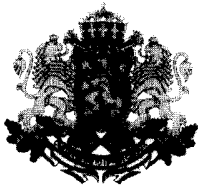


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 99100A

(51) C12N 15/54

C12N 9/10

C12N 5/10

C12N 15/85

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 99100

(22) Заявено на 07.10.1994

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31)	850357	(32)	09.03.1992	(33)	US
	925369		04.08.1992		US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 5 | 31.05.1995

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

CYTEL CORPORATION, ., SAN
DIEGO, CA, SAN DIEGO, CA (US); THE
REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA, ., OAKLAND, CA,
OAKLAND, CA (US);

(72) Изобретател(и):

PAULSON, JAMES E. , DEL MAR, CA (US);
WEN, XIAOHONG. , SAN DIEGO, CA (US);
LIVINGSTON, BRIAN D. , SAN
DIEGO, CA (US); GILLESPIE, WILLIAM. ,
CULVER CITY, CA (US); KELM, SORGE. ,
KIEL (US); BURLINGAME, ALMA L. ,
SAUSALITO, CA (US); MEDZIHRADESKY,
KATALIN. , SAN FRANCISCO, CA (US);

(74) Представител по индустриална
собственост:

Георги Цветанов Перев, 1124 София, ул.
"Леонардо да Винчи" 3

(86) № на PCT заявка:

PCT/ US93/0 / 2002, 09.03.1993

(87) № и дата на PCT публикация:

93/181 / 57, 16.09.1993

(54) СЪСТАВИ И МЕТОДИ ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ И СИНТЕЗ НА
СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗИ

(57) Изобретението се отнася до днк-изолати, кодиращи сиалилтрансферази,
съдържащи консервативен участък на хомоложност, и методи за получаване на
такива днк, както и до експресионни системи за рекомбинант но получаване на
сиалилтрансфераза.

BG 99100A

39 претенции, 14 фигури

А 303/94-ГП

СЪСТАВИ И МЕТОДИ ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ И
СИНТЕЗ НА СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗИ

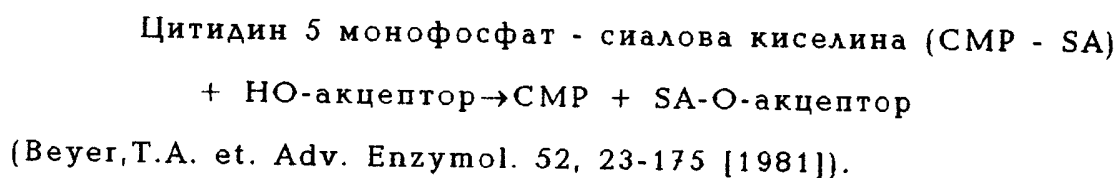
Настоящата заявка е продължение на заявка сер.№ 07/850 357 подадена на 9 март 1992.

Предшестващо състояние на техниката

Настоящото изобретение се отнася до сиалилтрансферазна генна фамилия, група гликозилтрансферази отговорни за крайното сиалилиране на въглехидатните групи на гликопротеини, гликолипиди и олигозахариди, които съдържат консервативен участък на хомоложност в каталитичния домен. Членове на сиалилтрансферазната генна фамилия са Gal β 1, 3GalNAc α 2,3 сиалилтрансфераза и Gal1,3(4)GlcNAc α 2,3 сиалилтрансфераза. Изобретението се отнася още до нови форми и състави от същите и по-специално до средства и методи за идентифициране и продукция на членове на сиалилтрансферазната генна фамилия до хомогенност в значителни

полезни количества. Изобретението се отнася също до приготвяне на изолирана деоксирибонуклеинова киселина (ДНК) кодираща продукция на сиалилтрансферази, до методи за получаване на молекули ДНК, които кодират сиалилтрансферази, до експресия на човешки и бозайникови сиалилтрансферази като се използва такава ДНК, както и до нови съединения, включително нови нуклеинови киселини кодиращи сиалилтрансферази или фрагменти от тях. Настоящото изобретение се отнася също до производни на сиалилтрансфераза, по-специално производни, у които липсват цитоплазмената и/или трансмембранната части на протеина и тяхната продукция посредством рекомбинантни ДНК техники.

Сиалилтрансферазите са ензимна фамилия, която катализира преноса на сиалова киселина (SA) до крайните части на въглехидратните групи на гликолипиди и олигозахариди по следната най-обща реакция:



Сиалилтрансферазите най-напред са намерени в клетъчния апарат на Golgi, където те участвуват в пост-транслационния път на гликозилиране. (Fleischer, B.J. Cell Biol. 89, 246-255 [1981]) . Намерени са също в телесни течности като мляко от гърдата, коlostрума и кръвта. Най-малко 10-12 различни сиалилтрансферази са необходими, за да се синтезират всички известни сиалилолигозахаридни последователности. Всяка от тях се различава по специфичността си спрямо последователността на олигозахаридния акцептор и аномерната връзка образувана между сиаловата киселина

и захарта, с която е свързана. Пречистни са четири сиалил-трансферази. (Beyer и сътр. Ibid., Weinstein, J. и сътр., J. Biol. Chem. 257, 13835-13844 [1982], Miagi, T. and Tsuiki, S. Eur. J. Biochem. 125, 253-261 [1982] и Joziasse, D.H. и сътр. J. Biol. Chem. 260, 4941-4951 [1985]). По-специално, пречистени са Gal β 1,4GlcNAc α 2-6 сиалилтрансфераза и Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2-3 сиалилтрансфераза, от чернодробни мембрани на плъхове. (Weinstein и сътр. Ibid.).

Други гликозилтрансферази са изолирани като разтворими ензими в серум, мляко или колострум, включително сиалил-, фукозил-, галактозил-, N-ацетилглюкозаминил- и N-ацетилгалактозаминилтрансферази. (Beyer и сътр. Ibid.). Изолирана е говежда и човешка β -N-ацетилглюкозамид β 1,4-галактозилтрансфераза (Narimatsu, H. и сътр. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83, 4720-4724 [1986], Shaper, N.L. и сътр. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83, 1573-1577 [1986], Appert, H.E. и сътр., Biochem. Biophys. Res. Common 139, 163-168 [1986] и Humphreys-Beyer, M.G. и сътр. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83, 8918-8922 [1986]). Тези пречистени гликозилтрансферази се различават по размер, което може да се дължи на отстраняване на части от протеина, които не са съществени за неговата активност като домените на мембранно свързване.

Сравнението с установените аминокиселинни последователности на cДНК клонове кодиращи гликозилтрансферазите включително галактозилтрансферази, сиалилтрансфераза, фукозилтрансфераза и N-ацетилгалактозаминилтрансфераза, показват, че тези ензими нямат в същност никаква хомоложна последователност. Някои схващания относно структурното сходство на тази фамилия гликозилтранс-

ферази се основават на извършени напоследък анализи на първичните структури на клонирани сиазилтрансферази (Weinstein, J. и сътр., *Ibid.*). Все пак, всички те притежават къса NH_2 -цитоплазмена опашка, сигнално контактен домен от 16-20 аминокиселини и разгънат стем участък и след това голяма COOH -крайна каталитичен домен Weinstein, J. и сътр., *J.Biol.Chem.* 262, 17735-17743 [1987], Paulson, J.C. и сътр., *J.Biol. Chem.* 264, 17615-17618 [1989]. Сигнално контактните домени действуват и като неразцепващи се сигнални пептиди и като мембранносвързващи участъци и ориентират каталитичните домени на тези гликозилтрансферази в лумена на апарата на Golgi. Вътре във фамилиите гликозилтрансферази трябва да се очакват обикновени аминокиселинни последователности, които разделят подобни акцепторни или донорни субстрати. Все пак, изненадващо малко хомоложни участъци са намерени в каталитичните домени на гликозилтрансферазите и не е намерена никаква значителна хомоложна последователност при някой друг протеин в GenBank (Shaper, N.L. и сътр., *J.Biol.Chem.* 216, 10420-10428 [1988], D'Agostaso, G. и сътр., *Eur.J.Biochem.* 183, 211-217 [1989] и Weinstein, J. и сътр., *J.Biol.Chem.* 263, 17735-17743 [1987]). Това специално е изненадващо за Gal $\alpha 1,3$ GTи GlcNAc $\beta 1,4$ -GT, две галактозилтрансферази. Обаче, докато тези галактозилтрансферази изобщо не показват хомоложност, има общ хексапептид KDKKND за Gal $\alpha 1,3$ -GT (говежди, 304-309) и RDKKNE за GlcNAc $\beta 1,4$ -GT (говежди, човешки, миши аминокиселини 346-351). (Joziase и сътр., *J.Biol.Chem.* 264, 14290-14297 [1989]).

Сиаловите киселини са крайни захари от въгле-

хидратните групи намиращи се у гликопротеините и гликолипидите и са широко разпространени в животинските тъкани (Momol, T. и сътр., J. Biol. Chem. 261, 16270-16273 [1986]). Сяловите киселини играят важна роля в биологичните функции на въглехидратните структури поради тяхната крайна позиция. Например, сяловата киселина функционира като лиганда за свързването на вируса на инфлуенцата с клетката гостоприемник (Paulson, J.C., The Receptors, vol. 2, Conn, P.M., ed., p. 131-219, Academic Press [1985]).

Дори промяната в свързването на сяловата киселина е достатъчна да измени специфичността на гостоприемника (Roger, G.N. и сътр. Nature 304, 76-78 [1983]). Невралната клетъчна адхезионна молекула (NCAM) е предмет на регулирано с развитието полисиалилиране, за което се приема, че модулира NCAM медирана клетъчна адхезия през време на развитието на нервната система (Rutishauser, U. и сътр., Science 240, 53-57 [1988] и Rutishauser, U. , Adv.Exp.Med.Biol. 265, 179-180 [1990]). Напоследък, за карбохидратната структура сialiyl люисова X (SLe^x) е показано, че функционира като лиганда за ендотелиалната левкоцитна адхезионна молекула ("E-Selectin"), която посредничи в свързването на неутрофилите с активираните ендотелиални клетки (Lowe и сътр., 1990, Phillips и сътр., 1990, Goelz и сътр., 1990, Walz и сътр., 1990, Brandley и сътр., 1990). Р-селектинът (зависещ от активираната гранула протеин на външната мембрана, CD62) за друг член на селектиновата фамилия (Stoolman, L.M., Cell 56, 907-910 [1989]), също е показано, че разпознава SLe^x намиращи се в моноцитите и PMNs (Larsen и сътр., Proc. Natl.Acad.Sci. USA 87, 6674-6678 [1990], Momol и сътр., J.Biol.Chem. 261,

16270-16273 [1986]], Polley и сътр., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88, 6224-6228 [1991], Chan, K,F,J., J.Biol.Chem. 263, 568-574 [1988], Beyer, T.A. и сътр., Adv.Enzymol., 52, 23-175 [1981]). В двата примера сиаловата киселина е ключов компонент във въглехидратната структура, за да функционира като лиганда. В допълнение към ролята при клетъчната адхезия, сиаловата киселина съдържаща въглехидратни структури е установено, че играе роля пряко в диференциацията. Хематопоеичната клетъчна линия HL-60 може да бъде индуцирана към диференциация чрез третиране с гликолипида GM3. За ганглиозидите също се смята, че участвуват в модулацията на растежния фактор - протеин киназната активност и в контрола на клетъчния цикъл.

Една такава сиалилтрансфераза е пречистена както е описано в САЩ патент 5 047 335. Доколкото са достъпни известни количества от "пречистена" сиалилтрансфераза, те са достъпни в много малки количества отчасти и поради това, че са мембранно свързани протеини на ендоплазмения ретикулум и на апарата на Golgi. Значителната цена, както икономическа така и трудностите за пречистване на тези сиалилтрансферази ги прави скъпен материал. Предмет на настоящото изобретение е да се изолира ДНК кодираща сиалилтрансфераза и да се произведат полезни количества от бозайникова, по-специално човешка сиалилтрансфераза като се използват рекомбинантни ДНК техники. Друг предмет на изобретението е да се създаде средство за получаване на ДНК кодираща други членове на сиалилтрансферазната генна фамилия от различни тъкани както и от други видове. Друг предмет на изобретението е да се получат нови форми на

сиалилтрансферази. Друг предмет на изобретението е да се създаде подобро средство за катализиране на преноса на сиаловата киселина към крайните позиции при някои въглеродни групи. Тези и други задачи на настоящото изобретение ще станат ясни от описанието като цяло.

Резюме на изобретението

Поставените с настоящото изобретение задачи се осъществяват с метод състоящ се в: идентифициране и клониране на гени, които кодират бозайникови сиалилтрансферази (дефинирани по-долу) включително, но не ограничено само до свинска Gal β 1,3GalNAc α 2,3 сиалилтрансфераза и Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3 сиалилтрансфераза от плъх (различна от Gal β 1,4GlcNAc α 2,6 сиалилтрансфераза от плъх), вмъкване на този ген в рекомбинантен ДНК вектор, трансформиране на подходящ гостоприемник с вектора включващ този ген, експресия на бозайниковите сиалилтрансферазни гени в такъв гостоприемник и събиране на така получената бозайникова сиалилтрансфераза. Алтернативно може да се използва разнообразие от други рекомбинантни техники, за да се получи експресия на сиалилтрансфераза. Подобно, съгласно настоящото изобретение е възможно да се произведе бозайникова сиалилтрансфераза и/или производни на същата, посредством рекомбинантни техники, както и да се осигури средство за продуциране на такива сиалилтрансферази. Сиалилтрансферазите са слабо разпространени протеини и трудни за пречистване. Изолирането и идентифицирането на сиалилтрансферазни гени е изключително трудно. mРНК са редки и клетъчни линии или други източници на големи количества mРНК са недостъпни. Настоящото изобретение за първи път

установява сиалилтрансферазна генна фамилия дефинирана чрез консервативен участък на хомоложност в каталитичния домен на ензимите.

Настоящото изобретение се отнася до състави и методи за получаване на бозайникова сиалилтрансфераза по пътя на рекомбинантна ДНК технология включваща: 1) откриване и идентифициране на цялостната ДНК последователност на ензимите и на 5'-граничещата област на същите, 2) конструиране на клониращ и експресионен носител съдържащ казаната ДНК последователност позволяващ експресията на бозайниковия сиалилтрансферазен протеин, както и за сливане или на сигнални N-крайни техни конюгати и 3) жизнеспособни клетъчни култури и други системи за експресия, генетически изменени по силата на това, че съдържат такива носители и са способни да продуцират бозайникова сиалилтрансфераза. Настоящото изобретение по-нататък се отнася до състави и методи за продукция на ДНК кодираща клетъчно продуциране на бозайникова сиалилтрансфераза. Друг аспект на настоящото изобретение са нови съединения, включително деоксирибонуклеотиди и рибонуклеотиди, които се използват за получаване на клонове способни да експресират сиалилтрансфераза. Друг аспект на настоящото изобретение е сиалилтрансфераза по същество чиста от всички природно срещащи се субстанции, с които тя обикновено се среща в кръвта и/или тъканите, например сиалилтрансфераза продуцирана по рекомбинантен път би била освободена от такива онечиствания обикновено срещащи се в тяхната *in vivo* физиологична среда. В допълнение, като се има предвид методът за получаване, сиалилтрансферазата може да

съдържа асоциирани гликозилати с по-голямо или по-малко разклонение в зависимост от материала изолиран от неговата *in vivo* физиологична среда, напр. кръв и/или тъкан. Настоящото изобретение по-нататък се отнася до нови производни на сиалилтрансфераза, по-специално производни без сиалилтрансферазни крайни аминокислотни остатъци, т.е. производни без късия NH_2 цитоплазмен домен или хидрофобната N-крайна сигнално контактна последователност, която съставя сиалилтрансферазния трансмембранен домен и стем участък.

Бозайниковата сиалилтрансфераза и нейните производни съгласно настоящото изобретение са полезни за добавянето на сиалови киселини към въглехидратните групи налични при гликопротеини и гликолипиди. В допълнение, сиалилтрансферазата и нейните производни са ензимно полезни при прибавяне на сиалова киселина към захарна верига, за да се продуцират въглехидрати, които функционират като определящ фактор в биологичното охарактеризиране. Такива сиалилтрансферазни ензими могат да се прилагат в мултиензимни системи за синтез на олигозахариди и производни (Ichikawa и сътр., *J.Am.Chem.Soc.* 113, 4698 [1991] и Ichikawa и сътр., *J.Am.Chem.Soc.* 113, 6300 [1991]). Накрая, ДНК, особено консервативният участък на хомоложност в каталитичния домен кодиращ сиалилтрансферазна генна фамилия съгласно изобретението е полезен за осигуряване средство за клониране на гена кодиращ други членове на сиалилтрансферазната генна фамилия. Друго използване на сиалилтрансферазата и ДНК кодираща сиалилтрансфераза са видни за специалистите от областта.

Описание на приложените фигури

Фиг. 1 Нуклеотидна и аминокиселинна последователност на Gal β 1,3GalNAc α 2,3 сиалилтрансфераза (" α 2,3-О") от свиня. Нуклеотидната последователност на α 2,3-О mРНК от свиня е определена посредством анализ на ДНК последователност на два препокриващи се клона λ ST1 и λ ST2. Очакваните аминокиселини на α 2,3-О полипептида са показани над ДНК последователността и са номерирани от първия остатък на N-края на аналогичния пречистен протеин. Предложената сигнално конкатна последователност е отбелязана с празно квадратче. Потенциалните гликозилирани части с последователността Asn-X-Thr са отбелязани със звездичка (*). Последователността съответствува на дългата форма на α 2,3 сиалилтрансфераза, кодирана от препокриващите се клонове λ ST1 и λ ST2.

Фиг. 2 Нуклеотидна и аминокиселинна последователност на Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-сиалилтрансфераза (" α 2,3-N") от плъх. Нуклеотидната последователност на α 2,3-N mРНК от плъх е определена с анализ на ДНК последователност. Очакваните аминокиселини на сиалилтрансферазния полипептид са посочени над ДНК последователността и са номерирани от първия остатък на зрелия протеин както е определен от N-крайната протеинова последователност.

Фиг. 3 Пречистване на α 2,3-О сиалилтрансфераза върху CDP-хексаноламин агароза (елуиране с KCl). Хомогенат от 2 кг свински черен дроб се зарежда върху колона CDP-хексаноламин агароза и се елуира с линеен градиент KCl (виж примерните изпълнение). Концентрацията на протеина и активността на сиалилтрансферазата като се използва лактоза като акцепторен субстрат, се определят от отделните фрак-

ции. Двата пика ензимна активност са отделени като обединение А и В както е посочено.

Фиг. 4 Пречистване на $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансфераза върху CDP-хексаноламин агароза (колона III, CDP елуиране). Ензимните активности се определят като се използва специфичен ензимен акцепторен субстрат антифризен гликопротеин (AFGP). В колони А и В елуирането на ензимната активност корелира предимно с 48 kDa и 45 kDa видове протеин съответно (виж SDS-PAGE). Тези два вида, форма А и форма В на $\alpha 2,3$ -О-сиалилтрансферазата, имат специфична активност от 8-10 единици/mg протеин. 48 kDa и 45 kDa видовете се пренасят върху PVDF мембрана и се анализират посредством ДНК крайната последователност.

Фиг. 5 NH_2 -крайна аминокиселинна последователност на 48 kDa и 45 kDa $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансферазен пептид. Шестнадесетте хидрофобни аминокиселини в близост до NH_2 -края на 48 kDa пептида съдържащи се в сигнално контактния домен са подчертани.

Фиг. 6 Рестрикционна карта и стратегия на последователността на два $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансферазни cДНК клона.

Фиг. 7 Сравнение на структурите на домените и хомоложните участъци на две сиалилтрансферази. А, хоризонтална проекция на първичната последователност на $\alpha 2,6$ сиалилтрансфераза и $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансфераза показваща участък от 45 аминокиселини с 64% идентична последователност и 84% подобна последователност.

В, хомоложният домен обхващащ свързването между екзони 2 и 3 на $\alpha 2,6$ сиалилтрансфераза и лежащ между каталитичните домени на двата ензима.

Фиг. 8 Експресия на разтворима каталитично активна $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансфераза. А: сДНК управляваща експресията на разтворима форма на $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансфераза, sp-ST, се конструира посредством заместване на див тип сиалилтрансферазен цитоплазмен домен и сигнално контактен домен с инсулин сигнален пептид. Предполага се, че sp-ST кодира 38 kDa, секретирайки протеинови видове, когато се трансфектират в клетките гостоприемници. В: sp-ST се включва в експресионния вектор pSVL и се трансфектира в COS-1 клетки. 48 посттрансфектиране клетките се бележат пулсационно в продължение на два часа в среда съдържаща Trans35S-белег и след това 5 часа в среда без белег. Тази среда се събира, концентрира се 15-кратно и се анализира посредством SDS-PAGE/флуорография. Анализират се допълнителни проби sp-ST и моделно трансфектираната клетъчна среда се анализира. С: COS-1 клетки се трансфектират с липофектин (+ sp-ST) или липофектин като такъв (контрола) по идентичен начин като 7В. След 48 часа трансфектиране средата се събира, концентрира се 15-кратно и се изследва за сиалилтрансферазна активност със специфичен акцепторен субстрат AFGP (Sadler, J.E. и сътр. J.Biol.Chem. 254, 4434-4443 [1979]).

Фиг.9 CID спектър на трипсинов пептид от Gal $\alpha 2,3$ -N сиалилтрансферазен ензим. Пептидната последователност е Leu-Thr-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-His-Cys^{*}-Arg, $MH^+ = 1283,6$. Cys^{*} означава карбоксиметилцистеин. Йони със запазен товар при N- края са отбелязани като а, b и с йони, а С-крайните йони са означени като x, y и z фрагменти (Biemann, K. (1990) Meth.Enzymol. 193: 886-887). Първите йони (а,х) са продукти

на скъсване между α въглерода и карбонилната група. Йоните у и b се формират, когато пептидната връзка се скъса.

Йоните с и z се появяват, когато настъпи скъсване между аминогрупата и α въглерода. Количеството на тези фрагменти винаги се иницира при съответните краища. Фрагментирането на страничната верига се среща между β и γ въглеродите на аминокиселините, като се получават така наречените d (N-крайни) и w (C-крайни) йони. Наблюдаваните фрагментни йони са включени в таблицата. Йоните принадлежащи към същата йонна серия са изброени в редове.

Фиг. 10 CID спектър на карбамилирани трипсинови пептиди от Gal α 2,3-N сиалилтрансферазен ензим. Пептидната последователност е Leu-Asn-Ser-Ala-Pro-Val-Lys, $MH^+ = 771,4$. Фрагментирането ясно показва модифициране при N-крайната, а не при ϵ -аминогрупата на лизиновия остатък. Изобилен йон при N-крайния левцин в този пептид. Йоните отбелязани със звездичка са свързани с матрицата йони от та верига (Falick и сътр. (1990) Rapid Commun. Mass Spectrom. 4: 318). Наблюдаваните фрагментни йони са включени в таблицата. Йоните принадлежащи към същата йонна серия са изброени в редове.

Фиг. 11 Хоризонтална проекция на пептиди 1 и 11 получени от Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-сиалилтрансфераза (ST3N) с предварително клонирана сиалилтрансфераза. Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-сиалилтрансфераза (ST6N) и Gal β 1,3GalNAc α 2,3-сиалилтрансфераза (ST3O) са показани като отворени линии. Запълненият квадрат показва сигнално контактната последователност. Заштрихованият квадрат показва участъка на хомоложност установен между двете сиалилтрансфери.

Фиг. 12 Консервативен участък разделен от трите клона сиалилтрансферази. Трите клона сиалилтрансферази са Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-сиалилтрансфераза (ST3N) от плъх, свинска Gal β 1,3GalNAc α 2,3-сиалилтрансфераза (ST3O) и Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-сиалилтрансфераза (ST6N) от плъх. Участъкът се състои от 55 аминокиселини от остатък 156 до остатък 210 на Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-сиалилтрансфераза (ST3N). Аминокиселинната идентичност е посочена чрез ограждане в квадрат.

Фиг. 13 Очаквана аминокиселинна последователност на усилващите фрагменти SM1 и сравнение с предварително охарактеризирания консервативен участък на хомоложност. Консенсусът консервативен участък на хомоложност се поражда от сравнението на консервативния участък на хомоложност на клонираната и охарактеризирана сиалилтрансфераза и усилващия фрагмент SM1. Инвариантните аминокиселини са отбелязани с букви отгоре, докато присъстващите аминокиселини повече от 50% в консервативния участък на хомоложност са с букви отдолу. Местата, където се намират г или q са означени с b, местата където се намира или i или v са означени с х. Подчертаните аминокиселини означават участъците, които се използват при конструиране на изродени праймери. Промените в по-рано получените инвариантни аминокиселини намерени в усилващия фрагмент са отбелязани със звездичка.

Фиг. 14 Нуклеотидна и очаквана аминокиселинна последователност на STX1. Очакваната аминокиселинна последователност на най-дългата отворена рамка на разчитане кодираща консервативния участък на хомоложност SM1

(аминокиселини 154-208), са означени със заграждане. Предложената сигнално контактна последователност (аминокиселини 8-23) са оградени в квадрат и потенциално N-свързаните гликозилирани места са подчертани.

Подробно описание

Както е използвана тук, сиалилтрансфераза или производни на сиалилтрансфераза се отнася до сиалилтрансферазни ензими, освен Gal β 1,4GlcNAc α 2,6 сиалилтрансфераза от плъх, които съдържат консервативен участък на хомоложност в каталитичния домен и са ензимно активни при пренасяне на сиалова киселина към крайните позиции на захарните вериги на гликопротеини, гликолипиди, олигозахариди и подобни. Примери за ензимно функционални сиалилтрансфери са тези, способни да пренасят сиалова киселина от СМР-сиалова киселина към олигозахаридния акцептор, където олигозахаридният акцептор варира в зависимост от конкретната сиалилтрансфераза.

"Консервативен участък на хомоложност" се отнася до серия аминокиселини в една сиалилтрансфераза, която е по същество идентична на същата серия аминокиселини в друг сиалилтрансферазен ензим щом като са били подредени последователностите на двата ензима. В сиалилтрансферазната генна фамилия съгласно настоящото изобретение консервативният участък на хомоложност е в каталитичния домен и се простира върху най-малко около 7 свързани аминокиселини, за предпочитане при най-малко около 20 аминокиселини и най-вече върху най-малко 55 аминокиселини с аминокиселинна последователност на остатъците 156-210 от фиг.2 или остатъците 142-196 от фиг. 1. Веднъж идентифици-

ран консервативният участък на хомоложност, могат да се направят варианти на аминокиселинна последователност на консервативния участък попадащи в един или повече от три класа: варианти получени чрез заменяне, чрез включване или чрез изпускане (делеция). Тези варианти обикновено се получават чрез мутагенеза на специфично място в нуклеотидите в ДНК кодираща сиалилтрансфераза, при което продуцираната ДНК кодираща сиалилтрансфераза съдържа вариант на консервативния участък на хомоложност.

В обхвата на сиалилтрансферазата се включват например $\text{Gal}\beta 1,3(4)\text{GlcNAc } \alpha 2,3$ сиалилтрансфераза от плъх (тук означена като " $\alpha 2,3\text{-N}$ "), която формира $\text{NeuNAc } \alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ и $\text{NeuAc} \alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ последователности, които често завършват комплекса N-свързани олигозахариди. Други примери включени в обхвата на сиалилтрансфераза са свинска $\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc } \alpha 2,3$ сиалилтрансфераза (тук означена като (" $\alpha 2,3\text{-O}$ "), която формира $\text{NeuAc} \alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc}$ намерена в захарни вериги O-свързани към треонин или серин както и като крайни секвенции на определени ганглиозиди.

В обхвата на сиалилтрансфераза както е използван тук терминът, са включени сиалилтрансферазата с нативно гликозилиране и аминокиселинните последователности на сиалилтрансфераза от плъх и свинска сиалилтрансфераза както е изложено на фиг. 1 или 2, аналогична сиалилтрансфераза от други животински видове като говежда, човешка и подобни, както и от други тъкани, дегликозилирани или негликозилирани производни на такива сиалилтрансферази, варианти на аминокиселинна последователност и *in vitro*-породени ковалентни производни на сиалилтрансферази.

Всички тези форми на сиалилтрансфераза съдържат консервативния участък на хомоложност и са ензимно активни или ако не са, те носят поне един имунен епитоп заедно с ензимно активната сиалилтрансфераза.

Вариантите на аминокиселинна последователност на сиалилтрансферазата попадат в един или повече от трите класа: варианти получени чрез заместване, чрез включване и чрез делеция. Тези варианти обикновено се приготвят чрез специфична по място мутагенеза на нуклеотиди в ДНК кодираща сиалилтрансфераза, като се продуцира ДНК кодираща варианта и след това експресиране на ДНК в рекомбинантна клетъчна култура. Все пак, вариантни сиалилтрансферазни фрагменти с до около 100-150 остатъка могат да се получат обикновено като се използва *in vitro* синтеза. Вариантите на аминокиселинна последователност се охарактеризират посредством предварително определяне на природата на варианта, характеристика, която ги отделя от природно-срещащи се алелни или междувидови вариации на аминокиселинна последователност на сиалилтрансфераза. Вариантите в консервативния участък на хомоложност типично показват същата качествена биологична активност както природносрещащия се аналог.

Тъй като мястото на въвеждане на варианта аминокиселинна последователност е определено по-рано, мутацията *per se* не се нуждае от предварително определяне. Например, с оглед да се оптимизира извършването на мутация на дадено място, може да се проведе ненасочена мутагенеза при кодона мишена или участъка и експресираните варианти на сиалилтрансфераза се отсяват за оптималната комби-

нация на желана активност. Техниките за провеждане на мутации чрез заместване при по-рано определените места в ДНК имащи позната последователност са добре известни, например M13 иницирана мутагенеза или PCR базирана мутагенеза.

Аминокиселинните субституции обикновено са с прости остатъци, включванията са от порядъка на около 1 до 10 аминокиселинни остатъци и делецията е от порядъка на 1 до 30 остатъка. Делецията и включванията за предпочитане се извършват в съседни двойки, т.е. изпускане на 2 остатъка или включване на 2 остатъка. Заменяне, включване и делеция или каквато и да е комбинация от тях могат да се комбинират, за да се достигне крайната структура. Очевидно, мутацията, която ще се извърши в ДНК кодираща варианта сиалилтрансфераза, не трябва да измества секвенцията извън рамката на разчитане и за предпочитане не трябва да създава допълнителни участъци, които биха могли да продуцират вторична mРНК структура (EP 75,444A).

Варианти получени чрез заменяне са тези, в които най-малко един остатък от фиг.1 или 2 последователности е отстранен и на негово място е вмъкнат различен остатък. Такива заменяния най-общо се правят съгласно следващата таблица 1, когато това се желае за крайно модулиране характеристиката на сиалилтрансферазата.

ТАБЛИЦА 1

Оригинален остатък	Примерно заместване
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phee
Val	Ile, Leu

Съществени промени във функцията или имунологичната идентичност се правят чрез подбиране на заменианията, които да са по-малко консервативни от тези в таблица 1, т.е. като се избират остатъци, които се различават по-значително по техния ефект на запазване (а) структурата на полипептидния скелет в областта на заместването, например листовата или спирална конформация, б) натоварването или

хидрофобността на молекулата на мястото на мишената или в) големината на страничната верига. Заменянията, които най-общо се очаква да предизвикат най-големите промени в свойствата на сиалилтрансферазата са тези, при които:

а) хидрофилен остатък, напр. серил или треонил се замества с (или от) хидрофобен остатък напр. левцил, изолевцил, фенилаланил, валил или аланил, б) цистеин или пролин се замества с (или от) всеки друг остатък, в) остатък притежаващ електроположителна странична верига напр. лизил, аргинил или хистидил, се замества с (или от) електроотрицателен остатък напр. глутамил или аспартил или г) остатък притежаващ обемиста странична верига напр. фенилаланин се замества с (или от) такъв, който няма странична верига напр. глицин.

Главен клас варианти получени чрез заместване или делеция са тези, които включват трансмембранен и/или цитоплазмен участък на сиалилтрансфераза. Цитоплазменият домен на сиалилтрансфераза е последователността от аминокиселинни остатъци започваща от стартовите кодони показани на фиг. 1 и 2 и продължаваща приблизително 11 допълнителни остатъци. Остатъците 10-28 и 12-27 съответно, от плъх и свиня се счита че служат като последователност спираща преноса. Конформационните извивки въведени чрез Phe-Val-Arg-Asn и Pro-Met-Arg-Lys-Lys-Ser-Thr-Leu-Lys остатъците от плъх и свиня, съответно, и електроположителният характер на тези остатъци действуват заедно с трансмембрания остатък описан по-долу, препятстващо преноса на сиалилтрансфераза през клетъчната мембрана.

Трансмембраният участък на сиалилтрансферазата

е разположен в последователността отделена от свиня при остатъците 12-27 (където Ala е +1 както е показано на фиг. 2) и в последователността получена от плъх в аналогично местоположение. Този участък е силно хидрофобен домен, който със свойствения си размер обхваща липидния двоен слой на клетъчната мембрана. Счита се, че функционира в съгласие с цитоплазмения домен за контакт на сиялил-трансфераза в апарата на Golgi или в еноплазмения ретикулум.

Делеция или заменяне на който и да е или на двата, цитоплазмения и трансмембрания домени улеснява събирането на рекомбинантна сияилтрансфераза чрез намаляване на нейния клетъчен или мембранен липиден афинитет и подобряване на нейната разтворимост във вода така че да не са необходими детергенти, за да се поддържа сияилтрансферазата във воден разтвор. (Виж напр. САЩ патент № 5 032 519 описващ производството на разтворима β -галактозид $\alpha 2,6$ -сияилтрансфераза, която тук е специално включена за сравнение). Делеция само на цитоплазмения домен като в същото време се запазва трансмембранната последователност води до продуциране на сияилтрансфераза, която се солюбилизира с детергент. Сияилтрансфераза с отпаднал цитоплазмен домен е по-подходяща да се вмъкне в мембрани, като при това се създава възможност да се насочи нейната ензимна активност. За предпочитане е цитоплазмените или трансмембранните домени да се изпускат, отколкото да се заменят (напр. аминокиселини 1-33 при $\alpha 2,3$ -N сияилтрансфераза от плъх, за да се спре трансфера на секвенция за продуциране на разтворима сияилтрансфераза).

Цитоплазмената и/или трансмембранна (С-Т) сиа-
лилтрансфераза получена чрез делеция или заменяне
може да се синтезира директно в рекомбинантна клетъчна
култура или като сливане със сигнална последователност
за предпочитане сигнал хомоложен на гостоприемника.
Например, при конструиране на прокарриотен експресионен
вектор С-Т домените се изпускат с помощта на бактериална
алкална фосфатаза Ipp или топлинно устойчиви ентеротоксин
II лидери, а за дрожди домените се заместват с дрождена
инвертаза, алфа фактор или киселофосфатазни лидери. При
бозайникова клетъчна експресия С-Т домените се заместват с
бозайникови клетъчни вирусни секреторни лидери например
herpes simplex gD сигнал. Когато секреторният лидер е
"разпознат" от гостоприемника, сигналната пептидаза на
гостоприемника е способна да скъса свързването на лидерния
полипептид свързан при нейния С-край до С-Т изпуснатата
сиалилтрансфераза. Предимството на С-Т изпуснатата
сиалилтрансфераза е, че тя може да бъде секретирана в
културална среда. Този вариант е водоразтворим и няма
оценим афинитет към клетъчно-мембранните липиди като по
такъв начин значително се опростява събирането му от
рекомбинантната клетъчна култура.

Прибавянето на детергент, като напр. нейонен
детергент, може да се използва за солюбилизиране, стабили-
зиране и/или за засилване биологичната активност на проте-
ините, които съдържат мембранната контактна последо-
вателност. Например, предпочитан детергент е дезоксихо-
ловата киселина, но може да се използват и Tween, NP-40 и
Triton X-100, както и други детергенти. Изборът на детер-

гент се определя по усмотрение на използващия го специалист като се базира на специфичните условия на средата и природата на включения полипептид(и).

Мутагенеза посредством заменяне или делеция се използва, за да се елиминират N- или O-свързани гликозилирани места. Алтернативно, негликозилирана сиалилтрансфераза се получава в рекомбинантна прокариотна клетъчна култура. Делеция на цистеин или друг лабилен остатък също може да бъде желано, например за увеличаване на окислителната стабилност на сиалилтрансферазата. Делеция или заменяне на потенциални протеолитични места, напр. дибазични остатъци като ArgArg, се извършват посредством делеция на единия от базичните остатъци или заменянето на единия от тях с глутаминилов или хистидилов остатък.

Варианти на включване на аминокиселинна последователност на сиалилтрансферазата са тези, при които един или повече аминокиселинни остатъци са въведени на предварително определено място в мишената сиалилтрансфераза. Обичайно, вариантите с включване са сливане на хетероложни протеини или полипептиди с amino или карбоксилния край на сиалилтрансферазата.

ДНК кодираща сиалилтрансфераза се получава от други източници освен от плъх или свиня чрез а) получаване на сДНК банка от различни тъкани като черен дроб или подчелюстни слюнчени жлези от даденото животно, б) провеждане на хибридизационен анализ с белязана ДНК кодираща консервативния участък на хомоложност на сиалилтрансфераза или фрагменти от същата (обикновено по-големи от 30 bp)

с оглед да се открият клонове в сДНК банката съдържаща хомоложни последователности и в) анализиране на клоновете посредством рестрикционен ензимен анализ и секвениране на нуклеиновата киселина, за да се идентифицира пълната дължина на клона. Ако в банката не присъствуват клонове с пълна дължина, тогава подходящи фрагменти могат да се събират от различни клонове и свържат при рестрикционните места общи за клоновете, за да се съчлени клон с пълна дължина.

"По същество несъдържаща" или "по същество чиста", когато се описва състоянието на сиялилтрансфераза продуцирана съгласно изобретението, означава свободна от протеини или други материали нормално свързани със сияилтрансферазата в нейната природно срещана *in vivo* физиологична среда, като например когато сияилтрансферазата се получава от кръв и/или тъкан посредством екстракция и пречистване. Сияилтрансферазата получена по метода съгласно настоящото изобретение е повече от или равна на 95 тегловни % сияилтрансфераза от общия протеин, съдържа проста наситена връзка (чрез синьо оцветяване по Coomassie) при електрофореза на полиакриламиден гел и има специфична активност най-малко около 500 pmole/mg протеин/мин.

С термина "по същество подобна" или "по същество идентична" както е използван тук се отбелязва характеристиката на полипептидната последователност или последователността на нуклеиновата киселина, където полипептидната последователност има най-малко 70% идентичност на последователността сравнена с контролна последователност, а последователността на нуклеиновите киселини е с най-малко

80% идентичност сравнена с контролна последователност. Процентът на идентичност на последователността е изчислен като се изключват малките отделения или прибавяния, които общо са по-малко от 35% от контролната последователност. Контролната последователност може да бъде подклас от по-голяма последователност като тези показани на фиг.1 и 2, като все пак контролната последователност е дълга най-малко 18 нуклеотида в случая на полинуклеотиди и дълга поне 6 аминокислотни остатъка в случая на полипептиди.

Най-общо, прокариотите се използват за клониране на ДНК последователности при конструиране на векторите полезни съгласно изобретението. Например, *E.coli* K12 щам 294 (ATCC № 31446) е особено полезен. Други микробни щамове, които могат да бъдат използвани са *E.coli* B и *E.coli* X1776 (ATCC № 31537). Тези примери са илюстриращи, но не ограничаващи.

Прокариотите се използват също и за експресия. Могат да се използват гореспоменатите щамове, както и *E.coli* W3110 (F⁻λ⁻, прототрофен, ATCC № 27325), бацили като *Bacillus subtilis* и други ентеробактерии като *Salmonella typhimurium* или *Serratia marcescans* и различни видове *Pseudomonas*.

Най-общо, плазмидни вектори съдържащи промотори и контролни последователности, които са получени от видове съвместими с клетката гостоприемник се използват с тези гостоприемници. Векторът обикновено носи мястото на репликация, както и маркираната последователност, които могат да осигурят фенотипна селекция в трансформирани клетки. Например, *E.coli* обикновено се трансформира като се

използва pBR322, плазмид получен от *E.coli* видове (Bolivar и сътр., *Gene* 2, 95 [1977]). pBR322 съдържа гени за ампицилинова и тетрациклинова резистентност и по такъв начин осигуряват лесно средства за идентифициране на трансформираните клетки. pBR322 плазмидът или друг микробен плазмид трябва също да съдържа или да се модифицира щото да съдържа промотори и други контролни елементи обичайно използвани при конструирането на рекомбинантна ДНК.

За илюстрация, промотори подходящи за използване с прокариотни гостоприемници включват β -лактамазна и лактозна промоторна система. (Chang и сътр., *Nature*, 275, 615 [1976] и Goeddel и сътр., *Nature*, 281, 544 [1979]), алкална фосфатазна, триптофанова (*trp*) промоторна система (Goeddel, D., *Nucleic acids Res.* 8, 4057 [1980]) и хибридни промотори като *tac*-промотор (de Boer, H., *PNAS (USA)* 80, 21-25 [1983]). Подходящи са, обаче, и други функционални бактериални промотори. Техните нуклеотидни последователности са известни, което дава възможност на специалистите операторно да ги свързват към ДНК кодираща сиалилтрансфераза (Siebenlist и сътр., *Cell* 2 [1980]) като се използват линкери или адаптори, за да се осигурят изискваните места за рестрикция. Промоторите използвани в бактериални системи могат да съдържат също последователност на Shine-Dalgarno (S.D.) операторно свързана с ДНК кодираща сиалилтрансфераза.

В допълнение към прокариотите, могат да се използват също еукариотни микроби като дрождени култури. Най-общоизвестният еукариотен микроорганизъм е *Saccharomyces cerevisiae* или мая за хляб, въпреки че са

достъпни много други щамове. За експресия в *Saccharomyces*, общоизползван е например плазмидът YRp7, (Stinchomb и сътр., *Nature* 282, 39 [1979], Kingsman и сътр., *Gene* 7, 141 [1979], Tschempel и сътр., *Gene* 10, 157 [1980]). Този плазмид предварително съдържа *trp1* ген, който осигурява селекционен маркер за мутантен щам от дрожди, на който липсва възможността да расте в триптофан, например ATCC № 44076 или PER4-1 (Jones, *Genetics* 85, 12 [1977]). Наличието на *trp1* лезия като характеристика на геном от дрождена клетка гостоприемник осигурява в ефективна околна среда откриване трансформация чрез растеж в отсъствие на триптофан.

Подходящи промоторни последователности за употреба с дрожден гостоприемник са промотори за 3-фосфоглицераткиназа (Hitzeman и сътр., *J. Biol. Chem.* 225, 2073 [1980]) или други гликолитични ензими (Hess и сътр., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7, 149 [1968] и Holland, *Biochemistry* 17, 4900 [1978]), като енолаза, глицералдехид-3-фосфатдехидрогеназа, хексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозефосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюकोкиназа.

Други дрождени промотори, които са индуциращи промотори с допълнителното предимство на транскрипция контролирана от растежните условия, са промоторните участъци за алкохол дехидрогеназа 2, изоцитохром C, кисела фосфатаза, разграждащи ензими свързани с азотния метаболизъм, металотионеин, глицералдехид-3-фосфатде-хидрогеназа и ензими отговорни за малтозното и галактозно оползотворяване. Подходящи вектори и промотори използва-

ни при дрождена експресия са описани от R.Hitzemdn и сътр., EP № 73,657A. Дрождени усилватели се използват също изгодно с дрождени промотори.

"Контролен участък" се отнася за специфични последователности при 5' и 3' краищата на еукариотните гени, които могат да се включат в контрола на транскрипцията или транслацията. В същност всички еукариотни гени притежават богат на АТ участък, разположен приблизително 25 до 30 бази обратно от мястото, където започва транскрипцията. Друга последователност, установена 70 до 80 бази обратно от старта на транскрипцията на много гени е СХСААТ участъка, където Х може да бъде всеки нуклеотид. При 3' края на повечето еукариотни гени е ААТААА последователността, която може да бъде сигнална за прибавяне на на poly А опашка към 3' края на транскрибираната mРНК.

Предпочитани промотори, контролиращи транскрипцията от вектори в гостоприемник от бозайникови клетки могат да се получат от различни източници, например геномите на вируси като: полиома, Simian virus (SV40), аденовирус, ретровируси, хепатит-β вирус и цитомегаловирус или от хетероложни бозайникови промотори, напр. бета актинови промотор. Ранните и късните промотори на SV40 вируса се получават обикновено като SV40 рестрикционен фрагмент, който също съдържа SV40 вирусното начало на репликация (Fiers и сътр., Nature, 273, 113 [1978]). Непосредствения ранен вирус на човешки цитомегаловирус обичайно се получава като HindIII E рестрикционен фрагмент (Greenaway, P.J. и сътр., Gene 18 355-360 [1982]). Разбира се промотори от клетките гостоприемник или родствени видове тук също са

полезни.

Транскрипцията на ДНК кодираща енкефалиназа от по-висши еукариоти се усилюва чрез включване на усиливаща секвенция във вектора. Усилвателите са *cis*-действащи елементи на ДНК, обикновено от около 10-3000bp, които действуват върху промотора така че увеличават неговата транскрипция. Усилвателите са независими относно ориентация и позиция и са намерени 5' (Laimins, L. и сътр., PNAS 78, 993 [1981]) и 3' (Lusky, M.L. и сътр., Mol.Cell Bio.3, 1108 [1983]) спрямо транскрипционната единица, в интрона (banerij, J.L. и сътр., Cell 33, 729 [1983]) както и в самата кодираща последователност (Osborne, T.F. и сътр., Mol. Cell Bio. 4, 1293 [1984]). Понастоящем са известни много усиливащи последователности от бозайникови гени (глобин, еластаза, албумин, α -фетопротейн и инсулин). Обикновено, обаче, се използва усиливател от еукариотен клетъчен вирус. Примери са SV40 усиливател на последната част на началото на репликацията (bp 100-270), усиливател на ранния промотор на цитомегаловируса, усиливател от полиома на последната част на началото на репликацията и аденовирусни усиливатели.

Експресионните вектори използвани в еукариотни клетки гостоприемници (дрождени, фунгални, насекомни, растителни, животински, човешки или нуклеотидни клетки от други многоклетъчни организми) също съдържат последователности необходими за завършването на транскрипцията, която може да засегне експресията на mРНК. Тези участъци се транскрибират като полиаденилатни сегменти в нетранслираната част на mРНК кодираща салилтрансфераза. 3' нетранслираните участъци също включват места за завърш-

ване на транскрипцията.

Експресионните вектори могат да съдържат ген от селекцията, също завършващ с избираем маркер. Примери за подходящи избираеми маркери за животински клетки са дихидрофолатредуктаза(DHFR), орнитиндекарбоксилаза, биохимичен маркер за резистентност на много лекарства, аденозиндеаминаза, аспарагинсинтетаза, глутаминсинтетаза, тримидинки-наза или неомицин. Когато такива избираеми маркери се прехвърлят успешно в животинската клетка гостоприемник, трансформираната бозайникова клетка гостоприемник може да оживее ако се постави под избрано налягане. Има две широко използвани различни категории на селективни режими. Първата категория се базира на клетъчния метаболизъм и на използването на мутантна клетъчна линия, която няма способността да расте независима от добавената среда. Два примера са CHO DHFR-клетки и миши LTK-клетки. Тези клетки растат без прибавяне на такива хранителни вещества като тимидин или хипоксантин. Понеже на тези клетки им липсват известни гени необходими за пълния нуклеотиден път на синтеза, те не могат да преживеят, освен ако липсващият нуклеотиден синтезен път се осигури в допълнителна среда. Алтернатива на добавянето на хранителна среда е да се въведе интактна DHFR или TK ген в клетките, на които им липсват съответните гени, като по такъв начин се изменят изискванията за растежа им. Индивидуални клетки, които не са трансформирани с DHFR или TK ген не са способни да преживяват в среди без добавки.

Втората категория е доминантна селекция, която съответствува на селекционната схема използвана при всеки

клетъчен тип и не изисква използването на мутантна клетъчна линия. При тези схеми обикновено се използва лекарство, за да се прекрати растежът на клетката гостоприемник. Онези клетки, които имат нов ген ще експресират протеин, който носи резистентност към лекарството и преживява селекцията. Примери за такава доминантна селекция са лекарствата неомизин (Southern, P. , Berg, P., J.Molec.Appl.Genet, 1, 327 [1982]), микофенолна киселина (Mulligan, R.C., Berg, P., Science 209, [1980]) или хидромицин (Sugden, B. и сътр., Mol. Cell Biol. 5, 410-413 [1985]). При трите примера дадени по-горе се използват бактериални гени под еукариотен контрол, за да се придаде резистентност към подходящото лекарство G418 или неомизин (гентицин), *hprt* (микофенолна киселина) или хигромицин, съответно.

"Амплификация" отговаря на увеличението или репликацията на изолиран участък в клетъчната хромозомна ДНК. Амплификацията се постига като се използва селекционно средство, напр. метотрексат (MTX), който инактивира DHFR. Амплификацията или акумулацията на многобройни копия от DHFR ген има за резултат по-големи количества DHFR продуцирана въпреки по-големите количества MTX. Амплификационен натиск се прилага без да се препятствува присъствието на ендогенна DHFR, чрез прибавяне на все по-големи количества MTX към средата. Амплификация на желанния ген може да бъде постигната чрез конрансфекция на бозайникова клетка гостоприемник с плазмид имащ ДНК кодираща желанния протеин и DHFR или амплификационен ген чрез коинтеграция се отнася като коамплификация. Веднъж дадена възможност на клетката да изисква повече DHFR, това

изискване се удовлетворява чрез репликация на селекционен ген, чрез селектиране само на клетки, които могат да растат в присъствието на все по-големи концентрации МТХ. Доколкото генът кодиращ желанния хетероложен протеин се интегрира със селекционния ген, репликацията на този ген често поражда репликация на гена кодиращ желанния протеин. Резултатът е, че увеличените копия на гена, напр. амплифицирания ген, кодиращ експресията на желанния хетероложен протеин, експресира повече от желанния хетероложен протеин.

Предпочитани подходящи клетки гостоприемници за експресия на вектори съгласно настоящото изобретение кодиращи сиалилтрансфераза в по-висши еукариоти са: CV1 линия от маймунски бъбреци трансформирана чрез SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), клетъчна линия от човешки бъбрек в ембрион (293) (Graham, F.L. и сътр., J.Gen.Virol. 36, 59 [1977]), бъбречни клетки от хамстерчета кърмачета (BHK, ATCC CCL 10), овариални клетки DHFR от китайски хамстер (CHO, Urlaub and Chasin, PNAS (USA) 77, 4216 [1980]), сертолиеви клетки от мишка (TM4, Mather, J.P., Biol.Reprod. 23, 243-251 [1980]), бъбречни клетки от маймуна (CV1 ATCC CCL 70), бъбречни клетки от африканска зелена маймуна (VERO-76 ATCC CRL 1587), клетки от човешка цервикална карцинома (HELA ATCC CCL 2), бъбречни клетки от куче (MDCK ATCC CCL 34), чернодробни клетки от биволски плъх (BRL 3A, ATCC CCL 75), човешки белодробни клетки (W138, ATCC CCL 75, човешки чернодробни клетки (Her G2, HB 8065), миши тумор на гърдната жлеза (MMT 060562, ATCC CCL 51) и TRI клетки (Mather, J.P. и сътр., Annals N.Y. Acad. Sci. 383, 44-46 [1982]), бакуловирни клетки.

"Трансформация" означава въвеждане на ДНК в организма така че ДНК се реципира или като извънхромозомен елемент или като хромозомна интеграция. Освен ако не е посочено друго, използваният тук метод за трансформация на клетките на гостоприемника е методът на Graham, F. и Van der Eb, A., *Virology* 52, 456-457 [1973]). Обаче, могат да се използват и методи за вкарване на ДНК в клетките, например чрез ядрено инжектиране или чрез сливане на протопласти. Ако се използват прокариотни клетки или клетки, които съдържат здрава клетъчна стена, предпочитаният метод на трансформация е третиране с калций, като се използва калциев хлорид както е описано от Cohen, F.N. и сътр., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110 [1972].

За анализ, за да се потвърдят правилните последователности в конструируания плазмид, се използват лигирани смеси за трансформиране на *E. coli* K12 294 щам 294 (ATCC 31446) като подходящи са успешно трансформирани избрани по ампицилинова или тетрациклинова резистентност. Приготвят се плаزمиди от тези трансформанти, анализират се чрез рестрикция и/или се секвенират по метода на Messing и сътр., *Nucleic Acids Res.* 9, 309 [1981] или по метода на Махам и сътр., *Methods in Enzymology* 65, 449 [1980].

Клетките на гостоприемника могат да се трансформират с експресионни вектори съгласно настоящото изобретение и се култивират в обичайна хранителна среда, модифицирана за инициране на промоторите като се избират трансформантите или амплифицираните гени. Условиата на култивиране като температура, рН и подобни са тези използвани по-рано при клетките гостоприемници избрани за екс-

пресия и са добре познати.

"Трансфекция" се отнася до поемането на експресионен вектор от клетката гостоприемник без значение дали в действителност се експресира някаква кодираща последователност. На специалистите са познати многобройни методи за трансфекция, например, CaPO_4 и електропорация. Успешната трансформация най-общо се разпознава когато в клетката гостоприемник настъпи някаква индикация за операциите на този вектор.

С оглед да се улесни разбирането на следващите примери тук се описват някои често срещащи се методи и/или термини.

"Плазмиди" са означени с малка буква р, като преди нея и/или след нея има главни букви и/или цифри. Изходните плазмиди тук са или търговско достъпни, неограничено публично достъпни, или могат да се конструират от достъпни плазмиди съгласно публикувани методи. Освен това, в областта са известни еквивалентни на описаните плазмиди и те са ясни за обикновените специалисти.

"Смилане" на ДНК означава каталитично отцепване на ДНК с помощта на рестрикционен ензим, който действа само в определени последователности в ДНК. Различните рестрикционни ензими използвани тук са търговско достъпни и реакционните условия за тях, кофактори и други изисквания се използват както са известни на специалистите. За аналитични цели обикновено 1 μg плазмид или ДНК фрагмент се използва с около 2 единици ензим в около 20 μl буферен разтвор. С цел изолиране на ДНК фрагменти за конструиране на плазмид, обикновено 5 до 50 μg ДНК се смела с 20 до 250

единици ензим в по-голям обем. Подходящи буфери и субстратни количества за конкретните рестрикционни ензими са уточнени от производителя. Обикновено се използва време за инкубиране от около 1 час при 37°C, но може да се варира съгласно инструкциите на доставчика. След смилането реакционната смес се подлага на електрофореза директно върху полиакриламиден гел, за да се изолира желаният фрагмент.

Разделянето на фрагментите по размер се осъществява като се използва 8 процентен полиакриламиден гел описан от Goeddel, D. и сътр., *Nucleic Acids Res.*, 8, 4057 [1980].

"Дефосфориране" означава отстраняване на крайните 5'-фосфати посредством третиране с бактериална алкална фосфатаза (BAP). Тази процедура предпазва двата рестрикционно разделени края на ДНК фрагмента от "циркуларизирания" или образуващия затворена бримка, което налага включване на друг ДНК фрагмент на мястото на рестрикция. Процедурите и реактивите за дефосфориране са конвенционални (Maniatis, T. и сътр., *Molecular Cloning* p. 133-134 [1982]) Реакциите с използване на BAP се извършват в 50 mM Tris при 68°C, за да се потисне активността на която и да е екзонуклеаза, която може да присъствува в ензимния препарат. Реакцията протича за един час. След реакцията ДНК фрагментът се пречиства.

"Олигонуклеотиди" се отнася или до едноверижни полидеоксинуклеотиди или до две комплементарни полидеоксинуклеотидни вериги, които могат да се синтезират химически. Такива синтетични олигонуклеотиди имат 5'-фосфат и затова не се лигират с друг олигонуклеотид без

прибавяне на фосфат с АТЗ в присъствието на киназа. Синтетичният олигонуклеотид се лигира с фрагмент, който не е бил дефосфорилиран.

"Лигиране" се отнася до процеса на образуване на фосфодиестерни връзки между два двойноверижни фрагмента от нуклеинова киселина (Maniatis, T. и сътр., Id., p. 146). Ако не е посочено друго, лигирането може да се осъществи като се използват известни буфери и условия с 10 единици Т4 ДНК лигаза за 0,5 µg от приблизително еквимоларни количества ДНК фрагменти за лигиране. За конструиране на подходящи вектори съдържащи желаната кодираща и контролна последователност се използват стандартни техники за лигиране. Изолираните плазмиди или ДНК фрагменти се прилепват, зашиват или лигират отново във форма желана на формата на искания плазмид.

"Запълнени" или "тъпи краища" се отнася до процедури, при които едновержият край в лепливия край на отстранената с рестрикционен ензим нуклеинова киселина се превръща в двойна верига. Това елиминира лепливите краища и образува тъп край. Този процес, обратно, е инструмент за превръщане на рестрикционно срязания край, който може да бъде леплив с края създаден само с един или няколко други рестрикционни ензима, в край съвместим с всяка тъпо-срязваща рестрикционна ендонуклеаза или друг запълнен леплив край. Обикновено завършването с тъп край се извършва посредством инкубиране на 2-15 µg от ДНК мишената в 10mM MgCl₂, 1 mM дитиотреитол, 50 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5) буфер при около 37°C в присъствие на 8 единици фрагмент на ДНК полимераза I на Klenow и 250 µM

от всяка от четирите деоксинуклеозидтрифосфат. Инкубацията обикновено завършва след 30 минути чрез фенолна или хлороформена екстракция и утаяване с етанол.

Полинуклеозидите съответстващи на или комплементарни на части от описаните последователности могат да се използват като хибридазиционни проби, за да се идентифицират и/или да се изолират съответните последователности на зародишни гени. Такива полинуклеотиди могат да се използват като хибридизационни проби за отсяване на сДНК и геномни банки за изолиране на сДНК-и и гени кодиращи полипептиди, които са структурно и/или еволюционно свързани със сиалилтрансферазната последователност съгласно изобретението. Алтернативно, такива полинуклеотиди могат да послужат като праймери за амплификация на генните последователности от зародишната линия или родствени последователности посредством полимеразна верижна реакция (PCR).

Хибридизационните проби използвани за идентифициране на допълнителни сДНК видове сиалилтрансфераза са описани на база нуклеотида и очакваните аминокиселинни последователности са показани на фиг. 1 и 2. Хибридизационните проби, които обичайно са маркирани чрез включване на радиоизотопи, могат да се състоят от един или повече обединения на изродени олигонуклеотиди, които кодират изцяло или част от консервативния участък съответстващ на 55 сегментни остатъка простиращи се от аминокиселинния остатък 134 до аминокиселинния остатък 189 у $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансфераза от свиня (фиг.1). В частност, хептапептидният мотив -Asp-Val-Gly-Ser-Lys-Thr-Thr- е високо

консервативен и хибридизационните проби съдържащи изродените олигонуклеотиди кодиращи този мотив, или варианти на този мотив, където една или две аминокиселини се модифицират така, че да останат най-малко около 4 или 5 аминокиселини от хептапептида. Проби от изродени олигонуклеотиди кодиращи варианти на хептапептидния мотив посредством единично или двойно аминокиселинно заменяне, също са полезни за отсяване на родствени сДНК видове сиалилтрансфераза. В допълнение към изродените олигонуклеотиди, като проби могат да се използват фрагменти от клонирани полинуклеотиди като тези посочени на фиг. 1 и 2. Предпочита се такава проба да обхваща хептапептидния мотив и ако се желае и консервативните 55 аминокиселинни сегментни остатъка описани по-горе.

Геномни или сДНК клонове кодиращи сиалилтрансфераза могат да се изолират от клонове банка като се използват хибридизационни проби създадени на база сиалилтрансферазна нуклеотидна последователност като тази посочена на фиг. 1 и 2. Където се желае сДНК клон, се предпочита клонът банка съдържащ сДНК получена от клетка експресираща сиалилтрансфераза(и). Алтернативно, синтетични полинуклеотидни последователности съответстващи на всички или на част от последователностите показани на фиг. 1 и 2 могат да се конструират посредством химически синтези на олигонуклеотиди. Освен това могат да се използват полимеразни верижни реакции (PCR) като се използват праймери базирани на данните за последователността описани на фиг. 1 и 2, за да се амплифицират ДНК фрагменти от геномна ДНК, мРНК обединявания или от сДНК клон от

банка.САЩ патент 4 683 195 и 4 683 202 описва PCR метода. В допълнение, могат да се използват PCR методите използващи един праймер който се базира на данните за последователността описани на фиг. 1 и 2 и втори праймер, който не се базира на данните за тази последователност. Например, може да се използва втори праймер, който е хомоложен на или комплементарен на полиаденилирания сегмент.

За специалистите от областта е очевидно, че съгласно изобретението в полинуклеотидите могат да се включат нуклеотидните замени, делеция и включване. Обаче тези нуклеотидни замени, делеция и включване не трябва съществено да нарушават способността на полинуклеотида да хибридизира до една от полинуклеотидните последователности показани на фиг. 1 и 2 при условията на хибридизация, които са достатъчно строги, за да се достигне до специфична хибридизация.

Нуклеотидната и аминокиселинна последователности показани на фиг. 1 и 2 позволяват на специалистите да произвеждат полипептиди съответстващи изцяло или отчасти на кодираните полипептидни последователности. Такива полипептиди могат да се продуцират в прокариотни или еукариотни клетки гостоприемници чрез експресия на полинуклеотиди кодиращи пълната дължина на салилтрансферазата(те) или фрагменти или техни аналози. Алтернативно, такива полипептиди могат да се синтезират посредством химически методи или да се продуцират посредством *in vivo* транслационни системи като се използва полинуклеотидна матрица за директна транслация. Методите за експресия на хетероложни протеини в рекомбинантни гостоприемници,

химична синтеза на полипептида и *in vivo* транслацията са добре известни на специалистите в областта и са описани по-подробно от Maniatis и сътр. , *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N.Y. и Berger and Kimmel, *Methods in Enzymology*, V. 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques* (1987), Academic Press, Inc., San Diego, CA.

От специалистите могат да се получат фрагменти на сиалилтрансфераза. Предпочитани аминокислотни- и карбокси-крайща на фрагменти или аналози се срещат близо до границите на структурни и/или функционални домени, например, близо до ензимноактивно място. Фрагменти съдържащи по същество един или повече функционални домени могат да се сливат с хетероложни полипептидни последователности, като в резултат се получава слят протеин показващ функционални свойства, като ензимна активност, придадена му от фрагмента. Алтернативно, полипептиди от делеция, където един или повече функционални домени са били изпуснати, показват загуба на свойството нормално придавано му от липсващия фрагмент.

Бакуловирусната еукариотна генна експресия е едно от най-ефикасните средства за създаване на големи количества функционално активен протеин от клонирани гени (Summers, M. и Lucov, V. (1988) *Bio/Technology* 6: 47, който е вмъкнат тук за сравнение). Сиалилтрансферазните полипептиди съгласно изобретението могат да се произведат от клонирани полинуклеотиди чрез експресия в бакуловирусна експресионна система (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

Типична сиалилтрансфераза и нейният рекомбинантен експресионен продукт се получава съгласно следния

протокол:

1. Сиалилтрансфераза от свински черен дроб се пречиства до видима хомогенност.

2. Определя се N-крайната аминокиселинна последователност на сиалилтрансферазата от свиня.

3. Химически се синтезират олигонуклеотидни проби отговарящи на 18 аминокиселини близо до NH_2 крайната последователност.

4. Конструират се cДНК банки в $\lambda\text{gt}10$, като се използва а) произволно иницирана poly A^+ обогатена mРНК от свинска подчелюстна жлеза, б) oligo dT иницирана poly A^+ обогатена mРНК от дроб на плъх и в) oligo dT poly A^+ обогатено mРНК от мозък на плъх.

5. Използват се обединени радиобелязани синтетични деоксиолигонуклеотиди комплементарни на кодоните за аминокиселинните последователности на сиалилтрансфераза, описани по-долу, като:

а) 5' ACC CTG AAG CTG CGC ACC CTG CTG GTG
CTG TTC ATC TTC CTG ACC TCC TTC TT 3'

б) 5' GAC GTC GGG AGC AAG ACC ACC 3'

6. Произволно иницирана банка от свинска подчелюстна жлеза се отсява като се използват химически синтезираните дълги и къси маркирани проби олигонуклеотид с помощта на полинуклеотидкиназа и ^{32}p -АТР. Двойно положителните плаки се пречистват и секвенират чрез вмъкване.

7. Използва се едно ^{32}p маркирано вмъкване за повторно смилане на oligo dT иницирани банки от свинска подчелюстна жлеза.

8. Пълната рамка на разчитане за свинска сиалил-трансфераза се получава от два препокриващи се клона сДНК от черен дроб и мозък на плъх съдържа консервативната област на хомоложност както е определена чрез анализ на ДНК последователността на получения клон.

9. сДНК с пълна дължина кодираща кодираща свинска сиалилтрансфераза се конструира от два препокриващи се клона в плазмиди и се секвенират. Трябва да се оцени, че описанието на ДНК последователностите на фиг. 1 и 2 позволява да се приготвят проби от консервативната област на хомоложност на сиалилтрансферазната сДНК, като с това значително се опростява и увеличава ефективността на приготвяне на проби сДНК или геномни банки от тези или други видове както и други тъкани от тези или други видове, при което има възможност да се мине без пречистване, секвениране и приготвяне на пробни набори за сиалилтрансфераза.

10. Пълната дължина на сДНК кодираща сиалил-трансфераза от свиня и плъх след това се зашива върху експресионен преносител, който се използва за трансформиране на подходяща клетка гостоприемник, която след това се отглежда в култура продуцираща желаната сиалилтрансфераза.

11. Биологичноактивната зряла сиалилтрансфераза произведена съгласно горните процедури може да има алтернативни форми както е показано на фиг. 4 и 5, получени в две изпълнения с 45 kDa и 48kDa молекулно тегло.

Полинуклеотидите съгласно изобретението и рекомбинантно получените сиалилтрансферазни полипептиди и фрагменти или варианти на същите със заменени

аминокиселини могат да се получат на база данните на фиг. 1,2,3,5,7 и 8 или на база данните за последователността получена от нови сиалилтрансферазни сДНК-и изолирани по методите съгласно изобретението. Продукцията на полинуклеотиди и рекомбинантно получени сиалилтрансферазни полипептиди се осъществява по известни в областта методи описани от Maniatis и сътр., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed., (1989), Cold Spring Harbor, N.Y. и Berger и Kimmel, *Methods in Enzymology*, V. 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques* (1987), Academic Press, Inc., San Diego, CA, които са включени тук за сравнение. Полинуклеотидните последователности могат да се експресират в гостоприемника след като последователността е била "операторно свързана" към (т.е. поставена на място да осигури функционирането на) експресионна контролна последователност, така че транскрипцията на полинуклеотидната последователност да настъпи при подходящи условия за транскрипция.

"Специфична хибридизация" както е дефинирана тук в описанието се отнася до формиране на хибриди между проба полинуклеотид (напр. полинуклеотид съгласно изобретението, който може да включва заменяне, изпускане и/или включване) и специфичен полинуклеотид мишена (напр. полинуклеотид с комплементарна последователност), при което пробата за предпочитане хибридизира със специфичната мишена, така че, например, може да се идентифицира единична ивица по метода Northern-блот на РНК получена от еукариотни клетки, които съдържат РНК мишена и/или единичен главен PCR продукт получен, когато пробата нуклеотид се използва като PCR праймер. В някои случаи

последователността мишена може да се намира в повече от един вид полинуклеотид мишена (напр. специфична последователност мишена може да се среща в много членове на сиалилтрансферазната генна фамилия или в алтернативно снадени РНК-и транскрибирани от същия ген). Очевидно е, че оптималните условия на хибридизация ще варират в зависимост от състава на последователността и дължината(те) на пробата(е) и мишената(те) и избрания експериментален метод от практикуващия специалист. Могат да се използват различни принципи, за да се изберат подходящи условия за хибридизация (виж, Maniatis и сътр., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed., (1989), Cold Spring Harbor, N.Y. и Berger и Kimmel, Methods in Enzymology, V. 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, CA, които са включени тук за сравнение.

"Безсмислени полинуклеотиди" са полинуклеотиди, които са 1) комплементарни на всички или на част от последователностите показани на фиг. 1 и 2, и/или последователностите получени от нови сиалилтрансферазни сДНК-и изолати по методи съгласно изобретението и 2) които специфично хибридизират с комплементарна последователност мишена. Такива комплементарни безсмислени полинуклеотиди могат да включват нуклеотидно заменяне, включване, делеция, или транспозициониране, стига да се запази специфичната хибридизация със съответната последователност мишена (напр. съответстващи на фиг. 1 и 2) като функционално свойство на полинуклеотида. Комплементарни безсмислени полинуклеотиди са разтворими безсмислени РНК или ДНК олигонуклеотиди, които могат да хибридизират

специфично с индивидуални сialiлтрансферазни mPНК видове или с много членове на сialiлтрансферазната mPНК фамилия и предотвратява транскрипцията на mPНК видове и/или транслацията на кодирания полипептид (Cling и сътр., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86: 10006-10010 1989), Broder и сътр., Ann. Int. Med. 113:604-618 (1990), Lógeau и сътр., FEBS Letters 274: 53-56 (1990), Holzenberg и сътр., WO91/11535, U.S.S.N. 07/530,165("New human CRIPTO gene"), WO91/09865, WO91/04753, WO90/13641 и EP 386563, всеки от които е включен тук за сравнение). Безсмислените полинуклеотиди следователно инхибират продукцията на кодирания полипептид(и). В това отношение безсмислените полинуклеотиди, които инхибират транскрипцията и/или транслацията на една или повече сialiлтрансферази може да промени капацитета и/или специфичността на клетката към гликозилатни полипепти.

Безсмислените полинуклеотиди могат да се получат от хетероложна експресионна касета в трансфектантна клетка или трансгенна клетка като трансгенна плурипотентна хематопоеична стеум клетка използвана за реконструиране на цялата или част от хематопоеичната клетъчна популация на индивида. Алтернативно, безсмислените полинуклеотиди могат да бъдат разтворими олигонуклеотиди, които се разпределят към външната среда, или в културалната среда *in vitro* или в циркулаторната система или интерстициална течност *in vivo*. За разтворимите безсмислени полинуклеотиди намиращи се във външната среда е показано, че получават достъп до цитоплазмата и инхибират транслацията на специфичните mPНК видове. В някои изпълнения,

безсмислени полинуклеотиди съдържат метилфосфонатни остатъци, алтернативно могат да се използват фосфоротиолати или О-метилрибонуклеотиди, а могат да се използват също и химерни олигонуклеотиди (Dagle и сътр.(1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 4751). За някои приложения безсмислените олигонуклеотиди могат да съдържат полиамид нуклеинови киселини (Nielsen и сътр., (1991) *Science* 254: 1497). За най-общите методи относно безсмислените полинуклеотиди виж *Antisense RNA and DNA*, (1988), D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Безсмислените полинуклеотиди комплементарни на една или повече последователности се използват за инхибиране транслацията на близки mРНК видове като с това да се извърши намаляване на количеството съответно кодирания полипептид. Такива безсмислени полинуклеотиди могат да осигурят терапевтична функция чрез инхибиране формирането на една или повече сиалилтрансфери in vivo.

Могат да се конструират трансгенни животни притежаващи едно или повече интегрирани копия на сиалилтрансферазни трансгени. Сиалилтрансферазните трансгени са полинуклеотиди съдържащи полинуклеотидна последователност, която кодира сиалилтрансферазен протеин или фрагмент, операторно свързан с функционален промотор и свързан с избрана маркирана последователност като G-418 резистентен ген.

Възможно е, като се използва генетична манипулация да се развие трансгенна моделна система и/или цяла клетъчна система съдържаща сиалилтрансферазен трансген за употреба, например като моделна система за скрининг

за лекарства и оценка на ефективността на лекарства. Освен това такава моделна система осигурява инструмент за определяне на неизяснената биохимия на салилтрансферазния метаболизъм, и с това се осигурява база за рационален лекарствен дизайн и експериментално изпитване.

Един подход за създаване на трансгенни животни е да се насочи мутацията към желания ген чрез хомоложна рекомбинация в ембрионална стем клетъчна линия (ES) *in vitro*, последвано от микроинжектиране на модифицирана ES клетъчна линия в гостоприемника бластоцист и след това инкубация в приемник (виж Frohman и Martin (1989) Cell 56: 145) Алтернативно, може да се използва техниката на микроинжектирането на мутирания ген или на части от него в едноклетъчен ембрион с последваща инкубация в използвания приемник. Могат да се прилагат различни начини за използване на трансгенни животни, по-специално трансгенни животни, които експресират природно срещащ се салилтрансферазен протеин или фрагменти от него. Алтернативно, по желание могат да се конструират трансгенни животни съдържащи трансгени, които кодират променен чрез мутация (напр. мутагенизиран) салилтрансферазен протеин(и), който може или не може да има ензимна активност. Методите за произвеждане на трансгенни животни са известни на специалистите.

Алтернативно, насочена по място мутагенеза и/или генна конверсия, могат да се използват, за да се мутира *in vivo* салилтрансферазен генен алел, било ендегенен или трансфектиран, така че мутираният алел кодира вариантна салилтрансфераза.

Алтернативно, може да се използва хомоложна рекомбинация, за да се вмъкне сиалилтрансферазна последователност в геном гостоприемник на специфично място, например на съответния локус на сиалилтрансферазен гостоприемник. При един тип на хомоложна рекомбинация се заменят една или повече последователности например сиалилтрансферазен алел гостоприемник (или част от него) се заменя с мутирана сиалилтрансферазна последователност (или части от нея). Освен това, към такива методи на генно заместване, може да се използва хомоложна рекомбинация, за да се насочи полинуклеотид кодиращ сиалилтрансфераза (или фрагменти от нея) към специфично място, различно от локуса на сиалилтрансферазата гостоприемник. Хомоложна рекомбинация може да се използва, за да се произведе трансгенно не-човешко животно и/или клетки, които включват в себе си мутирани сиалилтрансферазни алели. Може да се използва генно насочване, за да се разруши и инактивира един или повече сиалилтрансферазни гени. Тези така наречени трансгенати "нокаут" са описани в литературата за други гени (WO91/10741, Kuhn и сътр.(1991) Science 708: 707).

Следващите примери илюстрират най-добрия познат досега начин за практикуване на изобретението, без да го ограничават. Всички литературни цитати са вмъкнати тук за справка.

ПРИМЕР 1

Пречистване на сиалилтрансфераза от свиня
Пречистване на две форми на $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансфераза
 $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансферазата се пречиства като се използва комбинация от две процедури описани по-рано

(Sadler J.E. и сътр., J.Biol.Chem. 254, 4434-4443 [1979] и Conradt H.S. и сътр., Sialic Acids 1988 Proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic Acids (Shauer and Yamakawa, eds.) p. 104-105, Verlag Wissenschaft and Bilding, Kiel [1988]). Ензимът се пречиства из екстракт от свински черен дроб направен с Triton X-100, чрез афинитетна хроматография на три последователни колони от CDP-хексаноламин агароза. Профилът на елуиране от първия и третия етапи на пречистване е показан на фиг. 3 и 4, съответно. Фиг. 3 показва, че се наблюдават два пика сialiлтрансферазна активност в профила на елуиране от първата афинитетна колона. Тези два пика се разделят посредством обединяване на посочените фракции в обединения А и В, като тези две обединения са обогатени на две форми на $\alpha 2,3$ -О сialiлтрансфераза ,с различни молекулни тегла.

Вторият етап на афинитетно пречистване на всяко обединение има за резултат отстраняване на по-голямата част от онечистванията от $\alpha 2,6$ сialiлтрансфераза, които също се намират в свински черен дроб (Sadler, J.E. и сътр., J.Biol. Chem. 254, 4434-4443 [1979]). След третия етап на афинитетна хроматография, фракциите от колоната се анализират и за отделни фракции се установява, че са обогатени с форми $\alpha 2,3$ сialiлтрансфераза с молекулно тегло 48 kDa (Фиг.4А, фракции 4-6) или на 45 kDa (фиг. 4В, фракции 2-6). Тези два протеина се означават респективно като форма А и форма В. Специфичната активност за пиковите фракции от двете колони е 8-10 единици/mg протеин. Силната ивица (~44 kDa) видима при фракции 6 фиг.4 колона А не е $\alpha 2,3$ сialiлтрансфераза, а представлява едно от главните онечиствания в

двете обединени части А и В след предходната колона, тъй като липсва ензимна активност в крайния етап на афинитетната хроматография.

Сиалилтрансферазната активност се изпитва с лактоза и/или антифризен гликопротеин с ниско молекулярно тегло като субстрат. (Sadler, J.E. и сътр., J.Biol.Chem. 254, 4434-4443 [1979]). Ензимът от свински черен дроб се пречиства като се следват описаните методи (Sadler, J.E. и сътр., J.Biol.Chem. 254, 4434-4443 [1979] и Conradt H.S. и сътр., Sialic Acids 1988 Proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic Acids (Shauer and Yamakawa, eds.) p. 104-105, Verlag Wissenschaft and Biling, Kiel [1988]) с някои модификации. Накратко, 2 kg черен дроб се хомогенизира в буфер и мембраните се приготвят както е описано (Sadler, J.E. и сътр., J.Biol.Chem. 254, 4434-4443 [1979]). Мембраните се екстрахират три пъти с буфер Conradt H.S. и сътр., Sialic Acids 1988 Proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic Acids (Shauer and Yamakawa, eds.) p. 104-105, Verlag Wissenschaft and Biling, Kiel [1988] и екстрактът се пропуска през 1,5 l колона CDP-хексаноламинагароза (колона 1) (16 μ mol/ml). След промиване на колоната с 3L буфер В, колоната се елуира с линеен градиент 0,05 до 1,0 М КСl (2,5 l x 2,5 l) в буфер В. Фракциите съдържащи α 2,3 сиалилтрансфераза се обединяват в две обединения А и В, представляващи главната част и провлачения край на пика, съответно (виж фиг. 3). Обединените фракции се диализират спрямо буфер В и се подлагат на друг етап афинитетна хроматография на CDP-хексаноламинагароза (колони IIA и IIB). 150 ml колона се използва за обединените фракции А и 30 ml колона за обединените

фракции В. Двата препарата получени от колона I (от общо 4 kg черен дроб) се зареждат на същата колона в етап II. Елуирането на $\alpha 2,3$ сиялилтрансферазата се осъществява с градиент 0-2,0 mM CTP (750 ml, обединени фракции А, 150 ml обединени фракции В) в буфер В. Фракциите с $\alpha 2,3$ сияилтрансферазна активност се обезсоляват на G50 Sephadex, еквилибриран в буфер и активните фракции се нанасят на 1,0 ml колони с CDP-хексаноламинагароза (част III), като се елуират с градиентна стъпка от 0,1 до 1,0 mM CTP (20 стъпки, 1,0 ml всяка) в буфер В (виж фиг.2). Активните фракции се обединяват и общият добив от двете колони е 2,5 единици при специфична активност 8-10 единици/mg протеин.

Сияилтрансферазните пептиди 48kDa и 45kDa (виж фиг. 4) се разделят повторно на SDS-полиакриламиден гел (Leamml, U.K., Nature 227, 680-685 [1970]), електроелуират се на PVDF мембрана (Immobilon Transfer, Millipore) и се оцветяват с Coomassie брилянтно синьо (Sigma). Ивиците сияилтрансфераза се изрязват и свързаните пептиди се анализират за NH₂- крайна аминокиселинна последователност посредством разпадане по Edman като се използва Applied Biosystems 475A прибор за определяне последователността на аминокиселините.

Фракциите обогатени на формите 48 kDa (форма А) и 45 kDa (форма В) сияилтрансфераза, се подлагат на електрофореза върху полиакриламиден гел (PAGE) , пренасят се към PVDF мембрана и се анализират чрез секвениране на NH₂-края. Двадесет и две аминокиселинни остатъка се получават от всяка секвенция за всеки от пептидите (фиг. 5). NH₂- крайната последователност на форма А съдържа

хидрофобен интервал от аминокиселини, който съвпада с очакваното от (Sadler, J.E. и сътр., J.Biol.Chem.254, 4434-4443 [1979]) и Wescott и сътр., (J.Biol.Chem.260, 13109-13121), че по-малката форма произлиза от по-голямата форма чрез протеолитично разцепване на хидрофобен пептид. За този участък се предполага, че има значение за свойствата на детергентно и мембранно свързване уникални за форма А.

ПРИМЕР 2

сДНК сналилтрансфераза от свиня

Poly A⁺ РНК се използва като матрица за конструиране на едноверижна сДНК като се използва набор доставен от Invitrogen. сДНК служи като матрица за полимеразната верижна реакция (PCR) като се използват реактиви и протоколи доставени от Perkin Elmer Cetus. Използваните специфични условия са 92°C за 1 минута, 50°C за 2 минути и 72°C за 2 минути за стадия денатуриране, хибридизация и полимеризация. PCR реакциите започват с 30 bp, олигонуклеотидите съответстващи на последователности граничеши с 120 bp, делеция при 3' края на ST1. Продуктите от реакцията на амплификация се разделят върху 2% агарозен гел. Двете специфични ивици различаващи се при 120 bp, съответстващи на ST1 и ST2 клонове се идентифицират чрез оцветяване с брометан. Ивиците се елуират от гела (Qiaex набор, Qiagen), субклонират се до TA вектор (Invitrogen) и се секвенират както по-горе за недвусмислено идентифициране.

Изолиране на РНК и конструиране на сДНК банка

Пресни подчелюстни слюнчени жлези от свиня (<30 минути след смърта) се замразяват и транспортират в сух

лед- EtOH. Общото количество РНК се изолира като се следва процедурата на Chomczynski и Sacchi (Ansl. Biochem. 162, 156-159 [1987]). Poly A⁺ РНК се пречиства посредством oligo dT-целулозна хроматография (Pharmacia). Двойноверижна cДНК се синтезира посредством обратна транскрипция на poly A⁺ РНК като се използват произволни хексамери като праймери с набор Pharmacia за синтез на cДНК и и методиката препоръчана от доставчика. EcoRI адаптери се лигират с EcoRI смлени Igt10 и се опаковат in vitro (ProMega). cДНК банката се нанася на плака за отсяване чрез инфектиране с E.coli C600 с опакованата смес.

Изолиране и секвениране на cДНК клоновете

Всички процедури се извършват съгласно Maniatis и сътр. (в Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. [1982]) освен ако не е посочено друго. 53 bp олигонуклеотидна проба (5'ACCCTGAAGCTGCGCACCTGCTGGTGCTGTTCATCTTCCTGACCTCCTTCTT3'), отговаряща на 18 аминокиселини близо до NH₂-крайната последователност на пречистения 48 kDa сиалилтрансферазен пептид (виж фиг.5), се бележи в края с ³²P до специфична активност 10⁷ cpm/pmol. 500,00 плаки се отсяват чрез нуклеотидна хибридизация в следния предхибризационен/хибризационен разтвор: 5xSSC, 50 mM NaH₂PO₄ pH 6,7, 20% формамид, 5x разтвор на Denhardtq 0,1% mg/ml ДНК от сперма на съомга при 37°C (Wood, W. , Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, p. 443). Нитроцелулозните филтри (Schleicher и Schuel 0,45 m пори) се промиват в 0,2xSSC, 0,1% SDS при 420 за 40 минути. Получава се един силно хибридизиран клон

λ ST1, който съдържа отворена рамка на разчитане, която кодира аминокиселинна последователност съответстваща на 48 kDa и 45kDa пречистени салилтрансферазни пептиди. Втори клон, λ ST2, се изолира чрез нуклеотидна хибридизация като се използва проба от 3' края на λ ST1 като рестрикционен фрагмент. Тази проба, 0,5 kb Pvu II-EcoRI рестрикционен фрагмент се маркира като се използва набор за произволно инициране и [α - ^{32} P]dCTP (Amersham).

EcoRI рестрикционните фрагменти съответстващи на сДНК включвания на фагови ДНК-и се субклонират в pUC вектори (Pharmacia). Субклоновете се секвенират като се използва T7 набор от Pharmacia. Данните за последователността се анализират на компютър като се използва DNASTAR (DNASTAR Inc., WI, USA).

Изпробвани са няколко стратегии на клониране с оглед да се клонира сДНК за α 2,3 салилтрансфераза на база информацията за аминокиселинна последователност представена на фиг. 5. При първия подход се приготвят праймери за полимеразна верижна реакция, за да се извърши изследване обхващащо NH₂ крайните последователности на видовете 48 и 45 kDa протеин, приемайки, че те са съседни в интактния ензим. В ретроспекция този подход е неуспешен поради неточност в аминокиселинната последователност получена за 45 kDa видовете (виж Фиг.5 и 6). Други неуспешни опити да се получи положителен клон са свързани с използване на къси (16-20 bp) изродени олигозахаридни като проби за отсяване на сДНК от свинска подчелюстна слюнчена жлеза. Успешен е подходът при използване на неизроден 53 bp олигонуклеотид кон-

струиран от 17 аминокиселини участък на NH₂- края на форма А. 53 bp пробата се използва за отсяване на 500,000 плаки на Igt10 от свинска подчелюстна слюнчена жлеза cДНК банка. Получава се единичен 1,6 kb клон, IST1, който има консенсус ATG стартов кодон (Kozak, M., Cell 49, 283-292 [1986] и Kozak, M., Nuc.AcidsRes. 12, 857-872 [1984]), отворена рамка на разчитане кодираща NH₂-крайните аминокиселинни последователности на двете форми А и В на α 2,3 сиалилтрансфераза и без стоп кодон в рамката. Фактът, че NH₂-крайните аминокиселинни последователности от двете форми на α 2,3 сиалилтрансфераза се намират в транслираната отворена рамка на разчитане на λ ST1 означава, че λ ST1 клонът кодира част от α 2,3 сиалилтрансферазата.

3' рестрикционният фрагмент на λ ST1 се използва като проба за получаване на втори препокриващ клон, λ ST2, от същата банка (фиг.6). λ ST2 допълва отворената рамка на разчитане произлизаща от λ ST1. Заедно, тези две cДНК-и кодират проста отворена рамка на разчитане (909-1029, виж по-долу), 600 bp 5' нетранслиран участък и 1000bp 3' нетраслиран участък. Нуклеотидната последователност, както и транслираната аминокиселинна последователност за 1029bp отворената рамка на разчитане е показана на фиг. 7. Има добро съгласуване между очакваната аминокиселинна последователност в транслираната отворена рамка на разчитане на λ ST1 и аминокиселинната последователност получена чрез директен анализ на пречистените протеини.

Последователностите на препокриващите се участъци на λ ST1 и λ ST2 са идентични по целите им дължини с изключение на 120 bp празнина в λ ST1. Уникалната

отворена рамка на разчитане продължава от двете страни на това прекъсване в λ ST1 (фиг. 6). За да се определи дали една-та или и двете от двете сДНК форми представляват истинската mРНК, се извършва PCR анализ като се използват праймери граничещи с тази празнина върху сДНК матрица получена чрез обратна транскрипция на poly A⁺ РНК от свински слюнчени жлези. Разширените PCR фрагменти съответстващи на λ ST1 и λ ST2 се откриват при този подход (данните не са показани). PCR продуктите се субклонират и секвенират, за да се потвърди тяхната идентичност, като е намерено, че и двата са идентични на съответните участъци в λ ST1 и λ ST2. По такъв начин резултатите и от директното сДНК клониране и PCR амплификацията навеждат на мисълта, че има две mРНК спецификации за α 2,3 сиалилтрансфераза в свинска подчелюстна слюнчена жлеза, които се различават по присъствието или отсъствието на 120 bp включване в отворената рамка на разчитане.

Очакваната галемина на сиалилтрансферазия (1029bp отворена рамка на разчитане) протеин е 39 kDa, с 4 възможни N-свързани гликозилирани места (виж фиг. 7) (Bouse, E., Biochem.J. 209, 331-336 [1983]). Използването на 3 от тези места води до получаване на протеин с очакван размер от приблизително 48 kDa наблюдаван за форма А на пречистена сиалилтрансфераза. Макар че крайната аминокислотна последователност съдържа два ATG кодона в непосредствена близост, само първият е в строг консенсус с мястото на започване на трансляцията (Uozak, M. Cell 49, 283-292 [1986] и Koozak, M., Nuc.Acids Res. 12, 857-872 [1984]). Kyte-Doolittle хидропатичен анализ (J. Mol. Biol. 157, 105-132

[1982]) показва един потенциално мембранно свързан участък, който се състои от 16 хидрофобни остатъка, разположени на 11 остатъка от аминок-края (фиг.7). Тази структурна характеристика подсказва, че $\alpha 2,3$ сиалилтрансфераза като други гликозилтрансферази, които са изследвани има тип II мембранна ориентация и че този единичен хидрофобен участък може да служи като неразцепващ се аминок-краен сигнално контактен домен (Paulsoon, J.C. and Colley, K.J., J. Biol. Chem. 264, 17615-17618 [1989]).

Отворената рамка на разчитане кодирана чрез λ ST1 и λ ST2 съдържа цялостната NH_2 -крайна аминокиселинна последователност получена и от форма А и от форма В на $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансфераза. Както е показано на фиг. 6, в NH_2 крайната секвенция на форма А са намерени 8 аминокиселини от предполагаемото стартово място на транслацията на отворената рамка на разчитане, а съответната NH_2 -крайна последователност на форма В е намерена 27 аминокиселинни остатъка по-нататък към COOH -края на протеина. Тъй като форма В на $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазата е изцяло каталитично активна (Rearick, J.I. и сътр., J.Bil. Chem.254, 4444-4451 [1979]), протеиновата последователност между предполагаемия инициатор метионин на ензима с пълна дължина и аминок-края на форма В, вероятно не се изисква за ензимна активност. Така участъкът на протеолитична чувствителност на $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансфераза, който е между сигнално контактният домен и каталитичният домен изглежда че е стем участък, както е дефиниран за по-рано изследваните гликозилтрансферази (Weinstein, J. и сътр., J.Biol.Chem. 262, 17735-17743 [1987] и Paulson, J.C. и Coolley, K.J., J. Biol.Chem.

264, 17615-17618 [1989]).

Двадесет mg от общата РНК от тъкан на свиня или плъх се подлага на електрофореза на 1,0 % агарозен гел съдържащ 2,2 М формалдехид (26) и се прехвърля на нитроцелулозни филтри (Schleicher и Schuell) както е описано. Нитроцелулозните филтри се хибридизират с ³²P-маркирани сДНК проби и се промиват както е описано по-рано.

ПРИМЕР 3

Експресия на разтворима сиалилтрансфераза от свиня

Секретеруем химерен протеин се приготвя между предполагаемия каталитичен домен на α 2,3-О сиалилтрансфераза и инсулинова сигнална последователност чрез сливане на С-крайния 890bp на клон λ ST2 с N-крайната част на вектора pGIR-199 (Hsueh и сътр., J.Biol.Chem. 261, 4940-4947 [1986]) при Sac I място съдържащ в рамката на разчитане и двата вектора. Химерната sp-ST, се смила с рестрикционните ензими Nhe I и Sma I, изолира се фрагментът 1,0 kb и се субклонира в pSVL (Pharmacia) и смила с Nba I и Sma I като слепва местата съдържащи се в полилинкера. Получената конструкция се нарича pSVL-spST и се използва като вектор за преходна експресия на разтворима форма на α 2,3-О сиалилтрансфераза в COS-1 клетки. Суперспиралната ДНК, pSVL sp-ST, се трансфектира в COS-1 клетки като се използва липофектин съгласно процедурата препоръчана от доставчика. (60 mm културални блюда съдържащи 50% слети клетки се трансфектират с 5 μ g ДНК, 20 ml липофектин). След четиридесет и осем часа трансфекция

COS-1 клетъчната среда се събира и концентрира 15 кратно на Centricon 30 филтри (Amicon) и се анализира за $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансферазна активност. $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансферазната активност се определя като се използва антифризен глико-протеинов акцептор както е описано по-рано (Sadler и сътр., J.Bioool.Chem 254,4434-4443 [1979]).

След четиридесет и осем часа трансфекция с pSVL-spST COS-1 клетките (60 mm културални блюда) се промиват със met несъдържаща среда (DMEM, 5% серум от телешки зародиш) (Gibco) и се култивира в същата среда в продължение на 1 час. Клетките се маркират пулсационно с 150 mCi/150 pmol ^{35} S-met Express маркер, (NEN) в 1,5 ml met несъдържаща среда в продължение на 2 часа. Тези клетки след това се промиват с PBS и престояват в продължение на 5 часа в среда без ^{35} S-met белег. Средата съдържаща секретирани протеини, след това се събира, концентрира се 15 кратно и се подлага на SDS-PAGE и анализира посредством флуорография.

Както е посочено по-горе, форма В на $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансфераза е ензимноактивен протеолитично отцепен продукт от цялата дължина, мембранно-свързан ензим. Поради това може да се очаква, че разтворим, химерен протеин трябва да съдържа $\alpha 2,3$ -О сиалилтрансферазна активност, ако той включва цялата последователност на В формата. За да се създаде такъв разтворим протеин, рестикционната част обратна на NH_2 -края на пептидната последователност се избира като място за сливане на λ ST2 cДНК с вектора кодиращ сигналната инсулинова последователност pGIR-199.

Както е илюстрирано на фиг. 9а, тази

конструкция кодира слетия протеин, тук наречен сигнален пептид - ST (sp-ST), който се състои от инсулинова сигнална последователност последвана от 9 аминокиселини кодирани посредством pGIR линкер и целия предполагаем каталитичен домен на α 2,3-О сиалилтрансфераза. Очаква се sp-ST конструкцията да насочи синтезата към 38 kDa, секретирuem протеин, когато се трансфектира в бозайникови клетки гостоприемник. Подобна стратегия за продукция на разтворими форми на гликозилтрансферази е успешно използвана [Paulson, J.C. и Colley, K.J., J.Biol.Chem. 264, 17615-17618 [1989], Larsen, R.D. и сътр., Proc.Natl.Acad.Sci.USA87, 6674-6678 [1990]].

sp-ST конструкцията се премества в pSVL експресионен вектор и се трансфектира преходно в COS-1 клетки. След 48 часа трансфектираните клетки се инкубират в продължение на 2 часа в среда съдържаща Trans³⁵S-маркер и след това престояват 5 часа в среда без маркер. Тази среда се събира, концентрира се 15кратно и се анализира посредством SDS-PAGE/флуорография. Фиг.9b показва, че средата съдържаща главно 38kDa видове, очаквания размер на sp-ST протеина. При паралелни трансфектирани култури, средата се събира след 48 часа трансфекция, концентрира се и се изследва за α 2,3-О сиалилтрансферазна активност. Както е илюстрирано на фиг. 9c, средата от клетки трансфектирани с sp-ST съдържа милиединици/ml сиалилтрансфераза, докато средата от контролните трансфектирани клетки нямат никаква съществена активност.

ПРИМЕР 4

Пречистване и секвениране на сиалилтрансфераза от

черен дроб на плъх

Подобно на други гликозилтрансферази, които са налични в мембранни протеини на ендоплазмения ретикулум и на Golgi апарата, сиазилтрансферазите са слабо разпространени протеини и трудни за пречистване, което обяснява защо само два члена на тази фамилия са клонирани. Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3 сиазилтрансфераза (" α 2,3N") е първата пречистена 800,000 кратно от черен дроб на плъх в 1982 от Weinstein и сътр., получена от около 10 μ g/ng тъкан Weinstein и сътр. J.Biol.Chem. 257, 13835-13844 [1982] и Weinstein и сътр. J.Biol.Chem. 13845-13853 [1982]). Макар че са направени няколко опита за получаване на аминокиселинна последователност информационна или произвеждаща антитяло срещу ензима като се използват общоприети методи, те пропадат, поради малките количества разреден протеин, който би могъл да се получи. Като алтернатива маспектрометрията има засилена роля за структурното изясняване на биологично важни макромолекули. Развитието на нови йонизационни методи и инструменти разширяват достъпната граница на масата и чувствителността на откриване. Високо разрешителна тандемна маспектрометрия сега е установена като мощна техника за секвениране на протеини (Methews, W.R. и сътр., J.Biol.Chem. 262, 7537-7545 [1987]), както и за определяне на пост-транслационни и химически модификации (Dever, T.E. и сътр., J.Biol.Chem. 264, 20518-20525 [1989], Settineri, C.A. и сътр., Biomed. Environ. Mass Spectrom. 19, 665-676 [1990] и DeWolf Jr., W.E. и сътр. Biochem. 27, 90993-9101 [1988]). Поради това маспектрометрията се използва за установяване на аминокиселинната последователност на сиа-

лилтрансфераза.

Редукция и карбоксиметилиране

Приблизително 13 μg Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-сиалил-трансфераза (α 2,3-N) се съхранява в 350 ml 30 mM натриев какодилат (pH=6,5), 100mM натриев хлорид, 0,1% Triton CF-54 и 50% глицерол. ТрисHCl (pH=8,0), гуанидинHCl и дитиотреитол се прибавят към крайни концентрации 0,2 M и 7 mM, съответно. Редукцията се провежда при 60°C, под аргон, в продължение на 1,5 часа. Към сместа се прибавя натриев йодоацетат (1,32 mg) в 2,5 ml 0,2 M ТрисHCl буфер. Алкилирането се провежда при стайна температура, под аргон, на тъмно, в продължение на 1,5 часа.

Диализа. Редуцираната и карбоксиметилирана α 2,3N се диализира срещу 4 литра 50 mM буфер N-етилморфолинацетат (pH=8,1) като се използва Bathesda Research Labs ("BRL") микродиализна система с BRL диализна мембрана с молекулно тегло до 12-14 kDa. Когато завърши диализата, се прибавя 10% SDS към диализирания продукт, получен с крайна SDS концентрация приблизително 0,1%. Съдържанието на диализирания продукт се събира и суши като се използва SpeedVac Concentrator (Savant). За да се отстрани SDS, се провежда утаяване по Konigsberg (Konigsberg, W.H., Henderson, L., Methods in Enzymology 91, 254-259 [1993]).

Смилане с трипсин. Утаената α 2,3N се разтваря в буфер за смилане (100 mM Трис HCl 2M карбамид, 1 mM CaCl₂, pH=8,0), като се получава протеин с концентрация приблизително 2 mg/ml. α 2,3N се смилва с 10% трипсин (т/т) (Boehringer-Mannheim, степен на секвенция, разтворен в 1 mM HCl) при 37°C. След 7 часа смилане към сместа се прибавя

Друга аликвотна част трипсин до получаване на крайна трипсинова концентрация приблизително 13%. Смилането завършва след 18 часа. Полученият смлян с трипсин продукт се отделя посредством HPLC с обърната фаза (ABI C18 колона, 1,0 x 100 mm) като се използва ABI 140A подаваща разтворител система. Разтворител А е 0,1% TFA във вода. Разтворител В е 0,08%TFA в 70% ацетонитрил/30% вода. Системата работи при скорост на изтичане 50 ml/минута. Десет минути след инжектирането, процентното съдържание на разтворител В се увеличава от 0% до 50% за 90 минути, след това до 100% за 30 минути. Пептидите се откриват като се използва ABI 783A абсорбционен детектор, работещ при 215 nm. Някои от фракциите се естерифицират като се използва смес от HCl/н-хексанол.

Масспектрометрия. Експерименти с течна вторична йонна масспектрометрия (LSIMS) се провеждат като се използва Kratos MS50S двойно фокусиран масспектрометър, снабден с LSIMS източник и високо магнитно поле. Приблизително една пета от всяка събрана фракция се зарежда за LSIMS анализи. Като течна матрица се използва един микролитър смес от глицерол-тиоглицерол 1:1 подкислен с 1% TFA. Образците се събират повторно от крайната проба. Най-разпространените молекулни йони се избират за анализ посредством колизионна индуцирана дисоциация (CID). Тези експерименти се осъществяват на Kratos Concept IIN четири-секторен масспектрометър, снабден с електрооптична много-канална система детектор, който мож да запише едновременно 4%секвентни сегменти в масовата бласт.Колизионната енергия започва при 4 keV, колизионният газ е хелий и неговото

налягане се наглася за намаляване изобилието на избрания йон предшественик до 30% от неговата начална стойност. Остатъците от всички проби се събират и се прибавя 1 ml от гореспоменатата матрица. Данните от високо енергетичната CID се интерпретират без помощта на компютърен анализ.

Тандемната масспектрометрия е мощен метод за протеиново секвениране, с предимства пред общоприетата техника на Edman. По този метод е възможно секвениране дори на еквимоларни смеси. За масспектрометричен анализ първите няколко пептидни фракции от HPLC се естерифицират, за да се увеличи тяхната хидрофобност, като по този начин се подобрява тяхното резултатно разпръскване (Falick, A.M. и Maltby, D.A., Anal. Biochem. 182, 165- 69 [1989]). LSIMS анализът на всяка фракция показваща многобройни молекулни йони, посочва присъствието на повече от един пептид във всяка. Най-разпространените 30 молекулни йони се избират за CID анализ. В тези експерименти, ^{12}C изотопният пик на интересувания ни йон се избира в първия масспектрометър. Само фрагментите от тези видове получени от дисоциацията причинена от колизията с хелия в колизионната клетка, разположена между двата масспектрометъра, се регистрират в края на втория масспектрометър. Фрагментирането чрез анализ посредством високо енергетична колизионно индуцирана дисоциация (CID) се случва главно по продължението на пептидния скелет. Наблюдават се също многобройни скъсвания, т.е. фрагментиране на аминокиселинните вериги. Фрагментирането по продължение на пептидната верига води до получаване на йонна серия, която се различава по теглото на аминокиселинните остатъци, така

че може да се очаква съответната аминокиселинна последователност. Високоенергетичният начин на фрагментиране осигурява допълнителна информация за аминокиселинната идентичност, потвърждавайки по този начин получените последователности и позволявайки диференциацията между изобарната Leu/Ile аминокиселинна двойка (Johnson, R.S. и сътр., *Annal. Chem.* 59, 2621-2625 [1987]). Фрагментирането на странична верига може да се наблюдава главно, където има базична аминокиселина, т.е. Arg, Lys или His, в последователността (Johnson, R.S. и сътр., *Int.J.Mass Spectrom. Ion Proc.* 86, 137-154 [1988]). Най-общо, изгодно протониране на базични аминокиселинни остатъци при или близо до N-края води до получаване на предпочитано задържане на товар в този край на молекулата. Пептиди съдържащи базични аминокиселини при или близо до C-края ще показват главно C-крайни фрагменти. Така трипсинът има предимство за начално смилане. Интерпретиране на данните от високо енергетичната CID накрая дават 14 последователности (виж таблица 2 и фиг. 9).

Анализът на CID спектъра показва, че по време на смилането с трипсин настъпват някои странични реакции. Два трипсинови автолизни продукта са идентифицирани при m/z 659,3 и 1153,6 (фиг. 9). Поради дългото време на инкубация и липсата на собствен акцептор, някои трипсинови пептиди се карбамилират при техните N-краища. Тъй като такива странични реакции биха направили невъзможно разграждането по Edman, N-крайните модификации могат дори да бъдат полезни при секвениране с помощта на маспектрометрия. Фактически, CID анализът на тези

модифицирани пептиди е полезен за потвърждаване на някои от горепосочените последователности, наведнъж осигуряващ начини за диференциране между N-крайния левцин или изолевцин (фиг. 10).

ПРИМЕР 5

Сиалилтрансфераза от черен дроб на плъх
PCR развиване на специфична сДНК проба.

Като се имат предвид аминокиселинните последователности на единадесет от четиринадесетте пептиди получени от $\alpha 2,3N$, са синтезирани двадесет и два олигонуклеотидни изродени сбора от смислени и безсмислени вериги (Genosys). Първоначалните PCR експерименти се основават на наблюдението, че пептид 11 и пептид 1 са хомоложни на участъка, разположен близо до центъра на по-рано клонираната сиалилтрансфераза, $Gal\beta 1,4GlcNAc\ \alpha 2,6$ -сиалилтрансфераза (Weinstein, J. и сътр., J.Biol.Chem. 257, 13835-13844 [1982]) и $\alpha 2,3$ -О описана по-горе (фиг. 11). Осъществяват се две групи PCR експерименти като се използва или смислен праймер за пептид 11 или безсмислен праймер за пептид 1 сдвоени с олигонуклеотидни праймери с другите пептиди и първата верига сДНК синтезирана от черен дроб на плъх цялостна РНК като матрица. Започвайки с етапа на стапяне на матрицата (5 минути при $94^{\circ}C$), развиването се провежда като се използва GeneAmpTM ДНК набор реагент за развиване с AmpliTagTM ДНК полимераза (Perkin Elmer Cetus), посредством 35 пъти повтаряне на цикъла, 1 минута при $94^{\circ}C$, 1 минута при $37^{\circ}C$ и 2 минути при $72^{\circ}C$ и завършва с етап на крайно продължаване (15 минути при $72^{\circ}C$). Различни сДНК фрагменти

се пораждат от тези PCR реакции. Допускайки, че пептид 11 и 1 представлява непрекъснат интервал от аминокиселини, допълнителна серия PCR експерименти се провеждат като се използва стратегията на гнездов праймер (Mullis, K.B. и Faloona, F., *Methods Enzymol.* 155, 335-350 [1987]), за да се идентифицират специфични сДНК фрагменти. Като се използва този подход се идентифицира специфичен сДНК фрагмент, 11смислен-14безсмислен (11s-14as). 11s-14as сДНК фрагментът се субклонира в Bluescript плазмид (Stratagene) и се секвенира като се използват универсални праймери (Stratagene) и 2,0 набор Sequenase Version (USB).

Клониране на салилтрансфераза

сДНК банка се конструира от poly (A)⁺ РНК от черен дроб на плъх като се използва сДНК синтезен набор от Pharmacia (Gubler, U. и Hoffman, B.J. *Gene* 25, 263-269 [1983]). Олиго (dT) иницираната сДНК се синтезира и лигира към EcoRI-NotI линкери. След това сДНК-ите се лигира в EcoRI слепена Igt10 ДНК (Promega). След опаковане *in vitro* с ДНК пакетиращ екстракт (Stratagene), с фагите се покрива в блюда гостоприемника *E.coli* C600 hfl-(Promega). Отсяват се приблизително един милион плаки с 11s-14as сДНК проба (Gubler, U. и Hoffman, B.J. *Gene* 25, 263-269 [1983]). Два положителни фага (18-1 и 9-1) се пречистват и субклонират в Bluescript плазмиден вектор (Stratagene) за секвениране.

Изолиране на сДНК клонове

За скриниране на пептидините секвенции за хомоложност с известни протеини се използва база данни Dayhoff Protein. Това търсене осигурява първото доказателство за хомоложност между α 2,3-N и други клонирани

сиалилтрансферази. От този анализ е намерено, че пептидът 11 (таблица 2) е хомоложен на наличната последователност на β -галактозид α 2,6-сиалилтрансферази както от плъх, така и от човек (тези два ензима са 88% консервативни, Gu, T.J. и сътр., FEBS 275, 83-86 [1990] и Lance, P. и сътр., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 225-232 [1989]). Когато в този анализ се включи и последователността α 2,3-О от свиня, друг пептид, пептид 1 (таблица 2) е хомоложен на последователността в двете клонирани сиалилтрансферази. Сравняването на тези пептиди с наличните секвенции в по-рано клонираните сиалилтрансферази показва, че тези два пептида притежават непрекъсната верига аминокиселини, които се късат при аргининовия остатък по време на трипсиновото смилане (фиг. 11).

ТАБЛИЦА 2

Аминокиселинна последователност на пептиди
получени от Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-сиалилтрансфераза

Пептид	Аминокиселинна последователност	Място на остатъка в Gal α 2,3-ST (Фиг.4)
1	<u>LeuAsnSerAlaProValLys</u>	<u>186-192</u>
2	MetAlaAlalleLys	340-344
3	GluProProGluIleArg	264-269
4	GlyLysAspAsnLeuIleLys	130-136
5	LeuProAlaGluLeuAlaThrLys	69-76
6	AlalleLeuSerValThrLys	137-143
7	IleLeuAsnProTyr	270-274
8	LeuThrProAlaLeuAspSerLeuHisCysArg	147-157
9	ValSerAlaSerAspGlyPheTrpLys	247-255
10	ValIleThrAspLeuSerSerGlyIle	366-374
11	<u>IleAspAspTyrAspIleValIleArg</u>	<u>177-185</u>
12	GluPheValProProPheGlyIleLys	121-129
13	LeuGlyPheLeuLeuLys	59-64
14	AspSerLeuPheValLeuAlaGlyPheLys	222-231

Подчертаните последователности показват хомоложност с други известни сиалилтрансферазни ензими (25,26)

Аминокиселината в курсив е единствената разлика от аминокиселинната последователност очаквана от нуклеотидната последователност на Gal α 2,3-ST cДНК.

Знанието, че пептид 11 и пептид 1 показват хомология спрямо последователността по-рано идентифицирана като консервативен участък на хомоложност

в центъра на две други клонирани сиаилтрансфери е основата на стратегията за клониране съгласно изобретението (фиг. 11). Допуска се, че пептид 11 и пептид 1 трябва да бъдат близо до центъра на протеина, по такъв начин PCR експериментите са предназначени да произвеждат дълга сДНК проба. На база аминокиселинните последователности на 14 сиаилтрансферазни пептиди, изродените олигонуклеотидни праймери както смислени така и безсмислени се синтезират за употреба в PCR експериментите. В тези експерименти, смисленият праймер 11 и безсмисленият 1 се сдвояват с други праймери в опит да се развият дълги сДНК фрагменти на $\alpha 2,3-N$. Някои сДНК фрагменти се амплифицират при тези експерименти. Допускайки, че пептид 11 и пептид 1 представляват непрекъснатата верига аминокиселини, праймер 11 и праймер 1 след това се използват в стратегията на гнездовия праймер (Millis, K.B. и Faloona, F., Methods Enzymol. 155, 335-350 [1987]), за да се идентифицират специфични сДНК фрагменти. Фрагментът се амплифицира като се използват смислен праймер 11 и безсмислен 14 са близо до същото място както амплифицираният фрагмент като се използва смислен праймер 1 и безсмислен праймер 14, което показва, че полученият фрагмент е в резултат на специфична осъществена хибридизация посредством праймери и не е артефакт.

Клонирането и характеризирането на 11 смислен-14 безсмислен фрагмент показва, че пептид 11 и 1 наистина са непрекъснати. Сравнението на последователността на сДНК фрагмента с двете клонирани сиаилтрансфери (Weinstein, J. и сътр., J. Biol. Chem. 262, 17735-17743 [1987]),

показва, че хомоложността произтича от пептид 1 и продължава с осемнадесет аминокиселини. Поради хомоложността вероятно 11смислен-14безсмислен фрагмент се амплифицира от сиалилтрансферазна mРНК. Последователността също показва, че сДНК фрагментът не е фрагмент на Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-сиалилтрансфераза, която е изобилна в черен дроб от плъх (Weinstein, J. и сътр., J. Biol. Chem. 257, 13835-13844 [1982]).

Фрагментът 11смислен-14безсмислен се използва за отсяване на oligo dT иницираната сДНК банка от черен дроб на плъх, чиито два положителни клона са получени от 1 милион отсети плаки. Охарактеризирането на положителните клонове показва, че клон ST3N-1 съдържа 2,1 Kb включване, докато клон ST3N-2 е значително по-къс, само 1,5 Kb на дължина. Northern анализът показва, че Gal α 2,3-ST mРНК е 2,5 Kb (виж по-долу), като се предполага, че клон ST3N-1 може да съдържа цялата кодираща последователност на Gal α 2,3-ST.

Първична структура на α 2,3N сиалилтрансфераза

Анализът на секвенциите показва, че клон ST3N-1 съдържа пълната отворена рамка на разчитане на сиалилтрансферазата (фиг.2). Тя се състои от 82 bp 5'-нетранслиран участък, отворена рамка на разчитане 1122 bp по дължина, 3'-нетранслиран участък от приблизително 1 Kb и poly (A) опашка. Отворената рамка на разчитане на клон ST3N-1 кодира протеин с 374 аминокиселини с очаквано молекулно тегло от 42,033. С изключение на разлика от една аминокиселина, отворената рамка на разчитане кодира всички 14 пептидни последователности получени от маспектрометричния анализ на пречистената сиалилтрансфераза. Това

потвърждава, че сДНК на клона ST3N-1 е действително е тази на сиалилтрансферазата. Както се наблюдава за други клонирани сиалилтрансферази (Paulson, J.C. и Colley, K.J., J.Biol. Chem. 264, 17615-17618 [1989]), очаквано е α 2,3-N да има къса N-крайна цитоплазмена опашка, единствена сигнална контактна последователност приблизително от 20 остатъка и дълъг C-краен участък, който съдържа каталитичния домен на ензима.

ПРИМЕР 6

Експресия на разтворима сиалилтрансфераза от плъх

За да се произведе разтворима форма на сиалилтрансфераза за ензимно охарактеризиране, слат протеин съдържащ каталитичния домен на ензима и способна да се отцепи инсулинова сигнална последователност, се конструират в бозайников експресионен вектор pSVL (Pharmacia). Поспециално, каталитичният домен на сиалилтрансферазата се амплифицира чрез PCR като се използва 5' праймер при позиция +182 (фиг.11), в посока на трансмембрания домен и 3' праймер разположен в 3'UTR в обратна посока на мястото за полиаденилиране. PCR реакциите се провеждат както е описано по-горе при температура на осъществяване на хибридизация при 55°C. PCR продуктът се субклонира в BamHI-EcoRI сайтовете на pGIR-199 (подарък на K.Drickamer) като се получава сливане на сиалилтрансферазата в рамка с наличната инсулинова сигнална последователност в pGIR вектора (Huseh, E.C. и сътр., J.Biool.Chem. 261, 4940-4947 [1986]). Полученият слат протеин се включва в Xba I-Sma I сайтовете на експресионния вектор pSVL като се получава експресионен плазмид pBD122.

За преходна експресия в COS-1 клетки, експресионният плазмид pBD122 (20 mg) се трансфектира в COS-1 клетки върху 100 mm блюда като се използва липофектин както се препоръчва от производителя (BRL). След 48 часа клетъчната културална среда се събира и концентрира като се използва Centricon 10 микроконцентратор. Концентрираната среда се анализира за сиалилтрансферазна активност като се използват олигозахариди като акцепторни субстрати. Преминаването на сиаловата киселина към олигозахарида се регистрира като се използва йонообменна хроматография (Sadler, J.E. и сътр., J.Biol.Chem. 254, 5934-5941 [1979] и Paulson J.C. и сътр., J.Biol.Chem. 264, 10931-10934 [1989])).

За демонстрация на това, че клонът ST3N-1 трябва да кодира $\alpha 2,3$ -N сиалилтрансфераза, клонът се експресира в COS-1 клетки. Аминокиселинната последователност на клона ST3N-1 показва, че протеинът съдържа NH_2 -крайна сигнално контактна последователност, която се очаква да закрепи ензима за апарата на Golgi в клетката (Paulson, J.C. и Colley, K.J., J.Biol.Chem. 264, 17615-17618 [1989])). За улесняване на функционалния анализ на ензима, се произвежда разтворимата форма на ензима, която когато се експресира би била секретирана от клетката. Слат протеин се конструира като се използва способна да се отцепи инсулинова сигнална последователност, която да смени сигнално контактната последователност при NH_2 -края на сиалилтрансферазата. Когато експресионният плазмид pBD122 се експресира в COS-1 клетките, ензимът се секретира от клетките и показва сиалилтрансферазна активност.

Ензимните свойства на $\alpha 2,3$ -N сиалилтрансфераза

първо се характеризират с пречистен протеин (Weinstein, J. и сътр., J.Biol.Chem. 257, 13845-13853 [1982]). Намерено е, че сиалилтрансферазата използва β -галактозидни акцептори съдържащи или $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ или $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ последователности формиращи $\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ и $\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ последователности често срещани да завършват комплекса от типа N-свързани олигозахариди. Ензимът секретиран от клетките, които са трансфектирани с експресионния плазмид pBD122 е способен да използва β -галактозидни акцептори съдържащи или $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ или $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ последователности (таблица 2). Клетки трансфектирани с родителския вектор не секретират такава сиалилтрансферазна активност. Секретираният ензим е способен също така да сиаилира asialo- $\alpha 1$ кисел гликопротеин. Тези данни са в съгласие с ензимните свойства на пречистения $\alpha 2,3$ -N.

ПРИМЕР 7

Експресия на $\alpha 2,3$ -N сиалилтрансфераза в Baculoovirus

Крайният тетразахарид сиалил Аюис* (SLe^* : $\text{SA}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}[\alpha 1,3\text{Fuc}]$) се идентифицира като лиганда на Р-селектин и Е-селектин и синтетичен олигозахарид съдържащ SLe^* структурата е кандидат за блокиране взаимодействията на селектиновата лиганда. Пълната химическа синтеза на SLe^* е технически и икономически трудна, но използване на специфични гликозилтрансферази за прикрепване на крайна сialова киселина и фукозни остатъци към химически синтезирано ядро на захарида, ще направи синтеза на свободна SLe^* осъществима. Генът кодиращ

$\alpha 2,3$ N сиялилтрансфераза се клонира от сДНК банка от черен дроб на плъх и показва специфична $\alpha 2,3$ (Gal β 1,3/4GlcNAc) сиялилтрансферазна активност когато се експресира в трансфектирани COS-1 клетки (Wen и сътр., ръкопис в подготовка) . Част от сДНК клона кодиращ ензимната част на полипептида, но с липсващ хидрофобен сигнал/мембранно контактен домен, се слива с пре-инсулинова сигнална последователност, за да се формира сДНК кодираща разтворим, секретиран $\alpha 2,3$ NST протеин. Тази сДНК се клонира в Baculovirus пренасящ вектор и се използва за трансфекция на Sf-9 клетки от инсекти в присъствие на див тип Baculovirus ДНК.

Рекомбинантен вирус съдържащ $\alpha 2,3$ -N сияилтрансферазна сДНК се изолира и пречиства и се използва за инфектиране на Sf-9 клетки. Инфектираните клетки секретират $\alpha 2,3$ NST в големи количества в средата и този протеин се пречиства чрез йонообменна хроматография.

Sf-9 клетките са закупени от ATCC. ДНК векторите pGIR199 и pBlueBac са получени от J.C.Paulson and Invitrogen (San Diego, CA), съответно. Sf-9 клетките се отглеждат на клетъчна култура при клетъчна плътност между 0,3 и 1,5 милиона клетки на милилитър в среда за инсекти на Graces (допълнена с 0,33% лакталбуминов хидролизат и 0,33% дрожден екстракт), получен от Gibco (Grand Island, NY), плюс 10% топлинно инактивиран серум от телешки зародиш (JRH Biosciences, Lenexa, KS). Тази среда е означена като GCMS + 10%FCS.

Разтворима форма на $\alpha 2,3$ -N сияилтрансфераза се приготвя по следния начин. сДНК представляваща цяла $\alpha 2,3$ -N

сиалилтрансферазна mРНК се използва като матрица за PCR при използване на два олигонуклеотида като усилватели, които хибридизират (5') точно при С-крайната позиция на комбинацията сигнал/контакт участък на ензима и (3') в посока обратна на poly(A) допълнителна част в 3' нетраслирания участък. Двата олигонуклеотида кодират BamHI местата при техните 5' краища, давайки възможност на PCR продуктите да бъдат клонирани при BamHI сайта на pGIR199, слети в рамка с пре-инсулинова сигнална последователност. Граничните с NheI места се използват да се освободи генното сливане и този cДНК фрагмент се клонира в Baculovirus пренасящ вектор pBluebac, под контрола на Baculovirus полихедринов промотор. Всички рекомбинантни ДНК манипулации се осъществяват при условията препоръчани за ензима от производителя. Векторът pBluebac съдържа E.coli β -галактозидазен ген под контрола на различен Baculovirus промотор и вируси, които са били подложени на рекомбинация и уловеният ДНК вектор може да превърне хромофора X-gal в син продукт.

Създаването на рекомбинантен Baculovirus е осъществено като се използва MaxBac експресионна система (Invitrogen) като се следват точно протоколите препоръчани от производителя. Накратко, плазмид и див тип вирус ДНК се смесват и се използват за трансфекция на Sf-9 клетки по калциевофосфатния метод. Вирусът се произвежда посредством трансфектирани клетки и разпръскване в културалната среда. Рекомбинантният вирус се идентифицира при изследване на плаките посредством синьо оцветен продукт получен под действието на β -галактозидаза върху X-

gal включен в плаковата среда при концентрация 150 $\mu\text{g/ml}$, и пречистен от дивия тип вирус посредством повтаряно разреждане/плакообразуване. Пречистеният вирус се амплифицира в 500 ml чрез инфектиране на пресни Sf-9 клетки. Някои клонове се анализират за способност да причиняват секречия на $\alpha 2,3$ -Нсиалилтрансфераза в инфектираната клетъчна среда чрез тестиране на аликвотна част от средата директно в радиоактивния сиалилтрансферазен анализ описан по-долу.

За да се отгледа голямо количество вируси, 3×10^6 Sf-9 клетки в 25 cm^2 колба за тъканна култура в 5 ml GCMS + 10%FCS се инфектират с единична синя плака свободна от див тип вирус и оставена да расте в продължение на 5-7 дни при 27°C. Получените 5 ml вирусен щок се избистря чрез центрофугиране и следващо амплифициране. Sf-9 клетките в логаритмичната растежна фаза ($0,5-1,5 \times 10^6$ клетки/ml) се инфектират при концентрация от 1×10^7 клетки за ml при мултиплициране на инфекцията (moi) на 1, като се допуска, че вирусният титър в 5 ml щок е 1×10^8 плакообразуващи единици (pfu) за милилитър. Клетките се разреждат обратно десеткратно в GCMS + 10%FCS и се оставят да нарастнат в продължение на 5-7 дни при 27°C. Полученият вирус се избистря и вирусният титър се определя чрез плаков анализ и общо е по-висок от 10^9 pfu/ml. За експресиране на $\alpha 2,3$ -N сиалилтрансфераза, $2,5 \times 10^9$ Sf-9 клетки в логаритмична фаза на растеж се поставят в блюда върху всички пластове на Ten Try Cell Factor (Nunc, Naperville, IL), означени CF-10. Всеки CF-10 има общо растежно пространство 6000 cm^2 и клетките се инфектират с рекомбинантен Baculoovirus при moi = 5 в обем от 300 ml. След инкубация в продължение на един час, се прибавя 1 литър

Excell-400 (JRH Biosciences), свободна от серум среда и клетките се инкубират при 27°C в продължение на 72 часа.

Средата се събира, избистря и филтрира през 0,2 µm филтър. Прибавя се прясна среда (Excell-400 заедно с 2% серум от телешки зародиш) и клетките се инкубират при 27°C в продължение на още 48 часа, и тогава средата се събира, избистря и филтрира.

α2,3-N сиалилтрансферазната активност се анализира като се използва модификация на публикуван анализ (Sadler и сътр., 1979). В 30 µl обем, 14 µl проби се смесват с 3,5 µl лакто-N-тетраоза (Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc) и 12,5 µl анализна смес описана по-долу. Пробите се размесват за кратко, центрофугира се на дъното на реакционната епруветка и се инкубира при 37°C в продължение на 10 минути. Реакционната смес след това незабавно се разрежда в 1 ml 5 mM фосфатен буфер, pH 6 и се нанася на 0,5 ml йонообменна колона. Колоната се пуска и се събира 1 ml елуат в сцинтилационна епруветка и се извършва преброяване. Единицата се дефинира като количество ензим необходимо за преминаване на 1 микромол сиалова киселина към акцептора за минута.

Пробата се състои или от чиста супернатанта или от супернатанта разрежена така, че кинетиката на реакцията се запазва в линеен порядък, приблизително 10000 cpm продукция от колоната. Анализната смес се получава чрез сушене на 0,65 ml (50 µCi) [¹⁴C]-CMP-сиалова киселина (NEN, Boston, MA) и ресуспендиране в 0,65 ml вода съдържаща 2,3 mg CPM-сиалова киселина. Към полученото се прибавя 0,96 1M разтвор на натриев какодилатен буфер, pH 6, 0,48 ml 20%

Triton CF-54, 0,29 ml 50 mg за милилитър разтвор на говежди серумен албумин (всичко получено от Sigma, St.Louis,MO) и вода до общ обем 8 ml. Определя се специфичната активност на анализната смес и се разделя на аликвотни части и се съхранява при -20°C . Използваната йонообменна смола е AGI-X8, 200-400 меша фосфатна форма (BioRad, Richmond,CA).

Концентриране и пречистване на $\alpha 2,3\text{-N}$ сиалилтрансфераза

Среди (1-3 литра) съдържащи $\alpha 2,3\text{-NST}$ се филтрират и концентрират до приблизително 250 ml в Amicon CH2PRS спирална патронна система снабдена с S1Y10 патрони.

Комплектът се подлага на диафилтрация, за да се обезсоли концентрираната супернатанта с три обема 10 mM какодилова киселина, 25 mM натриев хлорид, 25% глицерол, pH 5,3 (буфер А). Пробите след това се пропускат през колона (2,5 x 17 cm) S-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) еквилибрирана с буфер А при скорост на изтичане 2 ml/min. След като всички проби се пропуснат, колоната се промива с буфер А докато OD₂₈₀ изтичащия поток от колоната се върне на изходния (1,6 обема на колоната). $\alpha 2,3\text{ NST}$ след това се елуира от колоната с 50 mM какодилова киселина, 1 M натриев хлорид, 25% глицерол, pH 6,5. Фракциите съдържащи $\alpha 2,3\text{-NST}$ се обединяват и диализират една нощ срещу 1 L 50 mM какодилова киселина, 0,5 M натриев хлорид, 50% глицерол, pH 6,0 и след това се съхраняват при -80°C .

ПРИМЕР 8

Тъканно разпределение на $\alpha 2,3\text{-N}$ сиалилтрансфераза от плъх

За да се охарактеризира тъканното разпределение

на клонирана $\alpha 2,3$ -N сиялилтрансфераза от плъх, се изолира общата РНК от различни тъкани на плъх и се приготвят проби с ^{32}P -белязана сДНК на сиялилтрансферазата. Хибри-дизирането до мРНК от $\sim 2,5$ Kb се наблюдава във всички изпитвани тъкани. Както се наблюдава за двете клонирани сиялилтрансферази, $\alpha 2,3$ -N сиялилтрансферазата показва диференцирана експресия в тъканите на плъх. Най-високото ниво на $\alpha 2,3$ -N сиялилтрансферазна мРНК се открива в мозъка. Черният дроб, бъбреците, дебелото черво, сърцето, яйчниците и белият дроб експресират междинни нива, докато в подчелюстната слюнчена жлеза, далака и тънките черва се откриват ниски нива на мРНК. Обратно, най-високо ниво на Gal β 1,4GlcNAc $\alpha 2,6$ -сиялилтрансферазна мРНК (4,7 и 4,3 Kb, 41,46) се открива в черен дроб на плъх и подчелюстна слюн-чена жлеза, докато ниски нива на мРНК-та се откриват в сърцето, яйчниците и мозъка.

ПРИМЕР 9

Консервативен участък на хомоложност в
каталитичния домен

Консервативният участък на сиялилтрансферазната фамилия - сравнение на първичните структури на трите клонирани сиялилтрансферази показва участък на обширна хомоложност (фиг.12). Този участък се състои от 55 аминокиселини от остатък 156 до остатък 210 на $\alpha 2,3$ -N сиялилтрансфераза с 42% идентични аминокиселини и 58% консервативни аминокиселини между всичките три ензима. Последователностите на трите сиялилтрансферази нямат никаква значителна хомоложност извън този участък. Тъй като този участък на хомоложност е разположен близо

до центъра на каталитичния домен на ензимите, този участък може да представлява консервативна структура необходима за ензимната активност на тези сиалилтрансфери.

Клонирани са три члена на сиалилтрансферазната фамилия на гликозилтрансфери. Макар че 85% от последователностите на всичките три клонирани сиалилтрансфери нямат никаква значителна хомоложност, участъкът от 55 аминокиселини в центъра на всяка молекула е много силно консервативен предлагайки протеинов мотив в сиаилтрансферазната фамилия. Протеиновият мотив е силно консервативна група от аминокиселини в специфичния участък. Други аминокиселинни остатъци вън от този участък са обикновено слабо консервативни, така че има ниска хомоложност в протеините съдържащи същия мотив. С тази дефиниция консервативният участък дефиниран посредством първичните структури на трите клонирани сиаилтрансфери е мотив в сиаилтрансферазната фамилия.

Протеиновите мотиви често се включват в катализа и лигандното свързване (Hodgman, T.C., Comput. Applic. Biosci. 5, 1-13 [1989], Bairoch, A. Prosite: A Dictionary of Protein Sites and Patterns, 5th edn., University of Geneva [1990] и Sternberg, M.J.E., Nature 349, 111 [1991]). Трите клона на сиаилтрансферазата катализират преминаването на сиаловата киселина от CMP-NeuAc в $\alpha 2,3$ или $\alpha 2,6$ свързването на крайна галактоза като се формират следните последователности:

NeuAc $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,3(4)$ GlcNAc- (ST3N)

NeuAc $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,3$ GlcNAc- (ST3O)

NeuAc $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc- (ST6N)

И трите ензима участват с обща функция. Повече от

50% от остатъците в консервативния участък са или натоварени или полярни аминокиселини в съответствие с намирането им на повърхността на ензимите. Шест от натоварените остатъци в този участък са идентични и в трите сиалилтрансферази. Удивително е, че има седем аминокиселинниостатъка в един интервал на консервативния участък идентични в трите клона на сиалилтрансферазата - Dsp.Val.Gly.Ser.Lys.Thr.Thr. (фиг.12).

ПРИМЕР 10

Клониране на нова сиалилтрансфераза като се използва консервативният участък на хомоложност

Консервативният участък на хомоложност се използва, за да се клонират други членове на сиалилтрансферазната генна фамилия.

PCR клониране с изродени олигонуклеотиди

Синтезират се два изродени олигонуклеотида съответстващи на 5' и 3' краищата на консервативния участък на хомоложност (фиг.13) (Genosys). Последователността на 5' и 3' праймерите е

5'GGAAGCTTTGSCRNMGSTGYRYCRTC GT и

5'CCGGATCCGGTRGTYTTNSNSCCACRTC

(N = A + G + T + C, S = G + C, R = A + G, M = A + C, Y = C + T) съответно. Провеждат се PCR експерименти като се използва 100 pmoI от всеки праймер и първата верига сДНК се синтезира от мозък на новороден плъх като матрица. Амплификацията се извършва на 30 цикъла при 94°C в продължение на 1 минута, 37°C в продължение на 1 минута и 72°C в продължение на 2 минути. PCR продуктите се смилат с BamHI и Hind III и на тези места на Bluescript KS се субклонират (Stratagene, 11099

North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037). Субклоновете се охарактеризират чрез секвениране с ТЗ праймер.

Амплифицираният фрагмент от един от тези субклонове, SM1, се използва по-долу, за да се отсее SM1 съдържащия ген, който кодира салилтрансфераза.

Клониране на SM1 съдържащ ген

Произволно иницирана сДНК от мозък на новороден плъх се лигира с EcoRI-NotI линкери, след което се лигира с EcoRI смлян λ gt10. Получената банка се опакова като се използва Stratagene Gigapack II опаковач екстракт и се поставя върху блюда с E.coli C600 hfl. Отсяват се приблизително 10^6 плаки с клонирания SM1 PCR фрагмент. Четири клона, STX1-4, се пречистват и субклонират в NotI мястото на Bluescript (Stratagene) за по-нататъшен анализ.

Northern анализ.Общата РНК от тъкани на плъх се получава като се използва киселинно фенолна процедура както е описано по-рано (Chomczynski, P. и сътр., Anal.Biochem 162, 136-159 [1987]).РНК проби от новородени се изолират от плъхчета на четири дни от раждането.РНК се подлага на електрофореза в 1% агарозен гел съдържащ формалдехид, премества се в нитроцелулоза и се хибридизира като се следват стандартните процедури (Kriegler, M. Gene transfer and expression, Stockton Press, N.Y., N.Y. [1990]). Northern-блотовете се изследват с пречистен с гел, радиобелязан 900bp EcoRI фрагмент изолиран от STX1.

Конструкция на разтворима форма на STX

Пресечена форма на STX, на която липсват първите 31 аминокиселини на затворената рамка на разчитане, се получава посредством PCR развиване с 5' праймер съдържащ

в рамката Ban HI част и 3' праймер разположен 50bp по посока на str кодона. Амплифицирането се извършва на 30 цикъла при 94°C в продължение на 1 минута, 45°C в продължение на 1 минута и 72°C в продължение на 2 минути. Векторът за сливане pGIR201 се конструира чрез включване на BclI/Bam HI фрагмент, изолиран от pRIT5 (Pharmacia LKB Biotech, Inc., 1025 Atlantic Avenue, Suite 101, Alameda, CA 94501), кодиращ протеин A IgG свързващ домен с Bam HI сайта на pGIR201 (подарък от Dr. K. Drickamer, Columbia University). Амплифицираният фрагмент се субклонира в Bam HI сайта на pGIR201protA, при което STX се слива с инсулин сигналната последователност и протеин A присъстващ във вектора. Nhe фрагментът съдържащ слятия протеин се субклонира в плазмид pSVL като се получава експресионен плазмид AX78.

Експресия на разтворима форма на STX

Експресионният плазмид AX78 (10ug) се трансфектира в COS-1 клетки в 10 cm блюда. Два дни след трансфекцията културалната среда се събира и инкубира с IgG сефароза (Pharmacia) в продължение на 1 час при стайна температура. Топчетата се изследват за сialiлтрансферазна активност като се използват олигозахариди, антифризен гликопротеин, смесени ганглиозиди и третирани с нераминидаза мозъчни мембрани от новороден плъх като акцепторни субстрати. Преминаването на сialова киселина към тези акцептори се измерва като се използва йонообменна (Weinstein, J. и сътр., J.Biol.Chem 257, 13835-13844 [1982]), изключване по размер (Id.) и низходяща хартиена хроматография (McCoу, R.D. и сътр., J.Biol.Chem. 260, 12695-12699 [1985]).

Идентични трансфекции се осъществяват при опити с пулсационно маркиране . След 36 часа период на експресия, блюдата се инкубират при 37°C с 2,5 ml DMEM-метион. След 1 час към средата се прибавя 250uCi³⁵S-трансмаркер (Amersham, 2636 S. Clairebrook, Arlington Heights, IL 60005) и блюдата се инкубират в продължение на още 3 часа. В края на това време блюдата се промиват и инкубират една нощ с DMEM. Белязаният слят протеин се изолира чрез инкубиране с IgG сефароза (Pharmacia). След свързването зърната се промиват, кипят се в буфер Laemmli и освободеният протеин се анализира чрез SDS-PAGE/флуорография.

PCR развитие на консервативния участък на хомоложност родствен на този намерен в охарактеризираните сиалилтрансфери

Докато 70% от аминокиселините на консервативния участък на хомоложност на охарактеризираните сиалилтрансфери са консервативни, най-дългите непрекъснати участъци на консервативност са намерени в аминокиселинната последователност в краищата на консервативния участък на хомоложност (фиг.13). Аминокиселинната последователност близо до С-края на консервативния участък на хомоложност е намерено че съдържа непрекъснат интервал от седем инвариантни остатъка. Строгата консервативност на тази аминокиселинна последователност е взета под внимание при конструирането на съответния несложен олигонуклеотид с 256 кратна изроденост, като са обхванати всички наблюдавани вариации в употребата на кодона. Конструкцията на олигонуклеотида съответстващ на N-края на консервативния участък на хомоложност е по-трудна. Аминокиселините в този участък проявяват повече

вариабилност отколкото тези намерени при обратния край на консервативния участък на хомоложност. Конструкцията на олигонуклеотида след това се затруднява от големия кодонен свръхизлишък на аминокиселини. За да се преодолеят тези фактори, олигонуклеотидът от 5' края на консервативния участък на хомоложност се синтезира с 1026 кратна изроденост. Когато тази степен на сложност е близо до прага на изроденост позволена в PCR експериментите, получените праймери обясняват всички нуклеотидни последователности намерени че кодират този участък от консервативния участък на хомоложност.

Невралното развитие е сложен процес, през време на който гликозилтрансферазата се подлага на динамична регулация, което е видно от драматичните промени намерени в клетъчната повърхност на експресирания карбохидрат. На това основание мозък на новороден плъх се избира като суровина за изолиране на нови сиялилтрансферази. Като се използва сДНК от мозък на новороден плъх като матрица за PCR опитите с изродените праймери получени в амплификацията на 150bp ивица, съвместим с известния размер на консервативния участък на хомоложност. Субклонирането и секвенирането показва, че ивицата е смес от два ДНК фрагмента. На тридесет изолата се охарактеризира 56% кодиран α консервативен участък на хомоложност. Останалите клонове обхващат уникалния консервативен участък на хомоложност, SM1. Малко неочаквано SM1 съдържа пет изменения в аминокиселините, които са намерени че са инвариантни в трите по-рано клонирани сиялилтрансферази. Докато тези изменения намаляват общия брой на

инвариантните остатъци, новата информационна последователност осигурена от охарактеризирането на SM1 повишава общата консервативност на консенсусната последователност.

Очакваната аминокиселинна последователност на SM1 не показва склонност към някакъв индивидуален консервативен участък на хомоложност. На същите места (аминокиселини 1, 2, 53, 54) SM1 е подобен на $\approx 2,6$ консервативния участък на хомоложност. В други позиции (аминокиселини 8, 9, 54, 55) SM1 отразява последователностите намерени в $\approx 2,3$ консервативен участък на хомоложност. Тъй като консервативният участък на хомоложност е 85% консервативен, този баланс на подобие има за резултат, че SM1 има приблизително 45% хомоложност спрямо другите членове на синалитрансферазната генна фамилия.

Първична структура на SM1 съдържащия ген

Анализът на секвенциите на 1,5kb клон STX1 показва непрекъсната отворена рамка на разчитане от 375 аминокиселини, които кодират SM1 консервативния участък на хомоложност, охарактеризиран в по-ранните PCR експерименти (фиг. 14). Очакваната аминокиселинна последователност на STX1 предполага че този протеин е от тип II трансмембранен протеин както се наблюдава за всеки от другите клонирани гликозилтрансферази. Очакваната аминокиселинна последователност на STX1 показва наличие на хидрофобен участък от осем остатъка от аминокрая на протеина, който служи като сигнално контактен домен. Консервативният участък на хомоложност е локализиран близо до центъра на протеина. Целият размер на STX протеина и съответните позиции на двата хидрофобни участъка и консервативния

участък на хомоложност строго наподобява характеристиките на първичната последователност на клонираните сиалилтрансфери. Макар че STX не показва никаква хомоложност към клонирани сиалилтрансфери освен консервативния участък на хомоложност, обявеното структурно сходство на тези гени изяснява, че STX представлява най-новия член на тази генна фамилия.

Ензимно охарактеризиране на STX

Природно срещащи се разтворими форми на сиалилтрансфери могат да се намерят в различни секреции и телесни течности (Paulson, J.C. и сътр., J.Biol.Chem. 252, 2356-2367 [1977] и Hudgin, R.L. и сътр., Can. J. Biochem. 49, 829-837 [1971]). Тези разтворими форми получени при протеолитично смилање късат стем участъка на сиалилтрансферазата освобождавайки каталитичния домен от трансмембрания контакт. Разтворимите сиалилтрансфери могат да се конструират рекомбинантно чрез заместване на ендогенния сигнално контактен домен с отцепваща се сигнална последователност (Colley, K.J. и сътр., J.Biol.Chem. 264 17619-17622 [1989]). С оглед да се улесни функционалният анализ на STX, разтворима форма на протеина се произвежда, чрез заместване на първите 31 аминокиселини с отцепваща се инсулин сигнална последователност и протеин A IgG свързващ домен. IgG свързващият домен се включва в конструкцията, за да подпомогне откриването на разтворимия STX протеин. Подобни сливания с ST3N активно секретират от експресионните клетки, свързани с IgG сефароза и са ензимно активни. Когато експресионният плазмид съдържащ протеин A/STX сливане (AX78) се експресира в COS-1 клет-

ките, се изолира 85kd протеин. Големината на слятия протеин е приблизително 15kd по-голяма отколкото очакваното молекулно тегло на полипептида, което предполага, че част от STX потенциалните N-свързани гликозилирани части са били използвани.

Свързаният слят протеин се изследва за сиалил-трансферазна активност като се използват различни акцепторни субстрати. Активността не се открива като се използва β -галактозиден акцептор съдържащ Gal β 1,3(4)GlcNAc последователности. Подобно, не се открива преминаване на сиалова киселина към O-свързаните олигозахариди на антифризния гликопротеин. Експресията на STX в мозъчна тъкан предполага, че генът може да се включи в гликолипидната биосинтеза. Обаче, смесени ганглиозиди изолирани от мозък на възрастно говедо не успяват да послужат като акцепторен субстрат. Мозъчни мембрани от новородено третирани с неуроамидаза са единственият субстрат показващ дори несигурна способност да послужи като акцептор. Инкубирането на третираните мембрани с STX слят протеин води до получаване на 50% увеличение на активността спрямо фона.

Растежна и тъканна специфична експресия на STX

С оглед да се определи характера на експресията и сигналния размер на STX гена, Northern блотове се изследват с 900bp EcoRI фрагмент изолиран от STX1. От различни изследвани тъкани хибридизация на 5,5 kb сигнал се наблюдава само в РНК от мозък на новороден плъх. Не се наблюдава никаква кръстосана хибридизация на съответния консервативен участък на хомоложност. Ограничителната

експресия на STX е отклонение от диференцираните тъканно специфични експресии намерени с охарактеризирани сиалилтрансферази. Тъй като всеки от тези гени е независимо регулиран, което води до различен характер на специфична експресия, общо, всяка сиалилтрансфераза се експресира различно в различните тъкани (Paulson, J.C. и сътр., J.Biol.Chem. 264, 10931-10934 [1989]). Обратно, STX се експресира само в мозък на новородено. Експресията не е генерализиран ембрионен феномен тъй като сигнал не е открит в бъбреци на новородено.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Сиалилтрансфераза по същество свободна от компоненти срещащи се в *in vivo* физиологичната среда, с ограничението, че сиалилтрансферазата е различна от Gal β 1,4GlcNAc α 2,6 сиалилтрансфераза от плъх.

2. Сиалилтрансфераза съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че е водоразтворима.

3. Сиалилтрансфераза съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че определен аминокиселинен остатък е заменен, включен или отпаднал.

4. Сиалилтрансфераза съгласно претенция 3, характеризираща се с това, че трансмембранный домен от аминокрая е отпаднал.

5. Сиалилтрансфераза съгласно претенция 3, характеризиращ се с това, че е отпаднал цитоплазменият домен от аминокрая.

6. Сиалилтрансфераза съгласно претенция 3, характеризираща се с това, че са отпаднали трансмембранен домен, цитоплазмен домен и стем участък.

7. Сиалилтрансфераза съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че не е съпроводена от нативно гликозилиране, с ограничението, че сиалилтрансферазата е различна от Gal β 1,4GlcNAc α 2,6 сиалилтрансфераза от плъх.

8. ДНК изолат кодиращ сиалилтрансфераза, с ограничението, че този ДНК изолат е различен от Gal β 1,4GlcNAc α 2,6 сиалилтрансфераза от плъх.

9. Изолат съгласно претенция 8, характеризиращ се

с това, че е свободен от сиалилтрансферазни интрони.

10. Изолат съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че е свободен от геномна ДНК кодираща друг полипептид, чиято ДНК е от същите видове както ДНК на изолата.

11. Изолат съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че ДНК кодира сиалилтрансфераза съдържаща консервативен участък на хомоложност от най-малко 20 аминокиселини.

12. Изолат съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че ДНК кодираща сиалилтрансфераза се състои от сиалилтрансферазен консервативен участък на хомоложност от най-малко пет аминокиселини от хептапептида -Asp-Val-Gly-Ser-Lys-Thr-Thr.

13. Изолат съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че консервативният участък от най-малко хептапептиден мотив е избран от аминокиселинните остатъци 156-210 на аминокиселинната последователност от фиг.2.

14. Изолат съгласно претенция 14, характеризиращ се с това, че хептапептидният мотив е -Asp-Val-Gly-Ser-Lys-Thr-Thr.

15. Изолат съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че консервативният участък от най-малко хептапептиден мотив от избран от аминокиселинните остатъци 142-196 на аминокиселинната последователност от фиг. 1.

16. Изолат съгласно претенция 15, характеризиращ се с това, че хептапептидният мотив е -Asp-Val-Gly-Ser-Lys-Thr-Thr.

17. Изолат съгласно претенция 8, характеризиращ се

с това, че ДНК сиалилтрансфераза се състои от консервативен участък на хомоложност от най-малко 48 аминокиселини.

18. Изолат съгласно претенция 17, характеризиращ се с това, че консервативният участък на хомоложност от най-малко 55 аминокиселини е избран от остатъци 156-210 на аминокиселинната последователност от фиг. 2.

19. Рекомбинантен експресионен вектор съдържащ ДНК кодираща сиалилтрансфераза с ограничението, че тази сиалилтрансфераза е различна от Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-сиалилтрансфераза от плъх.

20. Състав, характеризиращ се с това, че съдържа клетка трансформирана с рекомбинантен експресионен вектор съгласно претенция 19.

21. Състав съгласно претенция 20, характеризиращ се с това, че клетката е еукариотна клетка.

22. Метод за продукция на сиалилтрансфераза, характеризиращ се с това, че се конструира вектор имащ ДНК кодираща сиалилтрансфераза, трансформира се клетка госто-;приемник с вектора и трансформиланата клетка се култивира, с ограничението, че казаната сиалилтрансфераза е различна от Gal β 1,4GlcNAc α 2,6 сиалилтрансфераза.

23. Метод съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че съдържа и етап на извличане на казаната сиалилтрансфераза.

24. Метод съгласно претенция 23, характеризиращ се с това, че клетката гостоприемник е еукариотна клетка.

25. Метод съгласно претенция 24, характеризиращ се с това, че еукариотната клетка е COS клетъчна линия.

26. Метод съгласно претенция 24, характеризиращ се

с това, че еукариотната клетка е клетъчна линия от бъбреците на човешки ембрион.

27. ДНК изолат кодиращ полипептид с аминокислотна последователност показана на фиг. 1 или фиг. 2 .

28. Метод за продукция на ДНК кодираща сиалилтрансфераза, характеризиращ се с това, че а) се приготвят олигонуклеотидни проби съответстващи на сиалилтрансферазен консервативен участък на хомоложност, б) отсяване чрез хибридизация на ДНК банка като се използват олигонуклеотидните проби, в) откриване хибридизацията от етап б) и г) извличане на продукта от етап в).

29. Метод съгласно претенция 28, характеризиращ се с това, че олигонуклеотидната проба има нуклеотидна последователност кодираща Asp-Val-Gly-Ser-Lys-Thr-Thr или нейни варианти.

30. Метод за извличане на ДНК кодираща сиалилтрансфераза, характеризиращ се с това, че а) се конструира банка нуклеинова киселина съдържаща ген кодиращ сиалилтрансферазата, б) амплифициране на ДНК кодираща сиалилтрансфераза като се използва полимеразна верижна реакция (PCR) посредством праймер, който се свързва с базичните двойки, кодиращ най-малко пет аминокиселини от хептапептида в консервативния участък на хомоложност, в) субклониране на PCR продукти в подходящ вектор, г) секвениране на отделните PCR клонове, за да се идентифицират клоновете съдържащи консервативен участък на хомоложност, д) отсяване на банката нуклеинова киселина като се използва продуктът от етап г) и е) извличане на продукта от етап д).

31. Изолат съгласно претенция 8, характеризиращ се

с това, че най-малко 17 аминокиселини от 48-те аминокиселини на последователността 156-210 от фиг. 2 са консервативни.

32. Изолат съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че най-малко 17 аминокиселини от 48-те аминокиселини на последователността 142-196 от фиг. 1 са консервативни.

33. Сиалилтрансфераза съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че аминокиселинната последователност е както е показана на фиг. 14.

34. ДНК изолат съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че нуклеотидната последователност е както е показана на фиг. 14

35. Рекомбинантен експресионен вектор съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че казаната ДНК има нуклеотидната последователност както е показана на фиг. 14.

36. Състав, характеризиращ се с това, че съдържа клетки трансформирани с експресионен вектор съгласно претенция 35.

37. Метод съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че казаната ДНК има нуклеотидна последователност както е показана на фиг. 14.

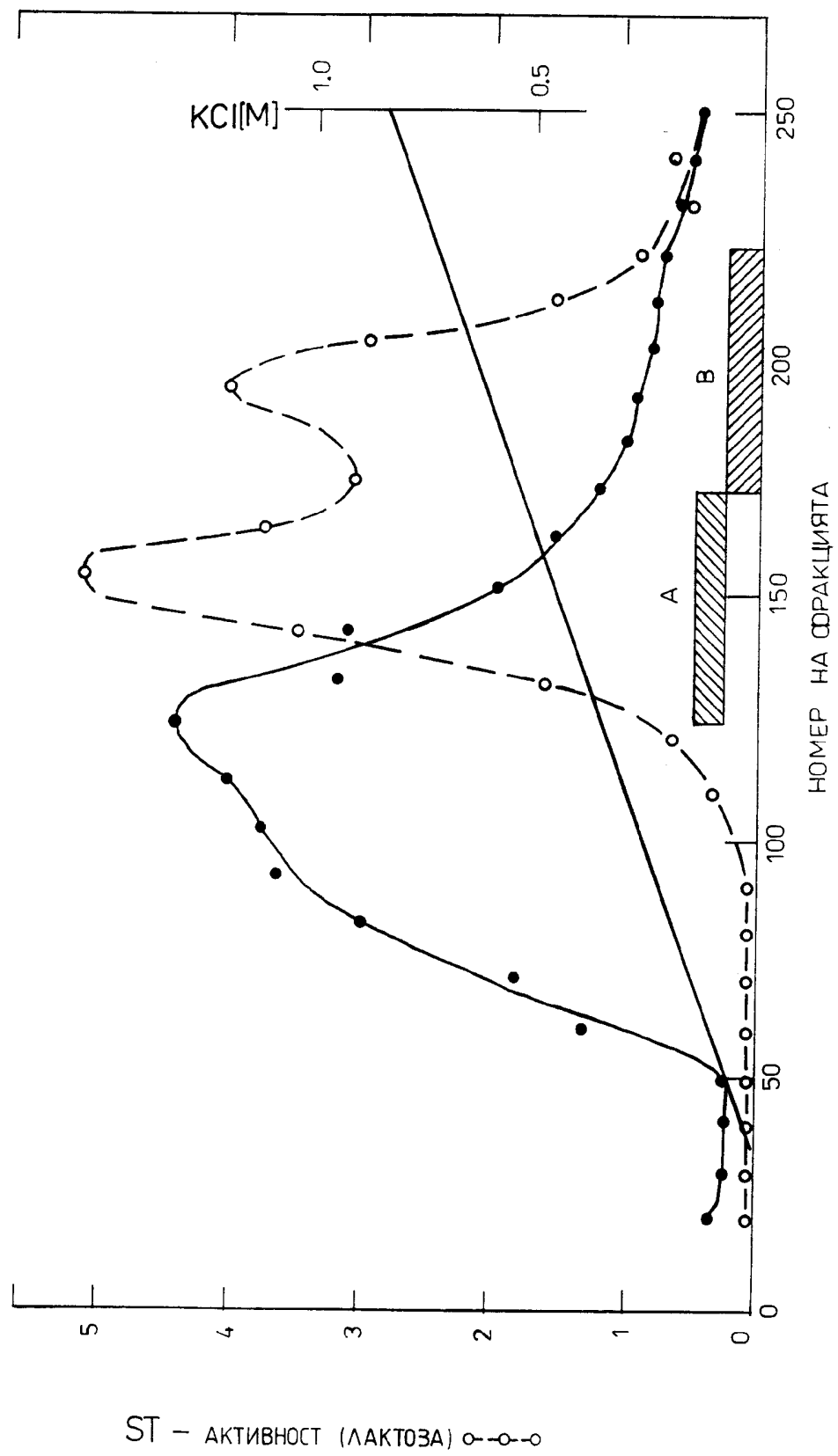
38. ДНК фрагмент кодиращ консервативен участък на хомоложност.

39. ДНК фрагмент съгласно претенция 38, характеризиращ се с това, че има нуклеотидна последователност както е показана на фиг. 13.

-02 T GCC TTT CCC GGG GCC AGA TCC TCT TCG GAG CGA CCG GGT CAG TTT GTC AAA GTC ATG TAG GAA ATT GTG GGT CAT GTG AAG 0
 1 ATG GGA CTC TTG GTA TTT GTA CGC AAC CTG CTG CTA GCC CTC TGC CTC TTT CTG GTC CTG GGA TTT TTG TAT TAT TCT GCC TGG AAG CTA 90
 1 Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu 30
 91 CAC TTA CTC CAA TGG GAA GAC TCC AAT TCA CTG ATT CTT TCC GCT GAC TCC GGT GGA CAA ACC CTA GGC ACA GAG TAT GAT AGG CTG GGT 180
 31 His Leu Leu Gln Trp Glu Asp Ser Asn Ser Leu Ile Leu Ser Leu Asp Ser Ala Gly Gln Thr Leu Gly Thr Glu Tyr Asp Arg Leu Gly 60
 181 TTC CTC CTC AAG CTG GAC TCT AAA CTG CCT GCA GAG CTG GCC ACC AAG TAC GCT AAC TTT TCC GAG GGA GCC TGC AAA CCC GGC TAC GCT 270
 61 Phe Leu Leu Lys Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala 90
 271 TCA GCC ATG ATG ACT GCC ATC TTC CCC AGG TTC TCC AAG CCA GCA CCC ATG TTC CTG GAT GAC TCC TTT CGC AAA TGG GCT AGG ATT CGG 360
 91 Ser Ala Met Met Thr Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg 120
 361 GAG TTT GTG CCA CCC TTT GGG ATC AAA GGT CAA GAC AAT CTG ATC AAA GCC ATC TTG TCA GTC ACC AAA GAA TAC CGC CTG ACC CCT GCC 450
 121 Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala 150
 451 TTG GAC AGC CTC CAC TGC CGC CGC TGC ATC ATC GTA GGC AAT GGA GGG GTC CTC GCC AAC AAG TCT CTG GGG TCA CGA ATT GAC GAC TAT 540
 151 Leu Asp Ser Leu His Cys Arg Arg Cys Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser Arg Ile Asp Asp Tyr 180
 541 GAC ATT GTG ATC AGA TTG AAC TCA GCA CCT GTG AAG GGC TTT GAG AAG GAC GTG GGC AGC AAG ACC CTG CGC ATC ACC TAC CCT GAA 630
 181 Asp Ile Val Ile Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val Lys Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Pro Glu 210
 631 GGT GCC ATG CAG CGG CCT GAG CAA TAT GAA CGA GAC TCT CTC TTT GTA CTA GCT GGC TTC AAG TGG CAG GAC TTC AAG TGG CTG AAG TAC 720
 211 Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys Tyr 240
 721 ATC GTC TAC AAG GAG AGA GTG AGC GCA TCC GAT GGC TTC TGG AAG TCC GTG GCC ACC CGA GTG CCC AAG GAG CCC CCT GAG ATC CGC ATC 810
 241 Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser Asp Gly Phe Trp Lys Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro Glu Ile Arg Ile 270
 811 CTC AAC CCG TAC TTC ATC CAG GAG GCT GCC TTC ACG CTC ATC GGA CTG CCC TTC AAC AAT GGC CTC ATG GGC AGA GGG AAC ATC CCA ACC 900
 271 Leu Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr Leu Ile Gly Leu Pro Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile Pro Thr 300
 901 CTT GGC AGT GTG GCA GTG ACC ATG GCA CTC GAT GGC TGT GAT GAA GTG GCA GTC GCG GGC TTT GGC TAT GAC ATG AAC ACA CCC AAC GCC 990
 301 Leu Gly Ser Val Ala Val Thr Met Ala Leu Asp Gly Cys Asp Glu Val Ala Val Ala Gly Phe Gly Tyr Asp Met Asn Thr Pro Asn Ala 330
 991 CCC CTG CAC TAC TAT GAA ACT GTG CGC ATG GCA GCC ATC AAA GAG TCC TGG ACA CAC AAC ATC CAG CGA GAG AAA GAG TTT CTG CGG AAG 1080
 331 Pro Leu His Tyr Tyr Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser Trp Thr His Asn Ile Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys 360
 1081 CTA GTG AAA GCA CGC GTC ATC ACT GAC TTA AGC AGT GGT ATC TGA
 361 Leu Val Lys Ala Arg Val Ile Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile STOP

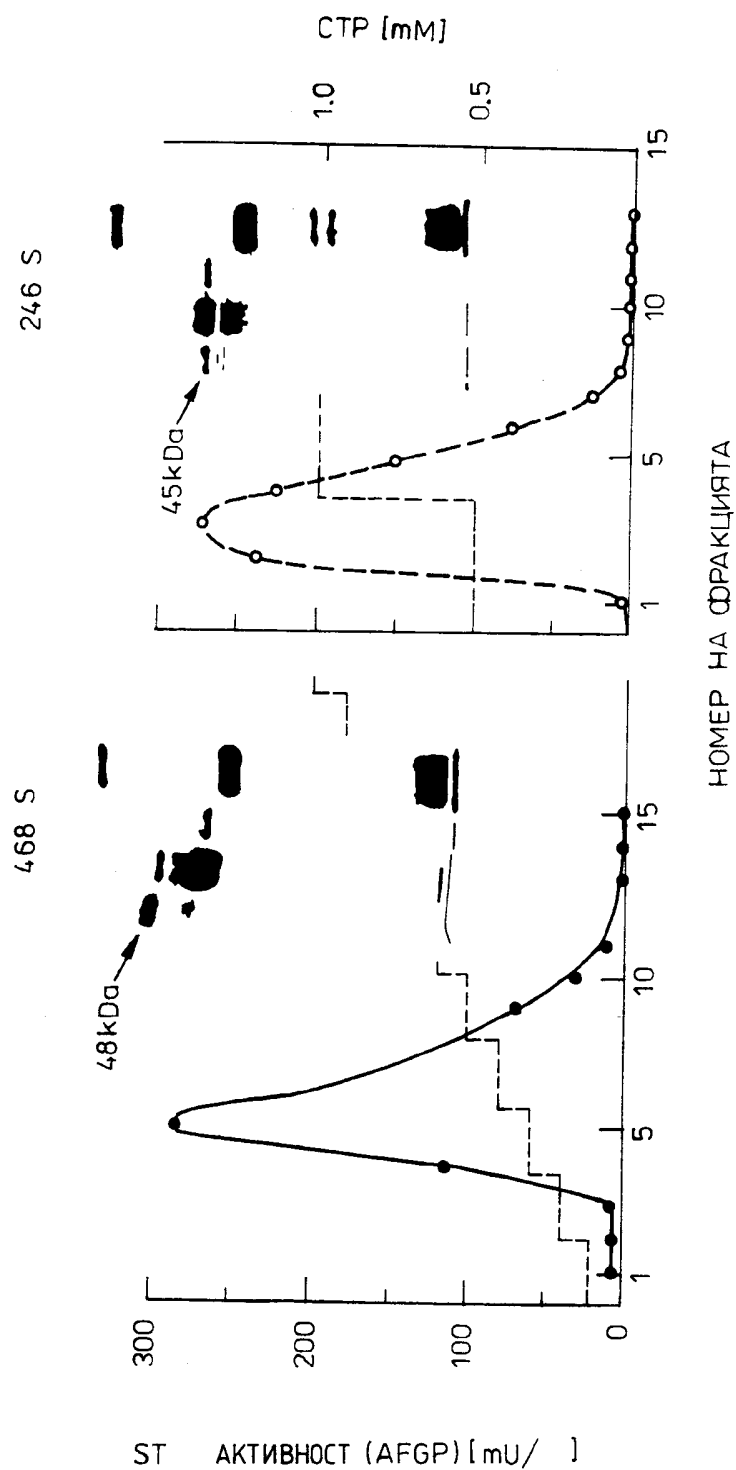
FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET



ФИГ. 4А

ФИГ. 4Б

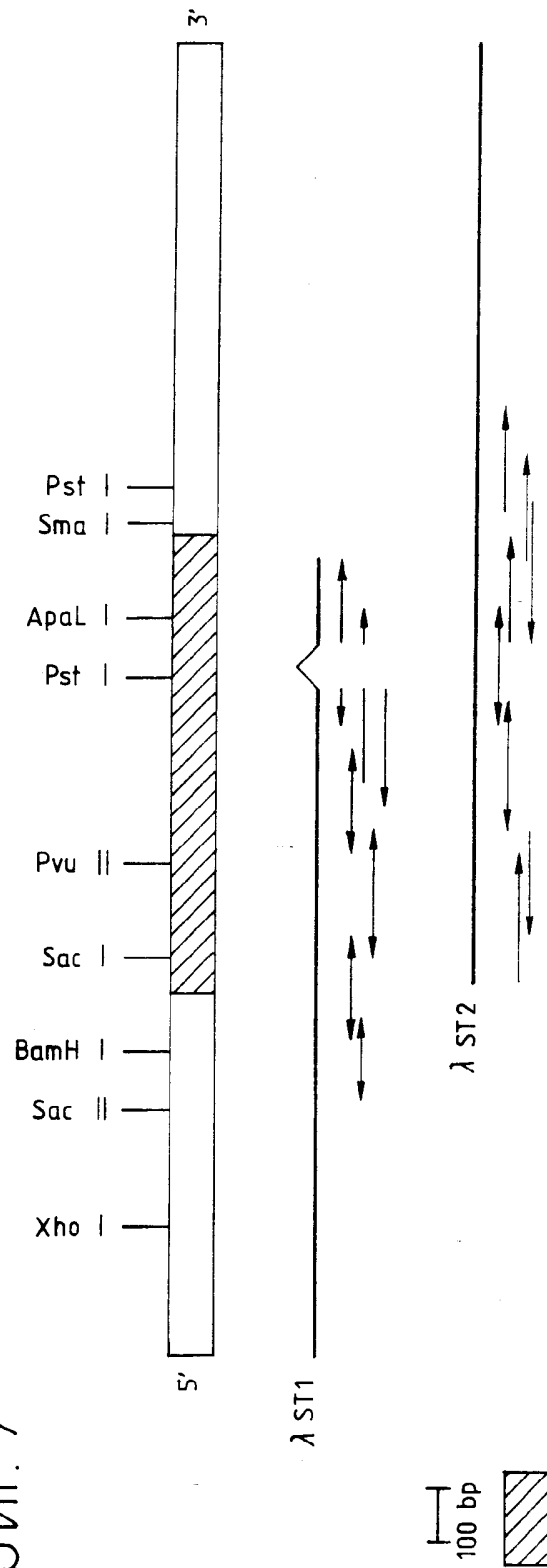


ФИГ. 5

48 кДа ПЕПТИДНА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ
 NH₂- Ser - Thr - Leu - Lys - Leu - His - Thr - Leu - Leu - Val -10
 11 Leu - Phe - Ile - Phe - Leu - Thr - Ser - Phe - Phe - Leu - 20
 21 Asn - Tyr - COOH

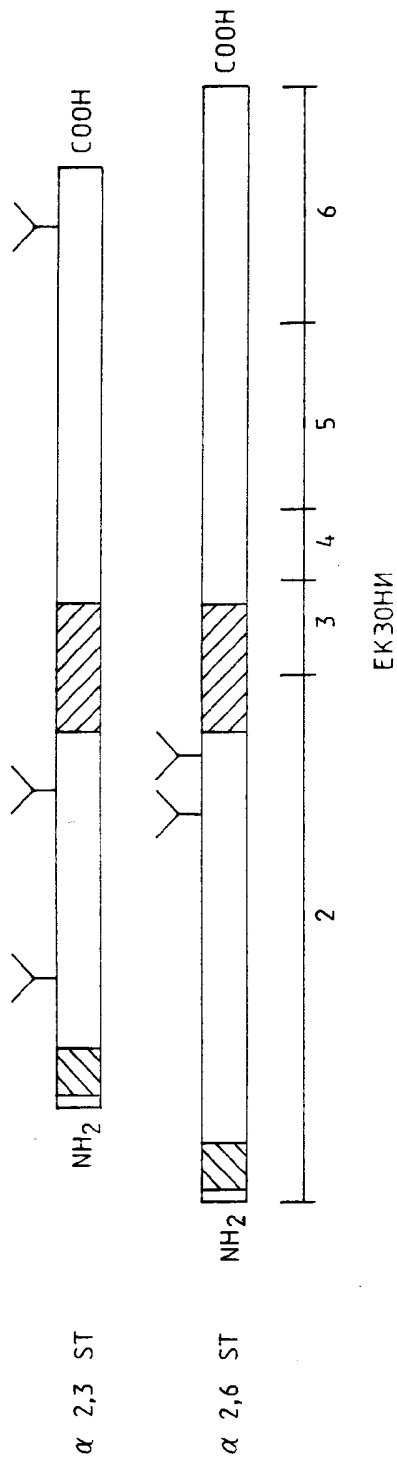
45 кДа ПЕПТИДНА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ
 NH- Lys - Tyr - Pro - Tyr - Arg - Pro - Thr - Thr - Thr -10
 11 Arg - Ile - Ile - Glu - Glu - Gln - Lys - Val - Ser - Ala - 20
 21 Phe - Phe - COOH

ФИГ. 7



ОТВОРЕНА РАМКА НА РАЗЧИТАНЕ

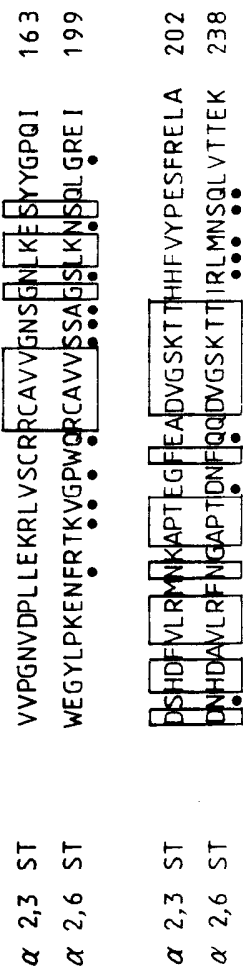
ФИГ. 6А



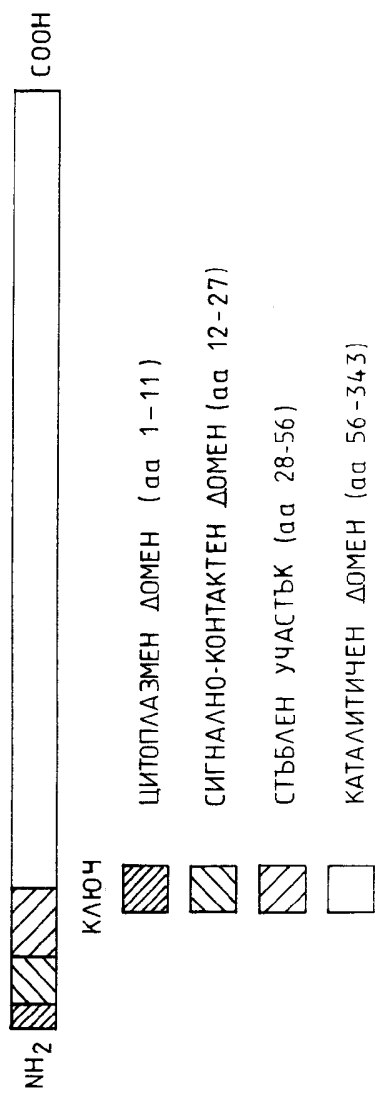
Сигнален контактен домен

Участък на хомоложна последователност

ФИГ. 6Б



ST (ДВ ТИП СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗА)



КЛЮЧ

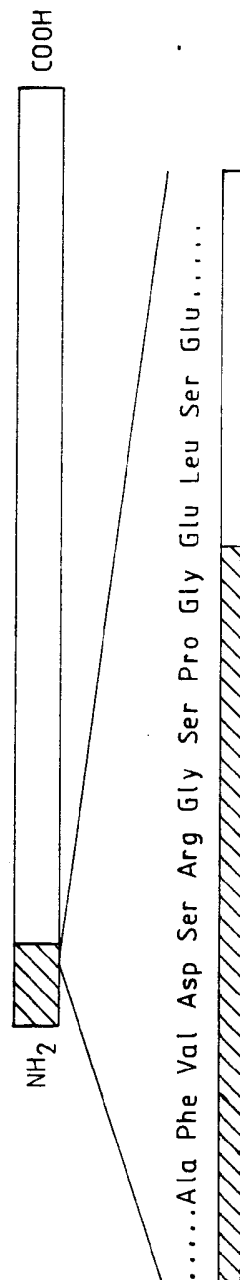
ЦИТОПЛАЗМЕН ДОМЕН (aa 1-11)

СИГНАЛНО-КОНТАКТЕН ДОМЕН (aa 12-27)

СТЪБЛЕН УЧАСТЪК (aa 28-56)

КАТАЛИТИЧЕН ДОМЕН (aa 56-343)

sp-ST (СИГНАЛЕН ПЕПТИД СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗА)



NH_2

COOH

.....Ala Phe Val Asp Ser Arg Gly Ser Pro Gly Glu Leu Ser Glu.....



МЯСТО НА КЪСАНЕ НА СИГНАЛНИЯ ПЕПТИД

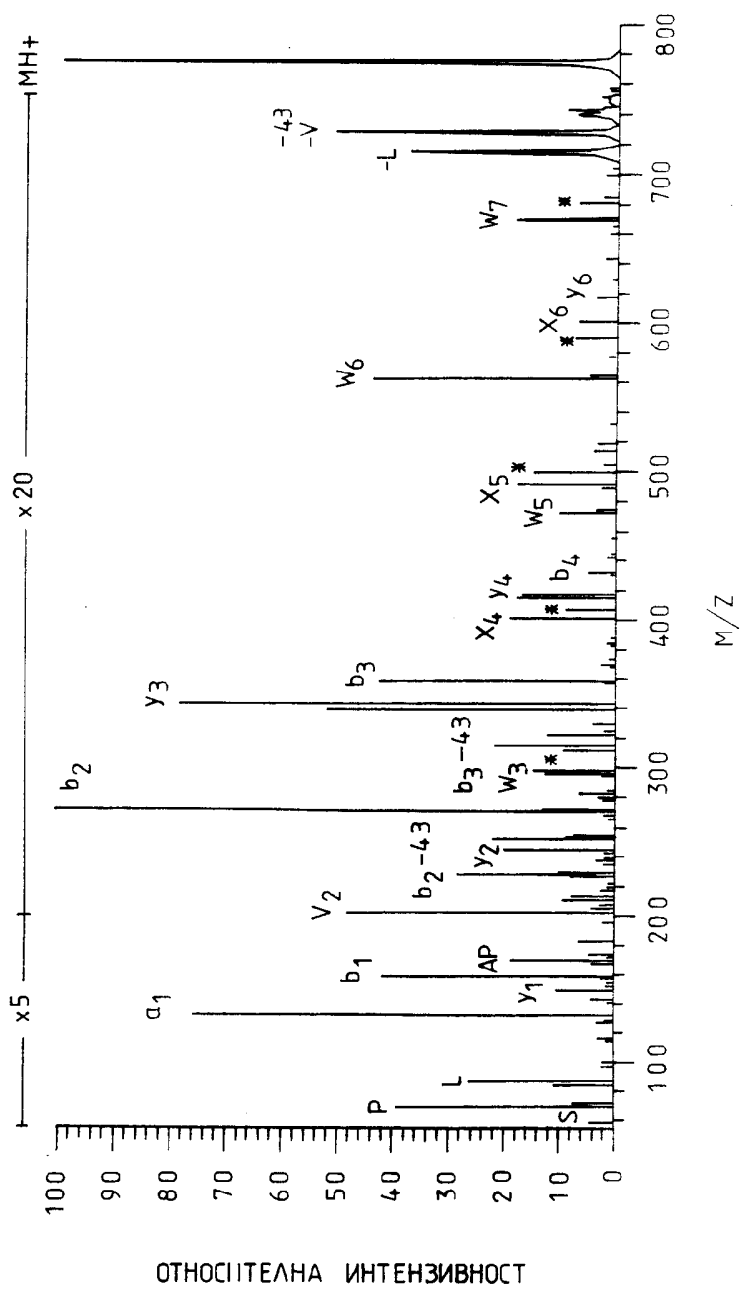
КЛЮЧ

ИНСУЛИН СИГНАЛЕН ПЕПТИД + 9 АМИНОКИСЕЛИНИ

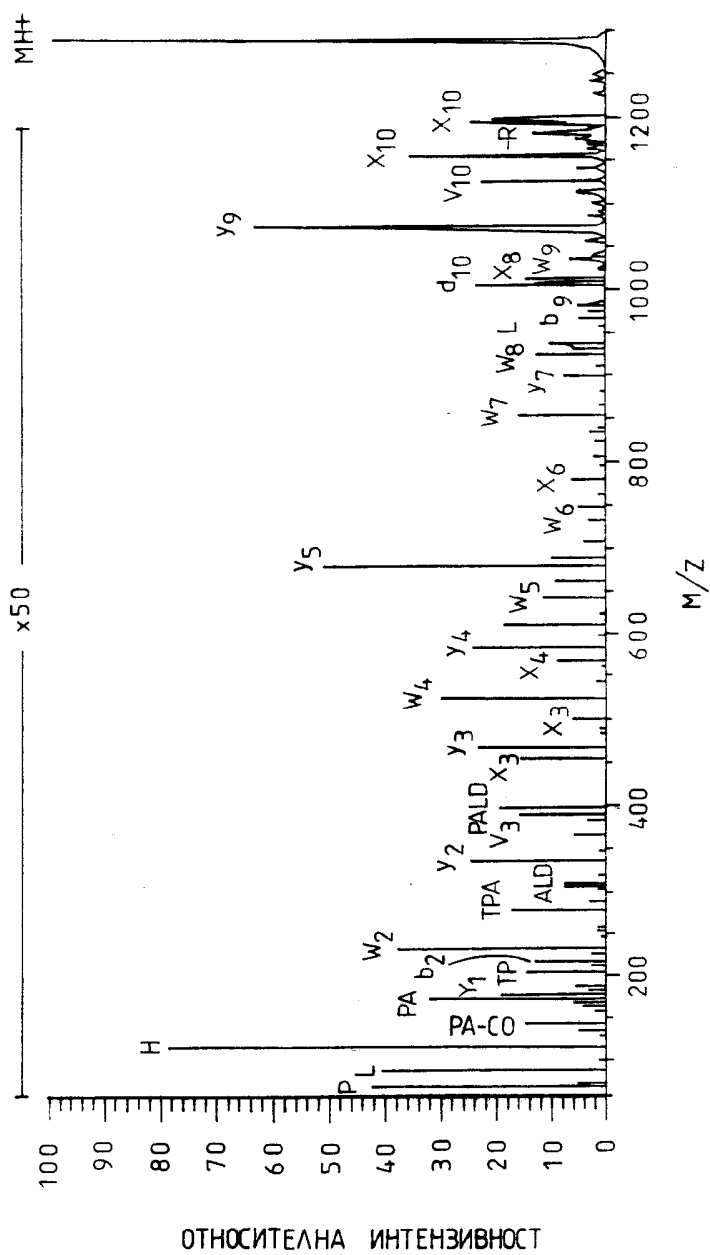
КАТАЛИТИЧЕН ДОМЕН (aa 46-343)

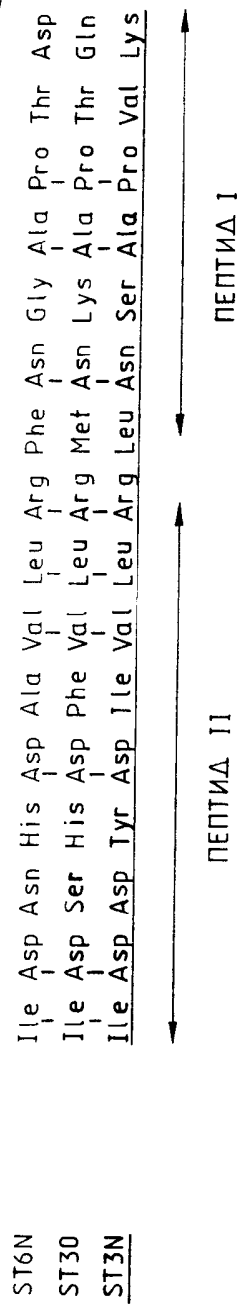
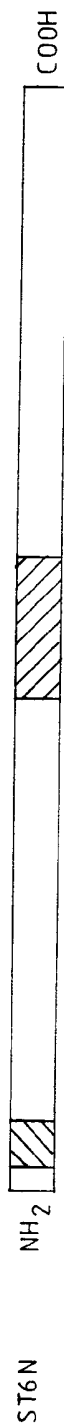
ФИГ. 9

v	670	469	202
w	669	555	300
x	641	527	440
y	615	501	414
z	599	485	398
			230
			131
NH ₂ -CO-Leu-Asn-Ser-Ala-Pro-Val-Lys			
a	129	330	
b	157	271	358
			429
			526



	1124	843	728	641	528	391	230
v							
w	1137	1026	842	727	640	527	229
x		998	927	814	699	612	499
y		1069	972	901	788	673	586
z	1154	956	885	772	657	570	457
	Leu-Thr-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-His-Cys*Arg						
a	86	187				920	1081
b	114	215	383			948	1109
d							991





ST3N	Cys	Arg	Arg	Cys	Ile	Ile	Val	Gly	Asn	Gly	Val	Leu	Ala	Asn	Lys	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg
ST3O	Cys	Arg	Arg	Cys	Ala	Val	Val	Gly	Asn	Ser	Gly	Leu	Lys	Glu	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Pro	Gln
ST6N	Tyr	Gln	Arg	Cys	Ala	Val	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Leu	Lys	Asn	Ser	Gln	Leu	Gly	Arg	Glu
ST3N	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asp	Ile	Val	Leu	Arg	Leu	Asn	Ser	Ala	Pro	Val	Lys	Gly	Phe	Glu	Lys
ST3O	Ile	Asp	Ser	His	Asp	Phe	Val	Leu	Arg	Met	Asn	Lys	Ala	Pro	Thr	Glu	Gly	Phe	Glu	Ala
ST6N	Ile	Asp	Asn	His	Asp	Ala	Val	Leu	Arg	Phe	Asn	Gly	Ala	Pro	Thr	Asp	Asn	Phe	Gln	Gln
ST3N	Val	Gly	Ser	Lys	Thr	Thr	Leu	Arg	Ile	Thr	Tyr	Pro	Glu							
ST3O	Val	Gly	Ser	Lys	Thr	Thr	His	His	Phe	Val	Tyr	Pro	Glu							
ST6N	Val	Gly	Ser	Lys	Thr	Thr	Ile	Arg	Leu	Met	Asn	Ser	Gln							

FIG. 12

1	KOHCEHCYC	<u>c b r C a x V g n s G v L k n s . l G . e I D . h d f v l r . N . A P t . q f e . D V G s K I t l r . m n p a</u>	55
2,3(O)-ST	CRRCAVVGN	SGNLKESYYGPGQIDSHDFVLRHNKAPTEGF	EADVGSKTTHHFVYPE
2,3(N)-ST	CRRCIIVGN	GGVLANKSLGSRIDDYDIVIRLNSAPVKGF	EADVGSKTTLRIITPE
2,6(N)-ST	WQRCAVVSS	AGSLKNSQLGREIDNHDAVLRFWGAPTDNF	QQDVGSKTTLIRLMN9Q
SH1	PQTCAIVGN	SGVLLNSGCGQEIDTHSFVIRCNLAPVQEY	ARDVGLKTDLVTMNP

FIG. 13

1 ATG CAG CTG CAG TTC CGG AGC TGG ATG CTG GCC GCG CTC ACG CTG CTG GTG GTG TTC CTC ATC TTC GCA GAC ATC TCA GAG ATC GAA GAA 90
 1 Met Gln Leu Gln Phe Arg Ser Trp Met Leu Ala Ala Leu Thr Leu Leu Val Val Phe Leu Ile Phe Ala Asp Ile Ser Glu Ile Glu Glu 30
 91 GAA ATC GGG AAT TCT GGA GGC AGA GGT ACA ATC AGA TCA GCT GTG AAC AGC TTA CAT AGC AAA TCT AAT AGA GCT GAA GTT GTA ATA AAT 180
 31 Glu Ile Gly Asn Ser Gly Gly Arg Gly Thr Ile Arg Ser Ala Val Asn Ser Leu His Ser Lys Ser Asn Arg Ala Glu Val Val Ile Asn 60
 181 GGC TCT TCA CTA CCA GCC GTT GCT GAC AGA AGT AAT GAA AGC CTT AAG CAC AGC ATC CAG CCA GCC TCA TCC AAG TGG AGA CAC AAC CAG 270
 61 Gly Ser Ser Leu Pro Ala Val Ala Asp Arg Ser Asn Glu Ser Leu Lys His Ser Ile Gln Pro Ala Ser Ser Lys Trp Arg His Asn Gln 90
 271 ACG CTC TCT CTG AGG ATC AGG AAG CAA ATT TTA AAG TTC CTG GAT GCA GAG AAG GAT ATT TCT GTC CTT AAG GGG ACC CTG AAG CCT GGA 360
 91 Thr Leu Ser Leu Arg Ile Arg Lys Gln Ile Leu Lys Phe Leu Asp Ala Glu Lys Asp Ile Ser Val Leu Lys Gly Thr Leu Lys Pro Gly 120
 361 GAC ATT ATT CAT TAT ATC TTT GAT CGA GAC AGC ACA ATG AAC GTG TCC CAG AAC CTC TAT GAA CTC CTC CCC AGA ACC TCA CCT CTG AAG 450
 121 Asp Ile Ile His Tyr Ile Phe Asp Arg Ser Thr Met Asn Val Ser Gln Asn Leu Tyr Glu Leu Leu Pro Arg Thr Ser Pro Leu Lys 150
 451 AAT AAG CAT TTC CAG ACT TGT GCC ATC GTG GGC AAC TCA GGA GTC TTG CTC AAC AGC GGC TGT GGG CAG GAG ATT GAC ACA CAC AGC TTT 540
 151 Asn Lys His Phe Gln Thr Cys Ala Ile Val Gly Asn Ser Gly Val Leu Leu Asn Ser Gly Cys Gly Gln Glu Ile Asp Thr His Ser Phe 180
 541 GTC ATA AGG TGC AAC CTG GCT CCA GTT CAG GAG TAT GCC CGG GAT GTG GGC CTC AAG ACT GAC CTA GTG ACC ATG AAC CCC TCA GTC ATC 630
 181 Val Ile Arg Cys Asn Leu Ala Pro Val Gln Glu Tyr Ala Arg Asp Val Gly Leu Lys Thr Asp Leu Val Thr Met Asn Pro Ser Val Ile 210
 631 CAG CGG GCC TTT GAG GAC CTA GTG AAT GCC ACG TGG CGG GAG AAG CTA CTG CAG CGA CTG CAT GGC CTC AAT GGG AGC ATA CTG TGG ATA 720
 211 Gln Arg Ala Phe Glu Asp Leu Val Asn Ala Thr Trp Arg Glu Lys Leu Leu Gln Arg Leu His Gly Leu Asn Gly Ser Ile Leu Trp Ile 240
 721 CCT GCC TTC ATG GCC CGG GGT GGC AAG GAG CGT GTG GAG TGG GTC AAT GCT CTC ATC CTG AAG CAC CAT GTC AAC GTA CGC ACA GCT TAC 810
 241 Pro Ala Phe Met Ala Arg Gly Gly Lys Glu Arg Val Glu Trp Val Asn Ala Leu Ile Leu Lys His His Val Asn Val Arg Thr Ala Tyr 270
 811 CCT TCC CTG CGC CTG CAC GCA GTC CGA GGA TAT TGG CTG ACC AAC AAA GTC CAC ATC AAA AGA CCA ACC ACT GGC CTC CTG ATG TAC 900
 271 Pro Ser Leu Arg Leu Leu His Ala Val Arg Gly Tyr Trp Leu Thr Asn Lys Val His Ile Lys Arg Pro Thr Thr Gly Leu Leu Met Tyr 300
 901 ACC CTG GCC ACA CGC TTC TGC AAT CAG ATC TAC CTT TAT GGC TTC TGG CCC TTC CCA TTG GAT CAG AAT CAG AAC CCC GTC AAG TAC CAC 990
 301 Thr Leu Ala Thr Arg Phe Cys Asn Gln Ile Tyr Leu Tyr Gly Phe Trp Pro Phe Pro Leu Asp Gln Asn Gln Asn Pro Val Lys Tyr His 330
 991 TAT TAT GAC AGC CTC AAG TAT GGC TAC ACC TCC CAG GCC AGC CCC CAC ACC ATG CCC TTG GAA TTC AAG GCC CTC AAG AGC CTA CAT GAA 1080
 331 Tyr Tyr Asp Ser Leu Lys Tyr Gly Tyr Thr Ser Gln Ala Ser Pro His Thr Met Pro Leu Glu Phe Lys Ala Leu Lys Ser Leu His Glu 360
 1081 CAG GGG GCA TTG AAA CTG ACT GTC GGC CAG TGT GAC GGG GCT ACG TAA
 361 Gln Gly Ala Leu Lys Leu Thr Val Gly Gln Cys Asp Gly Ala Thr STOP

FIG. 14