

Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly
 420 425 430
 Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala
 435 440 445
 Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met
 450 455 460
 Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly
 465 470 475 480
 Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser
 485 490 495
 Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg
 500 505 510
 Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala
 515 520 525
 Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile
 530 535 540
 Arg Phe
 545

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 6:**(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:**

- (A) LÄNGE: 568 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) ORIGINAL-QUELLE:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 (F) GEWEBETYP: Brustdrüse

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
 (B) LOKALISIERUNG: 1..568
 (D) WEITERE INFORMATION: /label= Variante_C

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 6:

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

Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly
 100 105 110
 Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu
 115 120 125
 Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg
 130 135 140
 Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg
 165 170 175
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly
 180 185 190
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu
 210 215 220
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln
 245 250 255
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val
 260 265 270
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val
 275 280 285
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr
 290 295 300
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp
 305 310 315 320
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn
 325 330 335
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr
 340 345 350
 Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr
 355 360 365
 Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val
 370 375 380
 Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala
 385 390 395 400
 Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr
 405 410 415
 Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly
 420 425 430
 Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala
 435 440 445
 Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met
 450 455 460

Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly
 465 470 475 480
 Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser
 485 490 495
 Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg
 500 505 510
 Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala
 515 520 525
 Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly
 530 535 540
 Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Lys Glu Ala
 545 550 555 560
 Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe
 565

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 7:**(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:**

- (A) LÄNGE: 722 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) ORIGINAL-QUELLE:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 (F) GEWEBETYP: Brustdrüse

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
 (B) LOKALISIERUNG: 1..722
 (D) WEITERE INFORMATION: /label= Variante_N

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 7:

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

Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg
 130 135 140
 Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg
 165 170 175
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Gln Ile Thr Leu Phe Gly
 180 185 190
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu
 210 215 220
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln
 245 250 255
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val
 260 265 270
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val
 275 280 285
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr
 290 295 300
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp
 305 310 315 320
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn
 325 330 335
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr
 340 345 350
 Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr
 355 360 365
 Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val
 370 375 380
 Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala
 385 390 395 400
 Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr
 405 410 415
 Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly
 420 425 430
 Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala
 435 440 445
 Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met
 450 455 460
 Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly
 465 470 475 480
 Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser
 485 490 495

Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg
 500 505 510
 Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala
 515 520 525
 Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly
 530 535 540
 Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala
 545 550 555 560
 Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr
 565 570 575
 Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala
 580 585 590
 Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro
 595 600 605
 Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly
 610 615 620
 Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro
 625 630 635 640
 Pro Thr Gly Asp Ala Gly Pro Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser
 645 650 655
 Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val
 660 665 670
 Thr Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp
 675 680 685
 Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro
 690 695 700
 Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile
 705 710 715 720
 Arg Phe

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 8:**(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:**

- (A) LÄNGE: 2184 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRANGART: doppelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) ORIGINAL-QUELLE:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 (F) GEWEBETYP: Brustdrüse

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISIERUNG: 82..2088
- (D) WEITERE INFORMATION: /label= Variante_T

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: reifes_peptid
- (B) LOKALISIERUNG: 151..2085

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_region
- (B) LOKALISIERUNG: 1756..2052

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1756..1788

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1789..1821

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1822..1854

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1855..1887

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1888..1920

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1921..1953

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1954..1986

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 1987..2019

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: repeat_einheit
- (B) LOKALISIERUNG: 2020..2052

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 8:

ACCTTCTGTA TCAGTTAAGT GTCAAGATGG AAGGAACAGC AGTCTCAAGA TAATGCAAAG	60
AGTTTATYCA TCCAGAGGCT G ATG CTC ACC ATG GGG CGC CTG CAA CTG GTT	111
Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val	
-23 -20 -15	
GTG TTG GGC CTC ACC TGC TGC TGG GCA GTG GCG AGT GCC GCG AAG CTG	159
Val Leu Gly Leu Thr Cys Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu	
-10 -5 1	
GGC GCC GTG TAC ACA GAA GGT GGG TTC GTG GAA GGC GTC AAT AAG AAG	207
Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys	
5 10 15	
CTC GGC CTC CTG GGT GAC TCT GTG GAC ATC TTC AAG GGC ATC CCC TTC	255
Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe	
20 25 30 35	

GCA GCT CCC ACC AAG GCC CTG GAA AAT CCT CAG CCA CAT CCT GGC TGG	303
Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp	
40 45 50	
CAA GGG ACC CTG AAG GCC AAG AAC TTC AAG AAG AGA TGC CTG CAG GCC	351
Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala	
55 60 65	
ACC ATC ACC CAG GAC AGC ACC TAC GGG GAT GAA GAC TGC CTG TAC CTC	399
Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu	
70 75 80	
AAC ATT TGG GTG CCC CAG GCC AGG AAG CAA GTC TCC CGG GAC CTG CCC	447
Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro	
85 90 95	
GTT ATG ATC TGG ATC TAT GGA GGC GCC TTC CTC ATG GGG TCC GGC CAT	495
Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His	
100 105 110 115	
GGG GCC AAC TTC CTC AAC AAC TAC CTG TAT GAC GGC GAG GAG ATC GCC	543
Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala	
120 125 130	
ACA CGC GGA AAC GTC ATC GTG GTC ACC TTC AAC TAC CGT GTC GGC CCC	591
Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro	
135 140 145	
CTT GGG TTC CTC AGC ACT GGG GAC GCC AAT CTG CCA GGT AAC TAT GGC	639
Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly	
150 155 160	
CTT CGG GAT CAG CAC ATG GCC ATT GCT TGG GTG AAG AGG AAT ATC GCG	687
Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg Asn Ile Ala	
165 170 175	
GCC TTC GGG GGG GAC CCC AAC AAC ATC ACG CTC TTC GGG GAG TCT GCT	735
Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala	
180 185 190 195	
GGG GGT GCC AGC GTC TCT CTG CAG ACC CTC TCC CCC TAC AAC AAG GGC	783
Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr Asn Lys Gly	
200 205 210	
CTC ATC CGG CGA GCC ATC AGC CAG AGC GGC GTG GCC CTG AGT CCC TGG	831
Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu Ser Pro Trp	
215 220 225	
GTC ATC CAG AAA AAC CCA CTC TTC TGG GCC AAA AAG GTG GCT GAG AAG	879
Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val Ala Glu Lys	
230 235 240	
GTG GGT TGC CCT GTG GGT GAT GCC GCC AGG ATG GCC CAG TGT CTG AAG	927
Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln Cys Leu Lys	
245 250 255	
GTT ACT GAT CCC CGA GCC CTG ACG CTG GCC TAT AAG GTG CCG CTG GCA	975
Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Pro Leu Ala	
260 265 270 275	
GGC CTG GAG TAC CCC ATG CTG CAC TAT GTG GGC TTC GTC CCT GTC ATT	1023
Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val Pro Val Ile	
280 285 290	
GAT GGA GAC TTC ATC CCC GCT GAC CCG ATC AAC CTG TAC GCC AAC GCC	1071
Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr Ala Asn Ala	
295 300 305	

GCC GAC ATC GAC TAT ATA GCA GGC ACC AAC AAC ATG GAC GGC CAC ATC Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp Gly His Ile 310 315 320	1119
TTC GCC AGC ATC GAC ATG CCT GCC ATC AAC AAG GGC AAC AAG AAA GTC Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn Lys Lys Val 325 330 335	1167
ACG GAG GAG GAC TTC TAC AAG CTG GTC AGT GAG TTC ACA ATC ACC AAG Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr Ile Thr Lys 340 345 350 355	1215
GGG CTC AGA GGC GCC AAG ACG ACC TTT GAT GTC TAC ACC GAG TCC TGG Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr Glu Ser Trp 360 365 370	1263
GCC CAG GAC CCA TCC CAG GAG AAT AAG AAG AAG ACT GTG GTG GAC TTT Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val Val Asp Phe 375 380 385	1311
GAG ACC GAT GTC CTC TTC CTG GTG CCC ACC GAG ATT GCC CTA GCC CAG Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala Leu Ala Gln 390 395 400	1359
CAC AGA GCC AAT GCC AAG AGT GCC AAG ACC TAC GCC TAC CTG TTT TCC His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr Leu Phe Ser 405 410 415	1407
CAT CCC TCT CGG ATG CCC GTC TAC CCC AAA TGG GTG GGG GCC GAC CAT His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly Ala Asp His 420 425 430 435	1455
GCA GAT GAC ATT CAG TAC GTT TTC GGG AAG CCC TTC GCC ACC CCC ACG Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala Thr Pro Thr 440 445 450	1503
GGC TAC CGG CCC CAA GAC AGG ACA GTC TCT AAG GCC ATG ATC GCC TAC Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met Ile Ala Tyr 455 460 465	1551
TGG ACC AAC TTT GCC AAA ACA GGG GAC CCC AAC ATG GGC GAC TCG GCT Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly Asp Ser Ala 470 475 480	1599
GTG CCC ACA CAC TGG GAA CCC TAC ACT ACG GAA AAC AGC GGC TAC CTG Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser Gly Tyr Leu 485 490 495	1647
GAG ATC ACC AAG AAG ATG GGC AGC AGC TCC ATG AAG CGG AGC CTG AGA Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg Ser Leu Arg 500 505 510 515	1695
ACC AAC TTC CTG CGC TAC TGG ACC CTC ACC TAT CTG GCG CTG CCC ACA Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala Leu Pro Thr 520 525 530	1743
GTG ACC GAC CAG GAG GCC ACC CCT GTG CCC CCC ACA GGG GAC TCC GAG Val Thr Asp Gln Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu 535 540 545	1791
GCC ACT CCC GTG CCC CCC ACG GGT GAC TCC GAG ACC GCC CCC GTG CCG Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro 550 555 560	1839
CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser 565 570 575	1887

```

GGG GCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCC GTG      1935
Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val
580          585          590          595

CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC      1983
Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Thr Gly Asp
600          605          610

TCC GGG GCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCT      2031
Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro
615          620          625

GTG CCC CCC ACA GAT GAC TCC AAG GAA GCT CAG ATG CCT GCA GTC ATT      2079
Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile
630          635          640

AGG TTT TAGCGTCCCA TGAGCCTTGG TATCAAGAGG CCACAAGAGT GGGACCCCG      2135
Arg Phe
645

GGGCTCCCCT CCCATCTTGA GCTCTTCCTG AATAAAGCCT CATACCCCT      2184
    
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 9:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 668 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 9:

```

Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val Val Leu Gly Leu Thr Cys
-23          -20          -15          -10

Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu
-5          1          5

Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp
10          15          20          25

Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala
30          35          40

Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala
45          50          55

Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser
60          65          70

Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln
75          80          85

Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr
90          95          100          105

Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn
110          115          120

Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile
125          130          135

Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr
140          145          150
    
```

Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met
 155 160 165
 Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro
 170 175 180 185
 Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser
 190 195 200
 Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile
 205 210 215
 Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro
 220 225 230
 Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly
 235 240 245
 Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala
 250 255 260 265
 Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met
 270 275 280
 Leu His Tyr Val Gly Phe Val Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro
 285 290 295
 Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile
 300 305 310
 Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met
 315 320 325
 Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr
 330 335 340 345
 Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys
 350 355 360
 Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln
 365 370 375
 Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe
 380 385 390
 Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys
 395 400 405
 Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro
 410 415 420 425
 Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr
 430 435 440
 Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp
 445 450 455
 Arg Thr Val Ser Lys Ala Met Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys
 460 465 470
 Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu
 475 480 485
 Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met
 490 495 500 505
 Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr
 510 515 520

```

Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala
      525                               530           535
Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro
      540                               545           550
Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly
      555                               560           565
Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro
      570                               575           580           585
Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser
      590                               595           600
Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val
      605                               610           615
Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Asp Asp
      620                               625           630
Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe
      635                               640           645

```

Patentansprüche

1. Ein Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid kodiert mit gallensalzaktivierter, langkettiger triacylglycerolhydrolytischer Aktivität kodiert, welches Polypeptid eine BSSL-Variante ist, die kürzer ist als das native 722 Aminosäure-BSSL-Polypeptid in voller Länge, indem sie nur einen Teil der Aminosäuresequenz umfasst, die als Reste 536-722 in SEQ ID NO:3 gezeigt ist, und welche BSSL-Variante weniger als 16 Wiederholungseinheiten umfasst, wo der Ausdruck "Wiederholungseinheit" eine der Wiederholungseinheiten von 33 Nukleotiden bezeichnet, die einzeln in SEQ ID NO:1 in der Sequenzliste angegeben sind.
2. Ein Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid kodiert mit gallensalzaktivierter, langkettiger triacylglycerolhydrolytischer Aktivität kodiert, welches Polypeptid eine BSSL-Variante ist, welche alle der Aminosäuren 1-535 und einen Teil der Aminosäuresequenz, die als Reste 538-722 in SEQ ID NO:3 gezeigt ist, umfasst.
3. Ein Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2, worin die betreffende BSSL-Variante einen Phenylalaninrest in dessen C-terminalen Position besitzt.
4. Ein Nukleinsäuremolekül gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-3, worin die betreffende BSSL-Variante die Gln-Met-Pro-Sequenz in dessen C-terminalen Teil umfasst.
5. Ein Nukleinsäuremolekül gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-4, worin die betreffende BSSL-Variante die Aminosäuresequenz, die als Reste 712-722 in SEQ ID NO:3 gezeigt ist, in dessen C-terminalen Teil, umfasst.
6. Ein Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2, welches Nukleinsäuremolekül für ein Polypeptid kodiert, dessen Aminosäuresequenz mindestens 90% homolog ist mit der Aminosäuresequenz, die als SEQ ID NO:5, 6 oder 9 in der Sequenzliste gezeigt ist.
7. Ein Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 6, welches Nukleinsäuremolekül für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO:5, 6 oder 9 in der Sequenzliste gezeigt ist, umfasst.
8. Ein Polypeptid, das als SEQ ID NO:5, 6, 7 oder 9 in der Sequenzliste gezeigt ist.
9. Ein Polypeptid, das von einer Nukleinsäuresequenz gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-7 kodiert wird.
10. Ein Polypeptid gemäß Anspruch 8 oder 9, welches Polypeptid mindestens 90% rein ist.
11. Ein Hybridgen, das ein Nukleinsäuremolekül gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-7 umfasst.
12. Ein replizierbarer Expressionsvektor, der ein Hybridgen gemäß Anspruch 11 umfasst.
13. Ein Vektor gemäß Anspruch 12, welcher Vektor der Rinderpapillomvirusvektor mit der DSM-Hinterle-

gungsnummer: 7501, 7502 oder 7497 ist.

14. Eine Zelle, die ein Hybridgen gemäß Anspruch 11 enthält.

15. Eine Zelle gemäß Anspruch 14, welche Zelle aus der murinen Zelllinie C127 oder aus E. coli stammt.

16. Ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Polypeptids, welches Verfahren folgendes umfasst:
(i) Kultivieren einer Wirtszelle in oder auf einem Kulturmedium, in welche Wirtszelle ein Nukleinsäuremolekül gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-7 in ein Hybridgen eingeführt worden ist, welches Hybridgen imstande ist, in der spezifischen Wirtszelle zu replizieren, oder Identifizierung und Reproduktion eines Organismus, worin ein Nukleinsäuremolekül gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-7 in ein Hybridgen eingeführt worden ist, welches Hybridgen imstande ist, in dem spezifischen Organismus zu replizieren;
(ii) Expression des Polypeptids;
und
(iii) Gewinnen des Polypeptids.

17. Ein Verfahren gemäß Anspruch 16, wo das Hybridgen den Rinderpapillomvirusvektor mit der DSM-Hinterlegungsnummer: 7501, 7502 oder 7497 umfasst.

18. Ein Expressionssystem umfassend ein Hybridgen, das sich in einer Wirtszelle ausdrücken lässt oder ein Organismus, das das betreffende Hybridgen enthält, ausdrücken lässt, so dass ein rekombinantes Polypeptid bei der Expression des Hybridgens hergestellt wird, wobei das betreffende Hybridgen hergestellt wird durch Einführung einer Nukleinsäuresequenz gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-7 in ein Gen, das imstande ist, die Expression des betreffenden Hybridgens zu vermitteln, wobei Menschen von dem betreffenden Expressionssystem ausgeschlossen sind.

19. Ein Verfahren zur Herstellung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers, das imstande ist, eine BSSL-Variante auszudrücken, umfassend (a) die Einführung eines Expressionssystems gemäß Anspruch 18 in ein fertilisiertes Ei oder eine Embryonzelle eines nicht-humanen Säugetiers, so dass das Expressionssystem in die Keimbahn des Säugetiers eingefügt werden kann, und (b) Entwicklung des resultierenden eingeführten fertilisierten Eies oder Embryons in ein erwachsenes weibliches nicht-humanes Säugetier.

20. Ein Verfahren zur Herstellung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers, das imstande ist, eine BSSL-Variante auszudrücken, umfassend (a) Zerstörung der BSSL-ausdrückenden Fähigkeit des Säugetiers und Einführung eines Expressionssystems gemäß Anspruch 18 in die Keimbahn des Säugetiers in solch eine Weise, dass eine BSSL-Variante in dem Säugetier ausgedrückt wird; und/oder (b) Ersetzung des BSSL-Gens des Säugetiers oder eines Teils hiervon durch ein Expressionssystem gemäß Anspruch 18.

21. Ein transgenes nicht-humanes Säugetier, das in seinem Genom eine DNA-Sequenz gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-7 enthält.

22. Ein transgenes nicht-humanes Säugetier gemäß Anspruch 21, in welchem die DNA-Sequenz in der Keimbahn des Säugetiers vorhanden ist,

23. Ein transgenes nicht-humanes Säugetier gemäß Anspruch 21 oder 22, in welchem die DNA-Sequenz in dem Milchproteingen des Säugetiers vorhanden ist.

24. Ein transgenes nicht-humanes Säugetier gemäß irgendeinem der Ansprüche 21-23, welches Säugetier ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schafen, Schweinen und Rindern.

25. Nachkommen eines transgenen nicht-humanen Säugetiers gemäß irgendeinem der Ansprüche 21-24, welches Nachkommen in seinem Genom eine DNA-Sequenz gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-7 enthält.

26. Milch gewonnen von einem transgenen nicht-humanen Säugetier gemäß irgendeinem der Ansprüche 21-25 umfassend ein Polypeptid, das von einer Nukleinsäuresequenz gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-7 kodiert wird.

27. Eine Zubereitung für Säuglinge umfassend Milch gemäß Anspruch 26.

28. Eine Zubereitung für Säuglinge umfassend ein Polypeptid gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10.
29. Ein Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung für Säuglinge durch Ergänzen einer Nahrungszubereitung für Säuglinge mit einem Polypeptid gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10.
30. Anwendung eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10 als eine Ergänzung für Nahrungszubereitung für Säuglinge.
31. Eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein Polypeptid gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10.
32. Ein Polypeptid gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10 zur Verwendung in der Therapie.
33. Anwendung eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von zystischer Fibrose.
34. Anwendung eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von chronischer Pankreatitis.
35. Anwendung eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Fett-Malabsorption.
36. Anwendung eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Malabsorption von fettlöslichen Vitaminen.
37. Anwendung eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Fett-Malabsorption aufgrund physiologischer Ursachen.
38. Anwendung eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Verbesserung der Ausnutzung von Nahrungslipiden.
39. Anwendung eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 8-10 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Verbesserung der Ausnutzung von Nahrungslipiden in Frühgeborenen.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

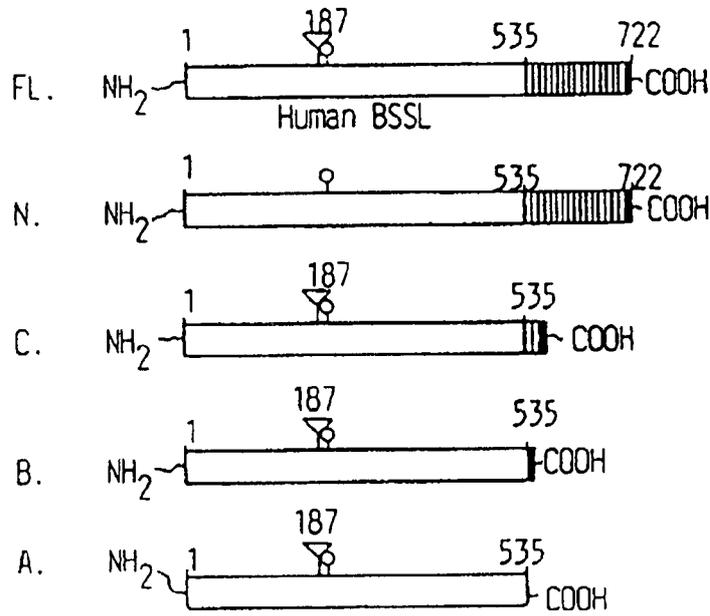
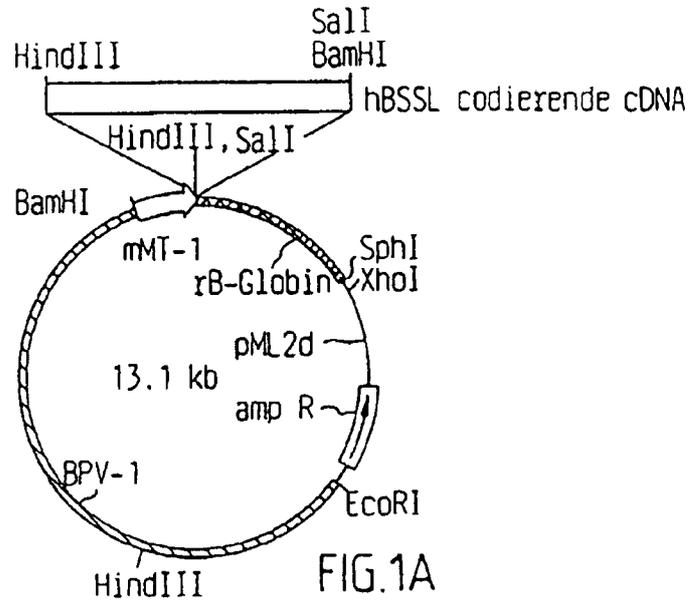


FIG.1B

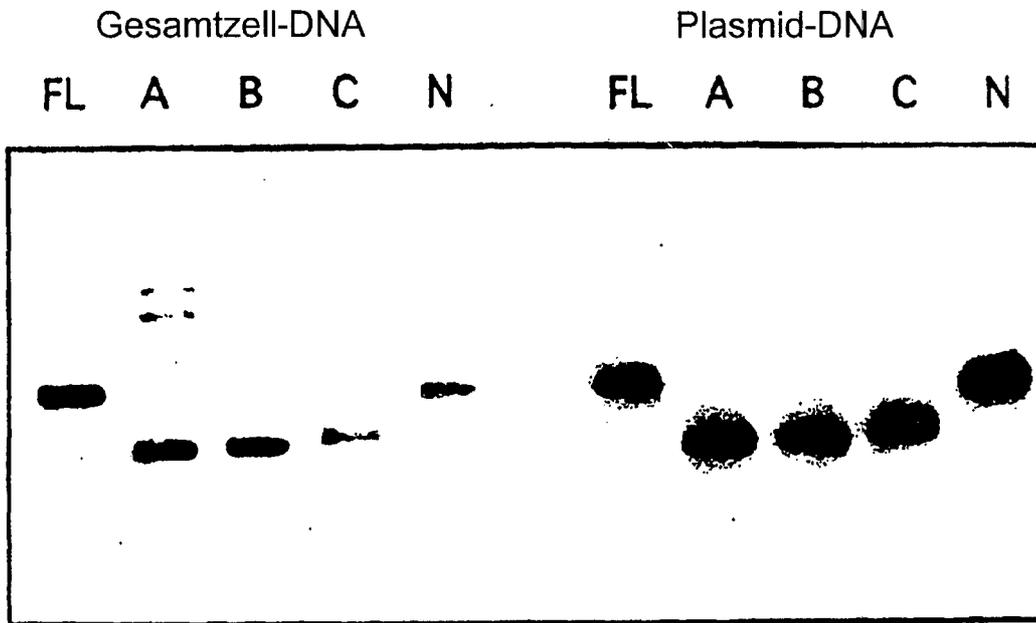


FIG. 2

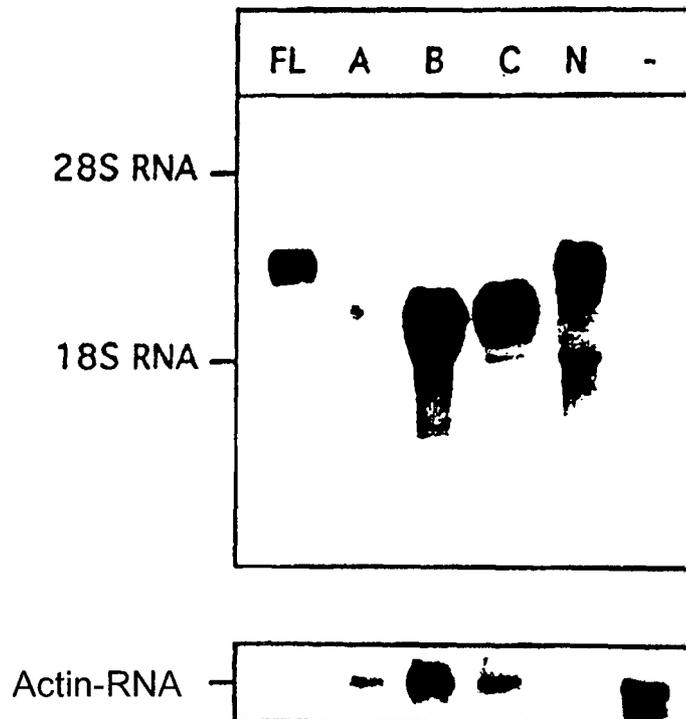
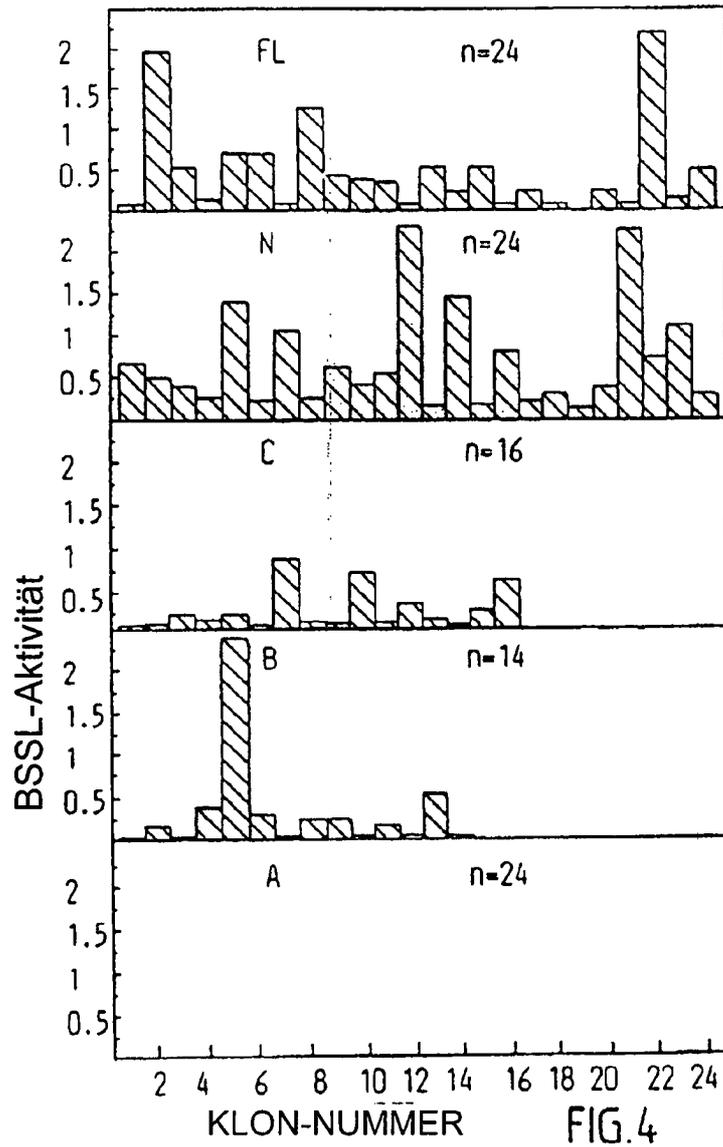


FIG. 3



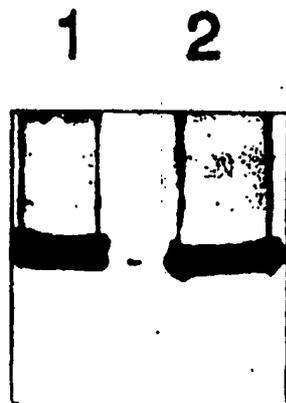
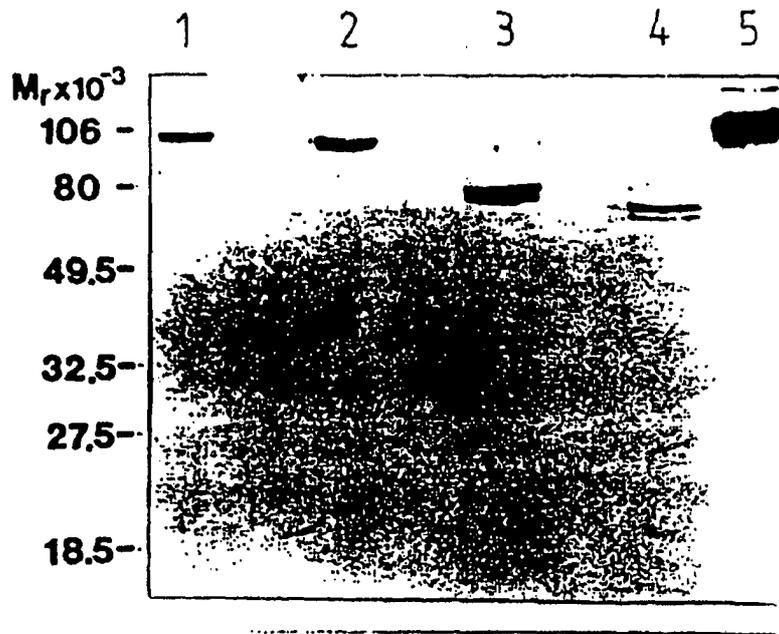
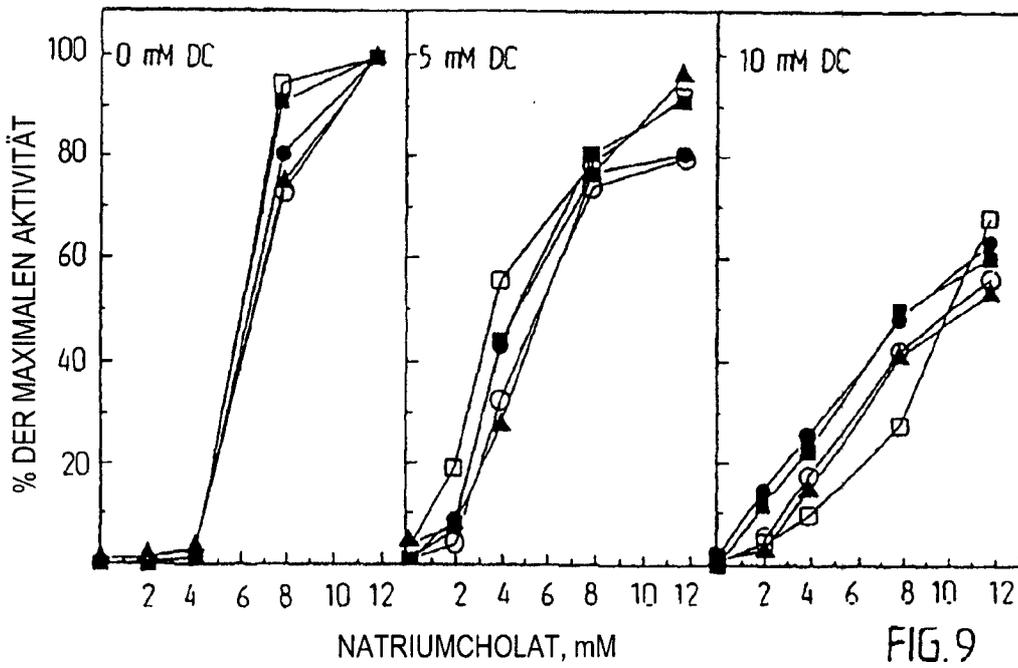
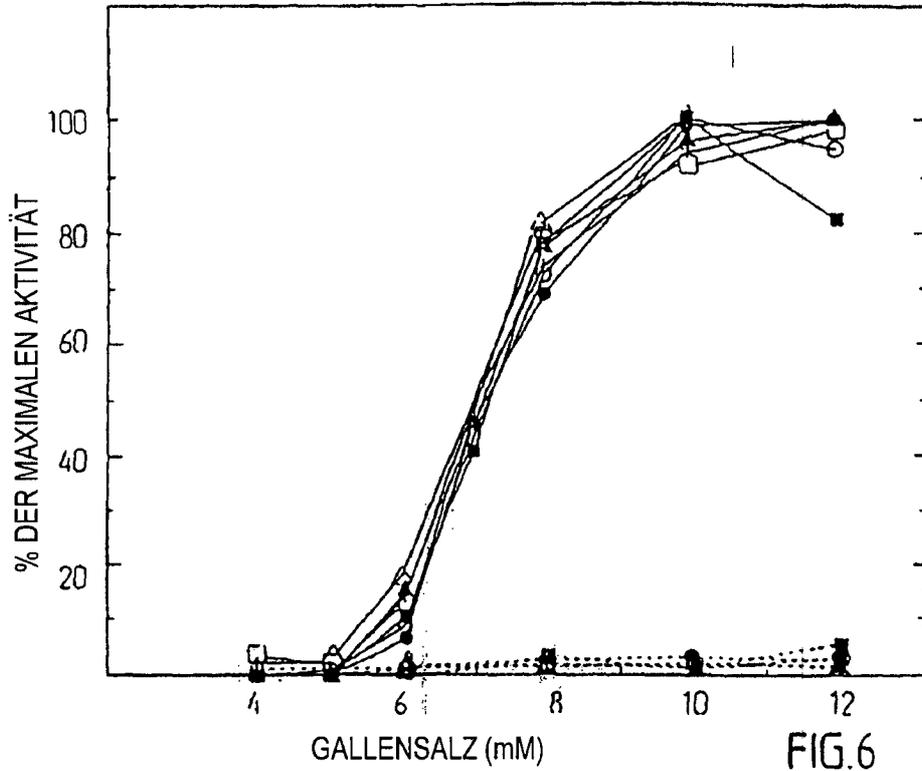


FIG. 5



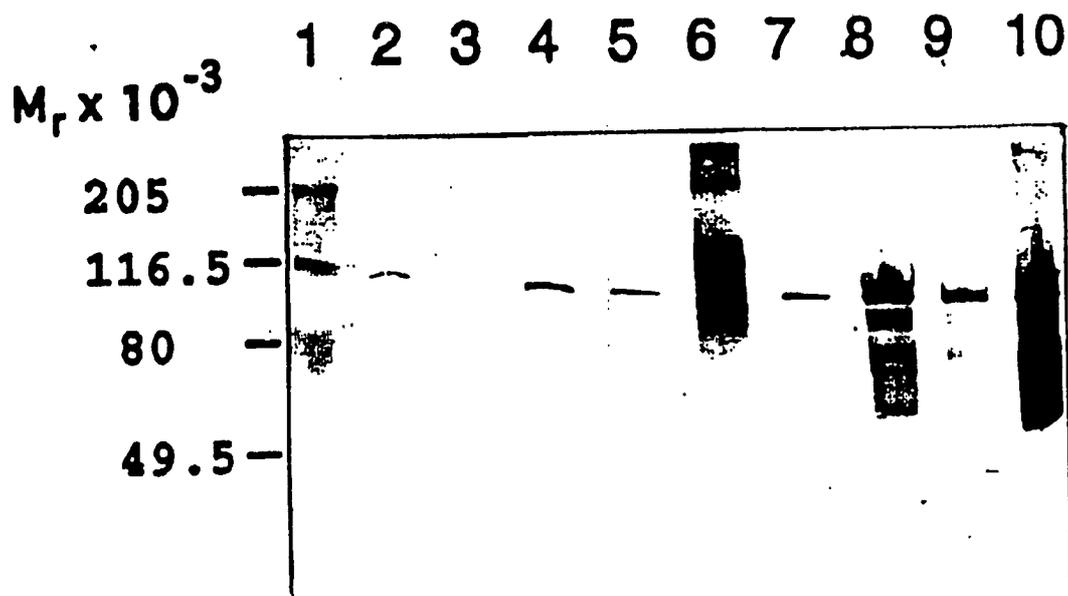
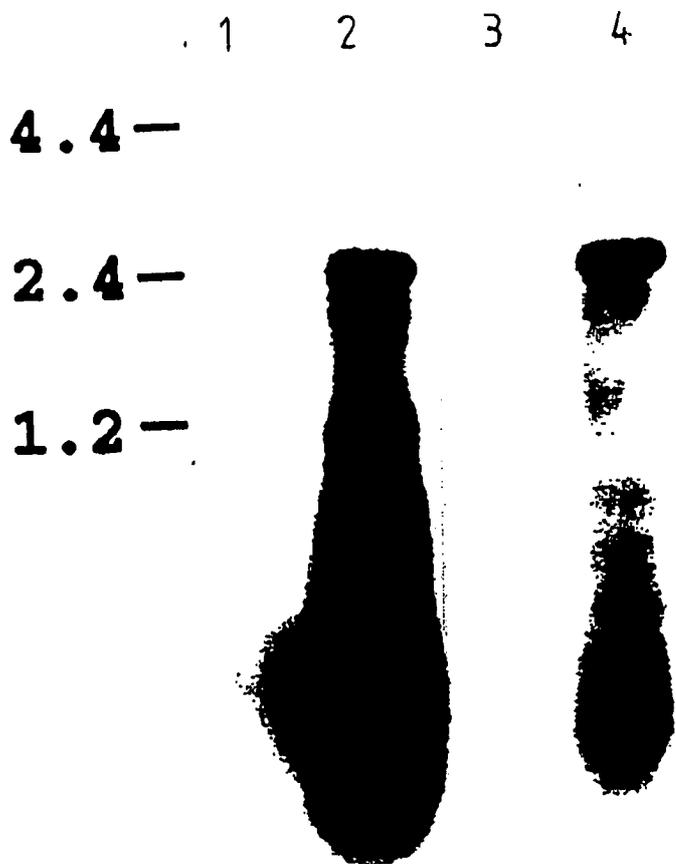


FIG. 7

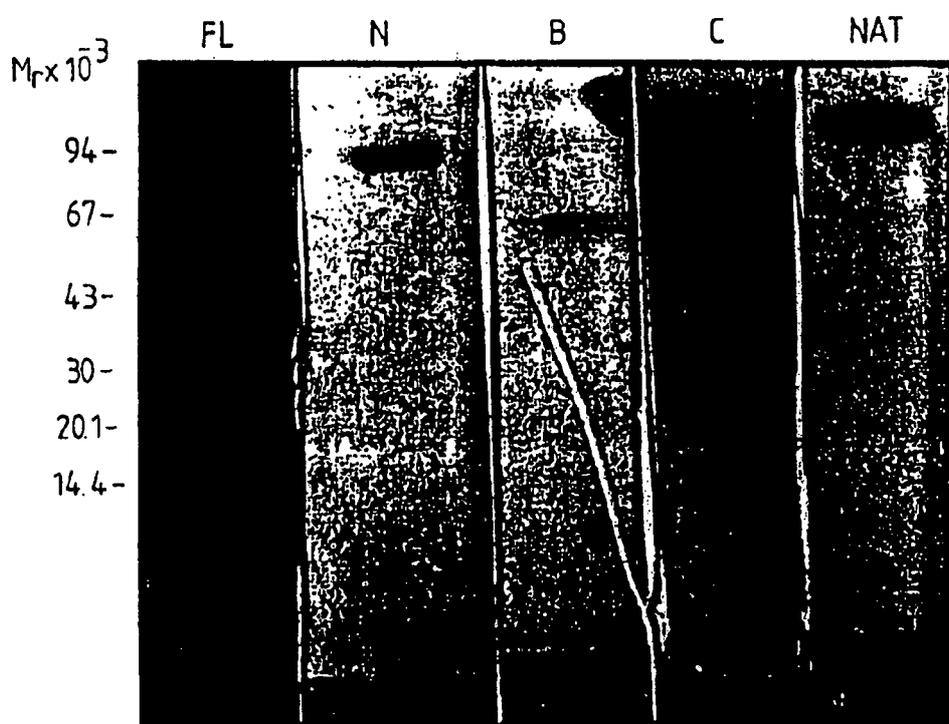
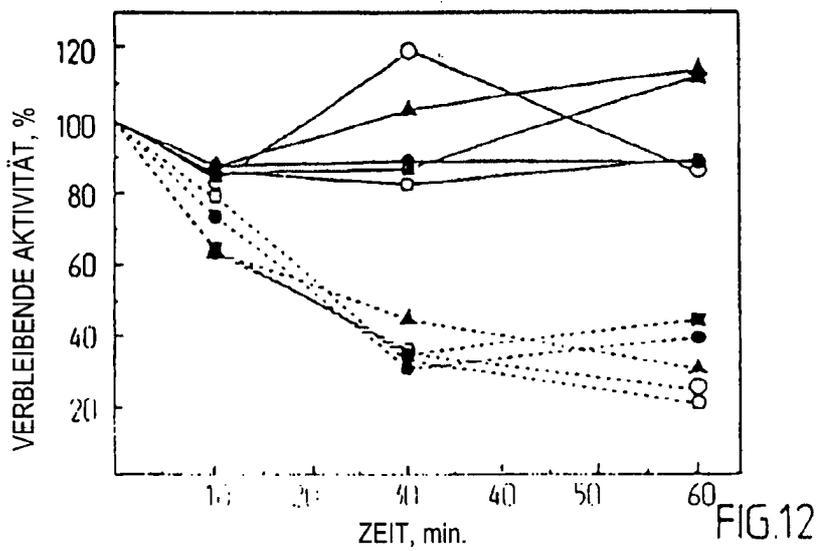
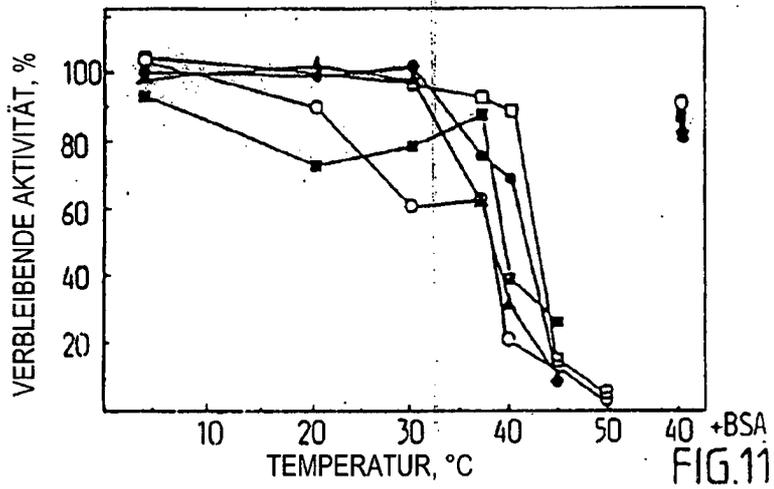
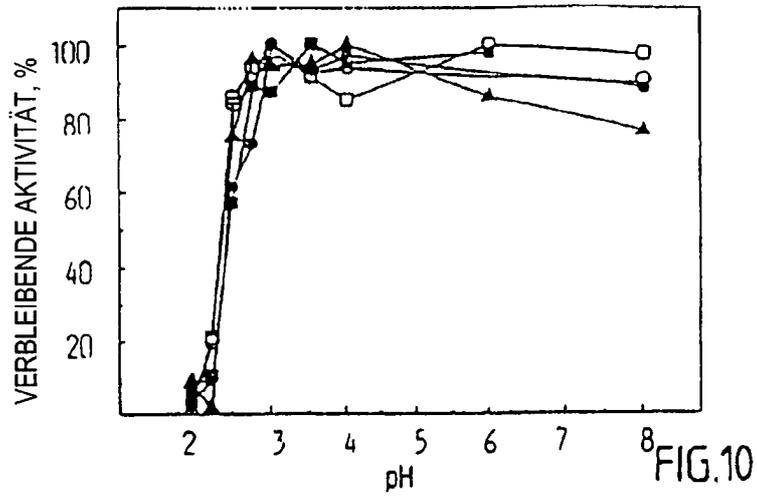


FIG.8



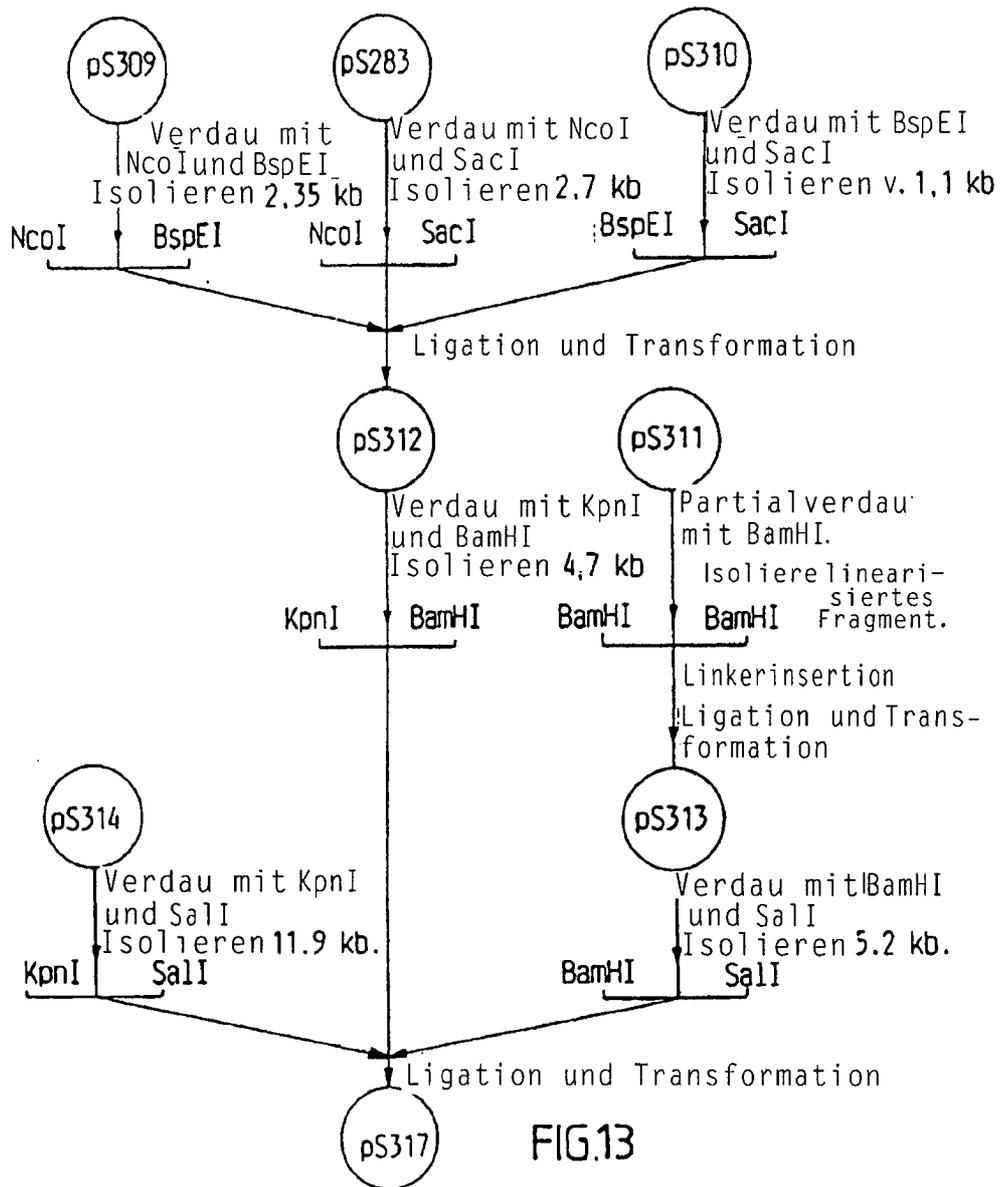
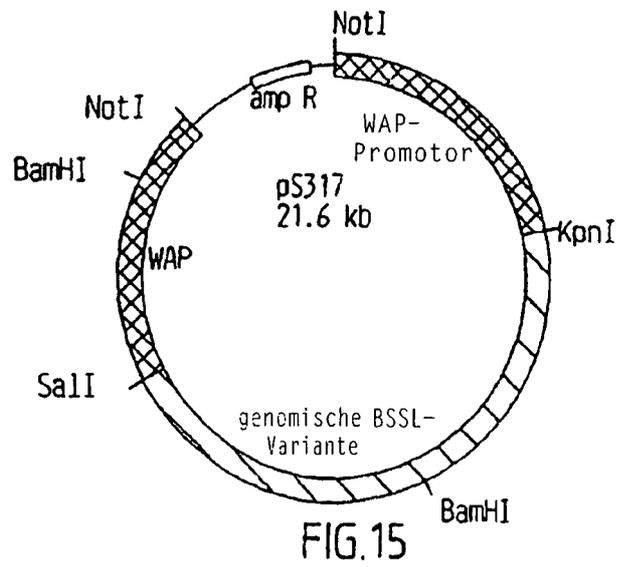
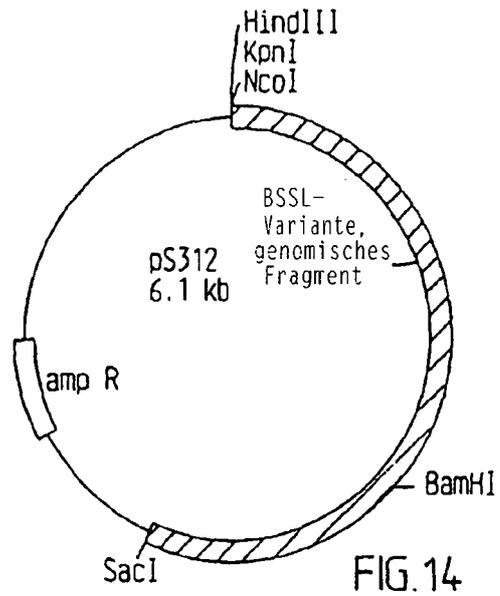


FIG.13



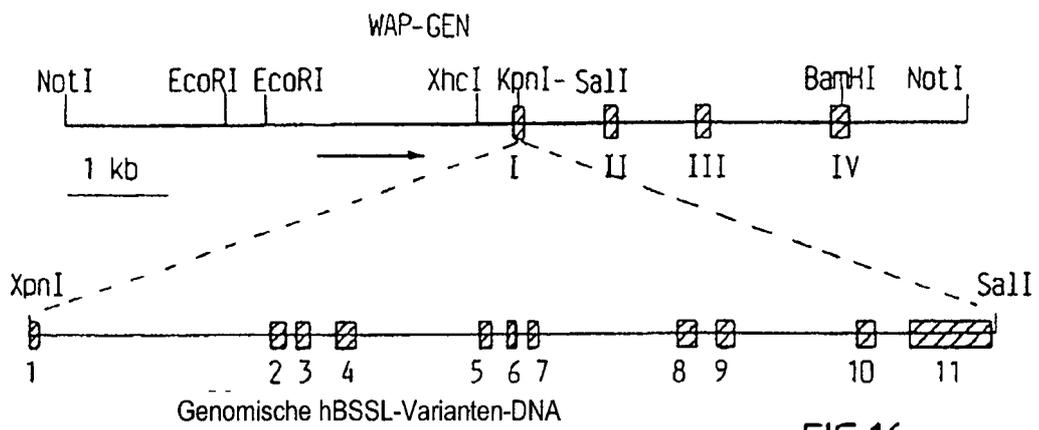
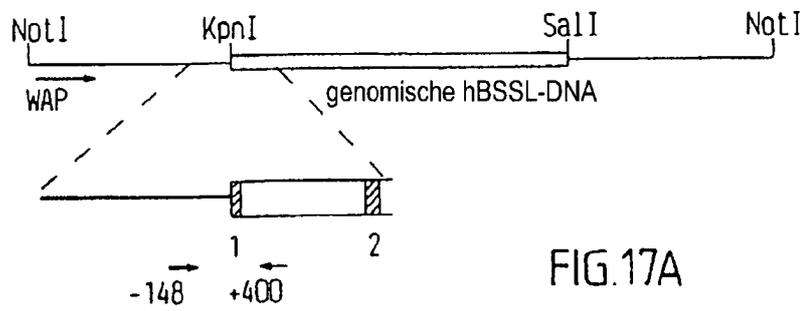


FIG.16



Primer	Sequenz (5' -3')
5'-primer	CTGTGTGGCAAGAAGGAAGTGTGT
3'-primer	CAACTCCTGACCTCAAGTGATC

FIG.17B

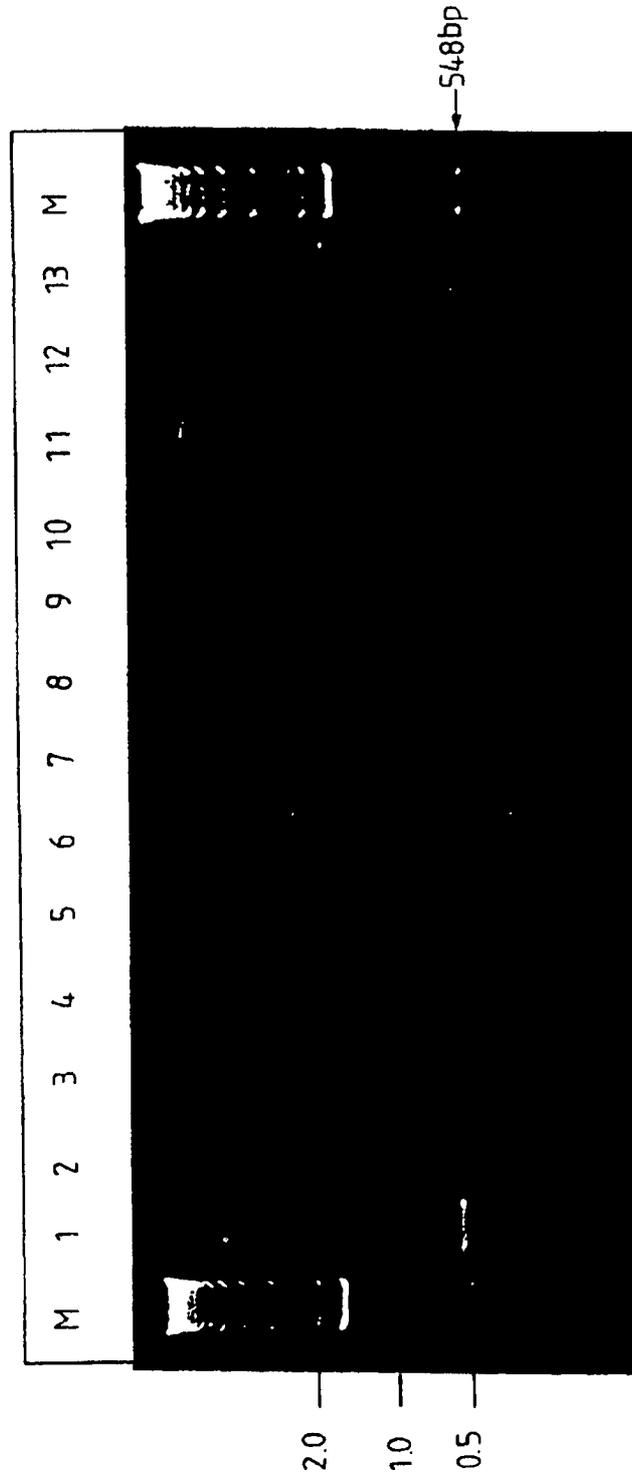


FIG.17C

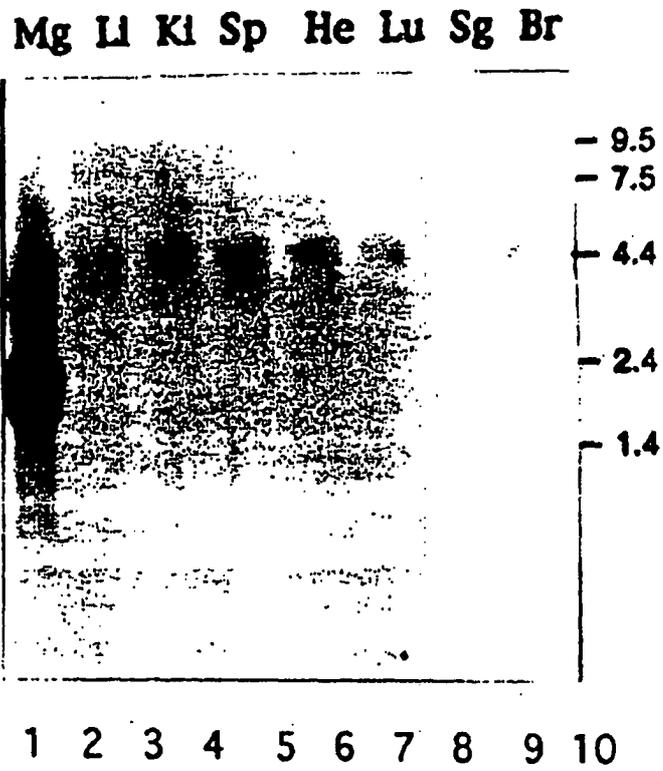


FIG.18

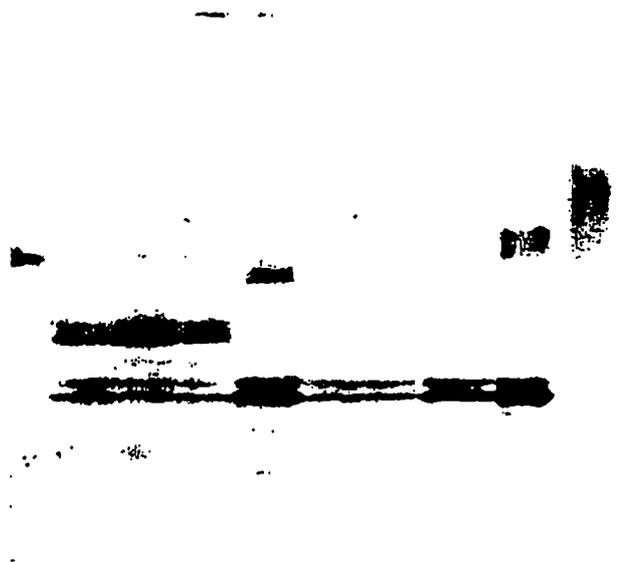


FIG.19