



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 38 298 T2** 2008.05.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 017 846 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 38 298.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/11260**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 925 161.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/054365**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **03.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.05.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

48303 P 30.05.1997 US

(73) Patentinhaber:

**Abaron Biosciences, Inc., Del Mar, Calif., US; The
Regents of the University of California, Oakland,
Calif., US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MARTH, Jamey D., San Diego, CA 92122, US;
PAULSON, James C., Del Mar, CA 92014, US**

(54) Bezeichnung: **KONTROLLE DER IMMUNANTWORTEN DURCH REGULIERUNG DER AKTIVITÄT VON GLYKO-SYLTRANSFERASEN**

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

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

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG** Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet des Modulierens von Immunantworten durch die Verabreichung eines Mittels, das die Struktur von Sialylgalactosiden beeinflusst, die auf Zellen vorhanden sind, die in Immunantworten involviert sind.

Hintergrund

[0002] Während alle eukaryotischen Zelloberflächen von Oligosacchariden bedeckt sind, zeigen Zellen von Wirbeltieren teilweise durch die Produktion von einzigartigen asparagingebundenen Oligosaccharidstrukturen spezifisch ein stärker diversifiziertes und komplexeres Repertoire auf (Kornfeld und Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631 (1985); Varki und Freeze, in: *Subcellular Biochemistry: Membrane Biogenesis* 22, 71, Maddy und Harris (Hrsg.), Plenum Press, New York (1994)). Die Genüßerfamilie der Wirbeltier-Glykosyltransferasen steuert die Biosynthese und Diversifikation von Zelloberflächen-Oligosacchariden (Schachter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1 (1991); Kleene und Berger, *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 283 (1993); Marth, *Glycoconjugate J.* 11,3 (1994)). Diese Typ-II-Transmembran-Enzyme weisen ausgezeichnete Substratspezifitäten auf und sind im Golgi-Apparat organisiert, um in der schrittweisen Produktion von Oligosacchariden zu wirken. Die Oligosaccharid-Diversifizierung in der Phylogenese, der Ontogenese, der Zellaktivierung und der Tumorgenese ist auf organismus- und zelltypspezifische Glykosyltransferase-Genexpressionsprofile zurückzuführen (Varki und J. D. Marth, in: *Seminars in Developmental Biology* 6, 127 (1995)).

[0003] Die interzelluläre Erkennung und Adhäsion ist ein komplexes Phänomen, das für zahlreiche zelluläre Wechselwirkungen, wie z.B. Befruchtung, Zellwanderung, Organbildung und Immunabwehr, verantwortlich ist. Die für diese Abläufe erforderliche hohe Selektivität wird oftmals von Lectinen bereitgestellt, einer Klasse nicht immunogener Proteine, die Kohlenhydrate selektiv und nicht kovalent binden. Typischerweise erkennen und binden Lectine Kohlenhydrate, die mit Proteinen und Lipiden auf der Zelloberfläche der zugehörigen Zelle assoziiert sind. Das CD22-Lectin ist z.B. ein Transmembranglykoprotein, das ausschließlich auf B-Lymphozyten zu finden ist, und es ist bekannt, dass es eine Rolle in der immunologischen Aktivierung dieser Zellen spielt (Campana et al., *J. Immunol.* 134, 1524-1530 (1985); Stamenkovic & Seed, *Nature* 345, 74-77 (1990); Dorken et al., in: *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*, Knapp et al. (Hrsg.), Oxford Univ. Press, Oxford, S. 63-64 (1989)). CD22 wurde in Assoziierung mit dem Antigen-Rezeptor gefunden und ist ein Target für die Tyrosinkinase-Phosphorylierung auf der zytoplasmatischen Domäne, die dadurch verschiedene Signalübertragungsmoleküle anwirbt (Schulte et al., *Science* 258, 1001-1004 (1992); LePrince et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90, 3236-3240 (1993)). Die extrazelluläre Domäne von CD22 bindet spezifisch das Sia6LacNAc-Trisaccharid (Powell et al., *J. Biol. Chem.* 268, 7019-7027 (1993); Sgroi et al., *J. Biol. Chem.* 268, 7011-7018 (1993); Powell & Varki, *J. Biol. Chem.* 269, 10628-10636 (1994)). Dieser Trisaccharid-Ligand existiert auf mehreren Lymphoidzellen. Es wurde von Lymphozyten-Wechselwirkungen berichtet, welche die CD22-Bindung an CD45 umfassen (Stamenkovic et al., *Cell* 66, 1133-1144 (1991)). Da CD22 selbst Sia6LacNAc trägt, wurde von homotypischen Bindungs-Wechselwirkungen gezeigt, dass sie auftreten und in der Immunfunktion eine Steuerungsrolle spielen können (Braesch-Anderson & Stamenkovic, *J. Biol. Chem.* 269, 11783-11786 (1994); Hanasaki et al., *J. Biol. Chem.* 270, 7533-7542 (1995)). Diese Resultate zeigen, dass CD22 und Sia6LacNAc ein Lectin-Ligand-Paar mit dem Potential zur Steuerung von Immunzelloberflächen-Wechselwirkungen sind. Es wurde jedoch aus Analysen von CD22-Null-Mäusen von mehreren Laboratorien kein relativ einfaches Modell für die CD22-Funktion entwickelt (O'Keefe et al., *Science* 274, 798-801 (1996); Otipoby et al., *Nature* 384, 634-637 (1996); Sato et al., *Immunity* 5, 551-562 (1996); Nitschke et al., *Curr. Biol.* 7, 133-143 (1977)). Erhaltene Resultate haben sowohl auf positive als auch auf negative Rollen von CD22 in der B-Lymphozyten-Immunfunktion schließen lassen, was zeigt, dass CD22 Schwellensignalantworten des Antigen-Rezeptor-Komplexes modulieren kann.

[0004] Hanasaki et al., *J. Biol. Chem.*, Band 269, Nr. 14, 10637-10643 (1994), folgern, dass die Aktivierung von Endothelzellen während Entzündungs- und immunologischen Vorgängen α 2,6-Sialyltransferase induzieren kann, die an der Sialylierung anderer aktivierungsabhängiger Moleküle beteiligt sein kann.

[0005] Trotz Fortschritten in der Identifizierung von Lectinen und ihren Kohlenhydrat-Liganden besteht eine Notwendigkeit für die Entdeckung neuer Zusammensetzungen und Verfahren für die Steuerung zellulärer Wechselwirkungen, die mit diesen assoziiert sind. Solche Zusammensetzungen und Verfahren können verwendet werden, um eine Reihe an Verfahren, wie z.B. Immunreaktionen, zu modulieren. Die vorliegende Erfindung befasst sich mit diesen und anderen Notwendigkeiten.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die Erfindung stellt die Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Mittels bereit, das ein Inhibitor einer Sialyltransferase ist, bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Inhibierung der ungeeigneten Aktivierung des Immunsystems bei einer Autoimmunantwort, einer Allotransplantatabstoßungsantwort, einer allergischen Reaktion oder einer Nahrungsmittelüberempfindlichkeit bei einem Säugetier bereit, wobei das Mittel ein Analogon eines Substrats für die Sialyltransferase ist und Mengen an sialyliertem Oligosaccharid, das auf Zellen in dem Säugetier vorhanden ist, reduziert und worin das sialylierte Oligosaccharid eine Formel umfasst, die aus der aus Sia α 2-6Gal- und Sia α 2,3Gal-bestehenden Gruppe ausgewählt ist. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das sialylierte Oligosaccharid Sia α 2-6Gal β 1-4GlcNAc oder Sia α 2,3Gal β 1-3GalNAc. Um eine B-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort zu inhibieren, wird ein Mittel verwendet, das die Menge an Oligosacchariden mit Sia α 2-6Gal-reduziert, und es werden T-Lymphozyten-vermittelte Immunantworten durch die Verabreichung eines Mittels inhibiert, das die Menge an Oligosacchariden mit Sia α 2,3Gal-reduziert.

[0007] Es können auch Verfahren zur Detektion einer Immundefizienz oder anderer Immunsystemstörungen bei einem Säugetier verwendet werden. Diese Verfahren umfassen das Kontaktieren einer Probe des Säugetiers, wobei die Proben typischerweise Lymphoidzellen enthalten, mit einem Nachweismittel, das spezifisch an ein sialyliertes Oligosaccharid bindet. Die sialylierten Oligosaccharide von Interesse umfassen allgemein die Formel Sia α 2-6Gal- oder Sia α 2,3Gal-. Ein beträchtliches Fehlen der Bindung des Nachweismittels an den Lymphozyten deutet auf Immundefizienz hin.

[0008] Ebenso können Verfahren zur Detektion von Immundefizienz oder anderer Immunsystemerkrankungen bei einem Säugetier durch das Detektieren der Gegenwart oder des Fehlens von ST6Gal- oder ST3Gal-I-Sialyltransferaseaktivität in einer Probe verwendet werden, die von dem Säugetier erhalten wurde. Ein beträchtliches Fehlen von ST6Gal- oder ST3Gal-I-Sialyltransferaseaktivität deutet auf Immundefizienz hin.

[0009] Es können Säugetierzellen verwendet werden, die ein Genom besitzen, das eine deaktivierende Mutation in einem Gen aufweist, das für eine Sialyltransferase kodiert. Die Mutation kann eine oder mehrere einer von Deletion, einer Nichtsinnmutation, einer Insertion und einer Fehlsinnmutation umfassen. Die deaktivierende Mutation kann in einer kodierenden Region oder in einer Regulationsregion eines Gens vorhanden sein, das in einer nicht mutierten Form für eine Sialyltransferase kodiert.

[0010] Es werden auch chimäre, nicht menschliche Säugetiere bereitgestellt, die Zellen aufweisen, in denen die Genome eine deaktivierende Mutation in einem Gen enthalten, das für eine Sialyltransferase kodiert. Es sind chimäre Säugetiere inkludiert, in denen weniger als alle Zellen das deaktivierte Gen besitzen, sowie transgene säugetiere, in denen alle Zellen das deaktivierte Gen umfassen.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0011] **Fig. 1A** zeigt ein schematisches Diagramm der genomischen ST6Gal-Struktur und der Konstruktion von ST6Gal-Mutanten. Eine partielle genomische ST6Gal-Struktur (ST6Gal^{wt}) wurde kloniert und mit pflox für die Konstruktion eines Targeting-Vektors (fettgedruckte Linie), rekombiniert am ST6Gal-Locus-(ST6Gal^{F^[tkneo]}-) Locus im ES-Zellklon 4.8 dargestellt, verwendet. Nach der Cre-Rekombinase-Expression und der Ganciclovir-Selektion wurden ES-Zellen-Subklone B3 und B9, enthaltend das ST6Gal^F- bzw. das ST6Gal^Δ-Allel, isoliert und für die Erzeugung chimärer Mäuse verwendet.

[0012] **Fig. 1B** zeigt genomische Southern-Blots der ST6Gal-Allelstruktur bei Wildtyp-(wt)-ES-Zellen, ES-Zellklon 4.8, auf den abgezielt wird (ST6Gal^{F^[tkneo]}-), 4.8-ES-Zell-Subklon B3 (ST6Gal^F) und 4.8-ES-Zell-Subklons B9 (ST6Gal^Δ) unter Verwendung von entweder einer genomischen Sonde außerhalb des Targeting-Vektors (links) oder einer loxP-Sonde (Mitte). Rechts ist eine genomische Southern-Blot-Analyse von Nachkommen zu sehen, die aus Paarungen von Mäusen stammt, die für das ST6Gal^Δ-Allel heterozygot sind. Genotypen umfassen die Gegenwart von Mäusen, die für die Exon-2-Deletion (ST6Gal^Δ) homozygot sind.

[0013] **Fig. 1C** stellt fluoreszenzaktivierte Zellsortierungs-(FACS-)Analysen unter Verwendung von SNA- und CD22-Ig-Lectinen bereit, was zeigt, dass CD3⁺- und B220⁺-Milzlymphozyten im Vergleich zu myeloischen GR-1⁺- und erythroiden Ter-119⁺-Zellen spezifisch hohe Mengen an Sia6LacNAc exprimieren. Lymphozyten aus Mäusen, die für das von B9 abstammende ST6Gal^Δ-Allel homozygot waren, waren bezüglich Sia6LacNAc (n = 7) defizient. α 2,3-gebundene Sialinsäuren wurden unter Verwendung des MAL-II-Lectins detektiert, und es wurde herausgefunden, dass sie in geringen Mengen normal und unverändert unter Zellen von Mäusen exprimiert wurden, die für das ST6Gal^Δ-Allel homozygot waren (n = 7). Mäuse, die für das von B3 abstammende

ST6Gal^F-Allel homozygot waren, zeigten in diesen auf Lectin basierenden Analysen Wildtyp-Profile. Ähnliche Resultate wurden mit mesenterialen, von Lymphknoten abstammenden Lymphozyten erhalten. Es wird die Fluoreszenzsignalintensität unter Verwendung eines Anti-Mensch-IgG-FITC-Konjugats gezeigt (2° und gepunktete Linie, links unten).

[0014] Die [Fig. 2A–Fig. 2C](#) zeigen die B-Lymphozyten-Charakterisierung und Serum-Immunglobulin-Analysen. [Fig. 2A](#) (linkes Feld) zeigt eine Analyse von Knochenmark-Lymphozyten zur Zelloberflächen-Expression von IgM, CD24 (HSA), CD43 (S7) und B220 mittels Durchflusszytometrie. Es wurden keine Abweichungen bei ST6Gal-defizienten Mäusen unter den Prozentsätzen (in Klammern dargestellt) von Pro-B-Zellen (B220^{lo} CD43(S7)⁺, Gate a (Hardy et al., J Exp. Med. 173, 1213–1225 (1991))), Prä-B-Zellen (B220^{lo} HSA^{hi}, Gate b (Carsetti et al., J. Exp. Med. 181, 2129–2140 (1995))), unreifen B-Zellen (B220^{lo} IgM^{int}, Gates b und c (Carsetti et al., s.o.)), Übergangs-B-Zellen (B220^{lo-hi} IgM^{hi}, Gate d (Carsetti et al., s.o.)) und reifen B-Zellen (B220^{hi} IgM^{int} Gate e, und B220^{hi} HSA^{lo}, Gate f (Carsetti et al., s.o.)) beobachtet. Die gezeigten Prozentsätze stellen den Mittelwert von vier verschiedenen Analysen mit berechnetem Student-t-Test, $P > 4$ für alle genotypischen Vergleiche, dar und geben keine signifikanten Variationen an. [Fig. 2A](#) (rechtes Feld) zeigt, dass ST6Gal-defiziente Milz-B-Zellen Reduktionen bezüglich Zelloberflächen-CD22 und -IgM zeigten, jedoch nicht bezüglich HSA. Es wurde herausgefunden, dass Reduktionen bezüglich der Zelloberflächen-IgM-Mengen bei 65 ± 20 % der Kontrollen lagen (Student-t-Test; $P < 0,001$) und dass die CD22-Mengen bei 38 ± 9 % der Kontrollen lagen ($P < 0,001$), wie durch Vergleiche der Peak-Fluoreszenz bestimmt wurde ($n = 8$).

[0015] [Fig. 2B](#) zeigt, dass Sia6LacNAc-defiziente Milz-B-Zellen normale Mengen an Aktivierungsmarkern (CD44, B7.2 und I-A^b) und CD40 exprimierten. Gepunktete Linien stellen die Fluoreszenz von Zellen dar, die unter Verwendung eines Isotyp-Kontroll-Antikörpers gefärbt wurden ($n = 8$).

[0016] [Fig. 2C](#) stellt die Messungen an Serum-Ig-Spiegeln bei 4–6 Monate alten, nicht immunisierten Wurfgeschwistern angegebener Genotypen dar. Die mittleren Ig-Werte werden als horizontale Linien dargestellt. Genotypen von 4–6 Monate alten Mäusen werden auf der x-Achse dargestellt. Punkte stellen Messungen von einzelnen und verschiedenen Tieren dar. Die Resultate zeigten eine 63%-Reduktion ($P > 0,001$) bei zirkulierendem IgM sowie keine statistisch signifikante Reduktion von IgA oder IgG.

[0017] Die [Fig. 3A–3C](#) zeigen, dass die B-Zellen-Aktivierungsantworten bei Mäusen abgeschwächt sind, die bezüglich der ST6Gal-Funktion defizient sind. In [Fig. 3A](#) wurden B-Lymphozyten isoliert und mittels LPS oder durch Vernetzen von IgM oder CD40 in Abwesenheit oder Gegenwart von IL-4 stimuliert. Es wurde in allen Experimenten bei Abwesenheit von IL-4 eine verringerte Proliferation von Sia6LacNAc-defizienten B-Zellen beobachtet. Die wie angegeben durchgeführte Zugabe von IL-4 rettete die defekte Proliferationsantwort auf die IgM- und CD40-Ligation. Die Proliferation wird als Dreifach-Messung der [³H]Thymidin-Inkorporation dargestellt, wobei Mittelwert und SD angezeigt werden. Die gezeigten Resultate sind für drei verschiedene Experimente repräsentativ ($P < 0,005$ für IgM-Vernetzung, $P < 0,025$ für CD40-Vernetzung und $P < 0,001$ für LPS-Stimulierung). [Fig. 3B](#) zeigt eine Analyse der Ca²⁺-Mobilisierung von B-Lymphozyten als Reaktion auf die IgM-Vernetzung (Pfeil). Sia6LacNAc-defiziente B-Zellen zeigten eine Reduktion der Menge der zytosolischen Ca²⁺-Immobilisierung (63 ± 4 % des Kontrollwerts, $P < 0,01$, $n = 4$). [Fig. 3C](#) zeigt, dass die Phosphotyrosin-Akkumulation nach der IgM-Vernetzung bei Sia6LacNAc-defizienten B-Lymphozyten verändert wird. Milz-B-Lymphozyten wurden isoliert und mit Anti-IgM-Antikörper stimuliert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Zellen lysiert, und Extrakte wurden anschließend mittels SDS/PAGE und Immunblotting mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ($n = 6$) analysiert. Positionen von Proteinen, die dauerhaft veränderte Mengen von Phosphotyrosin aufweisen, sind mit einem Sternchen dargestellt.

[0018] Die [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) zeigen, dass die Antikörper-Produktion nach der Immunisierung von Sia6LacNAc-defizienten Mäusen defizient ist. [Fig. 4A](#) zeigt Resultate, die erhalten wurden, als die T-unabhängige Antigen-Immunisierung (10 µg DNP-Ficoll) zu angegebenen Zeiten von einer Analyse von Anti-DNP-Antikörper-Mengen in Sera gefolgt wurde. [Fig. 4B](#) zeigt Resultate, die nach der T-abhängigen Antigen-(DNP-KLH)-Immunisierung (10 µg und 100 µg) erhalten wurden. Anti-DNP-Antikörper-Mengen wurden vor und nach einer zweiten Booster-Immunisierung gemessen (Pfeil). Mehrfache Sera-Verdünnungen wurden getestet, um den linearen Antwortbereich mittels OD₄₀₅-Messungen zu finden. Die Sera-Verdünnungsfaktoren für die dargestellten Resultate sind Folgende: IgM (1/200), IgG₁ gegen T-unabhängiges Antigen (1/200), IgG₃ gegen T-unabhängiges Antigen (1/800), IgG₁ gegen T-abhängiges Antigen (1/1.000) und IgG₃ gegen T-abhängiges Antigen (1/200). Die Daten werten als der Mittelwert \pm SEM von drei Mäusen der angegebenen Genotypen dargestellt. Die Verwendung von 0,1 µg DNA-Ficoll bei Immunisierungen führte zum Fehlen der Anti-DNA-Antikörperproduktion, besonders bei ST6Gal-defizienten Mäusen, wobei bei Wildtyp-Mäusen geringe Mengen an Anti-DNA-Antikörpern beobachtet wurden.

[0019] Die **Fig. 5A–5C** zeigen ein schematisches Diagramm der ST3Gal-I-Genstruktur und der Konstruktion von ST3Gal-I-Mutanten. **Fig. 5A** zeigt die Struktur des Wildtyp-Maus-ST3Gal-I-Gens, wie es auf dem genomischen Klon 129 Sv/J zu finden ist, sowie das pflox-Konstrukt, das verwendet wurde, um einen Targeting-Vektor herzustellen, wie in **Fig. 5B** dargestellt. Nach der homologen Rekombination mit dem ST3Gal-I^{wt}-Locus in Maus-ES-Zellen wurden, wie in **Fig. 5B** dargestellt, ES-Zellen erhalten, die für das ST3Gal-I-^{F[tkneo]}-Konstrukt heterozygot waren. Eine Cre-vermittelte Rekombination mit Ganciclovir-Selektion führte zu zwei Typen von Deletionen, wie in **Fig. 5C** dargestellt, der ST3Gal-I-Deletion, die aus einer Typ-1-Deletion resultiert, fehlt Exon 2 auf dem ST3Gal-I-Gen, und dem ST3Gal-I^F-Konstrukt, das aus einer Typ-2-Deletion resultiert.

[0020] **Fig. 6** zeigt die Wirkung eines Verlusts der ST3Gal-I-Aktivität auf periphere CD8⁺-T-Zellen. Proben, die aus der Milz, den Lymphknoten und dem Blut von Tieren erhalten wurden, die für die Wildtyp-ST3Gal-I-Loci homozygot sind (obere Reihe), sowie von Tieren, die für eine Exon-2-Deletion im ST3Gal-I-Locus homozygot sind, wurden auf die Gegenwart von CD4 und CD8 getestet. Wie in der **Fig.** dargestellt, wurden die Anzahlen an CD8⁺-T-Zellen in Proben, die von Tieren mit der ST3Gal-I-Deletion erhalten wurden, dramatisch reduziert.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN Definitionen

[0021] Es werden hierin die folgenden Abkürzungen verwendet:

Ara	= Arabinosyl;
Fru	= Fructosyl;
Fuc	= Fucosyl;
Gal	= Galactosyl;
GalNAc	= N-Acetylgalacto;
Glc	= Glucosyl;
GlcNAc	= N-Acetylgluco;
Man	= Mannosyl; und
NeuAc	= Sialyl (N-Acetylneuraminy).

[0022] Von Oligosacchariden wird angenommen, dass sie ein reduzierendes Ende und ein nichtreduzierendes Ende aufweisen, egal, ob das Saccharid am reduzierenden Ende tatsächlich ein reduzierender Zucker ist oder nicht. In Einklang mit der anerkannten Nomenklatur werden Oligosaccharide hierin mit dem nichtreduzierenden Ende links und dem reduzierenden Ende rechts dargestellt.

[0023] Alle hierin beschriebenen Oligosaccharide werden mit dem Namen oder der Abkürzung für das nicht-reduzierende Saccharid beschrieben (z.B. Gal), gefolgt von der Konfiguration der Glykosidbindung (α oder β), der Ringbindung, der Ringposition des reduzierenden Saccharids, das in die Bindung involviert ist, sowie anschließend dem Namen oder der Abkürzung des reduzierenden Saccharids (z.B. GlcNAc). Die Bindung zwischen zwei Zuckern kann z.B. als 2,3, 2→3 oder (2,3) ausgedrückt werden. Jedes Saccharid ist eine Pyranose.

[0024] Vieles der Nomenklatur und der allgemeinen Laborverfahren, die in dieser Anwendung erforderlich sind, sind in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Band 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989), zu finden. Auf das Handbuch wird hierin im Folgenden als „Sambrook et al.“ verwiesen.

[0025] Der Ausdruck „Nucleinsäure“ bezieht sich auf ein Desoxyribonucleotid- oder Ribonucleotid-Polymer, entweder in einzel- oder in doppelsträngiger Form, und umfasst, falls nicht anders angegeben, bekannte Analoga natürlicher Nucleotide, die an Nucleinsäuren auf eine ähnliche Art und Weise hybridisieren wie natürlich auftretende Nucleotide. Falls nicht anders angegeben, umfasst eine bestimmte Nucleinsäuresequenz die komplementäre Sequenz davon.

[0026] Eine „inhibierende Nucleinsäure“ ist eine beliebige Nucleinsäure oder modifizierte Nucleinsäure, die zur Verwendung in der inhibierenden Nucleinsäure-Therapie verwendet oder kreiert wird. Die „inhibierende Nucleinsäure-Therapie“ bezieht sich auf die Verwendung inhibierender Nucleinsäuren zur Inhibierung der Genexpression, z.B. die Inhibierung der DNA-Transkription, die Inhibierung von RNA-Verarbeitung, -Transport oder -Translation oder die Inhibierung der Proteinsynthese. Die inhibierende Nucleinsäure-Therapie umfasst die Reihe von Ansätzen zur Behandlung von Krankheiten unter Verwendung von Nucleinsäuren oder modifizierten Nucleinsäuren, wie hierin beschrieben. Verschiedene inhibierende Nucleinsäure-Therapien werden unten stehend ausführlich beschrieben.

[0027] Der Ausdruck „operabel gebunden“ bezieht sich auf die funktionale Bindung zwischen einer Nucleinsäure-Expressionskontrollsequenz (wie z.B. einem Promotor, einer Signalsequenz oder einer Anordnung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen) und einer zweiten Nucleinsäuresequenz, worin die Expressionskontrollsequenz die Transkription und/oder die Translation der Nucleinsäure beeinflusst, die der zweiten Sequenz entspricht.

[0028] Der Ausdruck „rekombinant“ gibt bei Verwendung mit Verweis auf eine Zelle an, dass die Zelle eine heterologe Nucleinsäure repliziert oder ein Peptid oder Protein exprimiert, das von einer heterologen Nucleinsäure kodiert wird. Rekombinante Zellen können Gene enthalten, die nicht in der nativen (nicht rekombinanten) Form der Zelle zu finden sind. Rekombinante Zellen können auch Gene enthalten, die in der nativen Form der Zelle zu finden sind, worin die Gene modifiziert und mittels künstlicher Mittel erneut in die Zelle eingeführt werden. Der Ausdruck umfasst auch Zellen, die eine Nucleinsäure enthalten, die zu der Zelle, die ohne Entfernen der Nucleinsäure aus der Zelle modifiziert wurde, endogen ist; solche Modifikationen umfassen jene, die mittels Gensatz, ortsspezifischer Mutation und ähnlichen Verfahren erhalten wurden.

[0029] Eine „heterologe Sequenz“ oder eine „heterologe Nucleinsäure“ ist, wie hierin verwendet, eine, die ursprünglich von einer Quelle stammt, die zu der spezifischen Wirtszelle fremd ist, oder die, falls sie von derselben Quelle stammt, ausgehend von ihrer ursprünglichen Form modifiziert ist.

[0030] Eine „Subsequenz“ bezieht sich auf eine Sequenz an Nucleinsäuren oder Aminosäuren, die einen Teil einer längeren Sequenz an Nucleinsäuren bzw. Aminosäuren (z.B. Polypeptid) umfassen.

[0031] Eine „rekombinante Expressionskassette“ oder einfach eine „Expressionskassette“ ist ein Nucleinsäurekonstrukt, rekombinant oder synthetisch hergestellt, mit Nucleinsäureelementen, die in der Lage sind, die Expression eines Strukturgens in Wirten zu beeinflussen, die mit solchen Sequenzen kompatibel sind. Expressionskassetten umfassen zumindest Promotoren und gegebenenfalls Transkriptionsterminationssignale. Typischerweise umfasst die rekombinante Expressionskassette eine zu transkribierende Nucleinsäure (z.B. eine Nucleinsäure, die für ein gewünschtes Polypeptid kodiert) und einen Promotor. Es können, wie hierin beschrieben, auch zusätzliche Faktoren verwendet werden, die für die Durchführung der Expression notwendig oder hilfreich sind. Eine Expressionskassette kann z.B. auch Nucleotidsequenzen umfassen, die für eine Signalsequenz kodieren, welche die Sekretion eines exprimierten Proteins aus der Wirtszelle steuert. Transkriptionsterminationssignale, Enhancer und andere Nucleinsäuresequenzen, welche die Genexpression beeinflussen, können auch in einer Expressionskassette inkludiert sein.

[0032] Der Ausdruck „isoliert“ soll sich auf Material beziehen, das im Wesentlichen oder in hohem Maße frei von Komponenten ist, die das Enzym normalerweise begleiten, wie es nativen Zustand zu finden ist. Daher umfassen die Enzyme der Erfindung keine Materialien, die normalerweise mit ihrer In-situ-Entwicklung assoziiert sind. Typischerweise sind isolierte Proteine der Erfindung zumindest etwa 80 % rein, normalerweise zumindest etwa 90 % und vorzugsweise zumindest etwa 95 % rein, wie mittels Bandenintensität auf einem silber gefärbten Gel oder mittels eines anderen Verfahrens zur Bestimmung der Reinheit gemessen wird. Die Proteinreinheit oder -Homogenität kann durch eine Reihe an Verfahren angegeben werden, die nach dem Stand der Technik wohlbekannt sind, wie z.B. Polyacrylamidgelelektrophorese einer Proteinprobe, gefolgt von einer Sichtbarmachung nach dem Färben. Für gewisse Zwecke ist eine hohe Auflösung notwendig, und es wird eine HPLC oder ein ähnliches Verfahren für die Reinigung verwendet.

[0033] Die Ausdrücke „identisch“ oder Prozent-„Identität“ beziehen sich im Kontext von zwei oder mehr Nucleinsäuren oder Polypeptidsequenzen auf zwei oder mehr Sequenzen oder Subsequenzen, die dieselben sind oder die bei Vergleich und Anordnung zur maximalen Übereinstimmung einen spezifischen Prozentsatz an Aminosäureresten oder Nucleotiden aufweisen, die dieselben sind, wie unter Verwendung eines der folgenden Sequenzvergleichsalgorithmen oder mittels Sichtprüfung gemessen wird.

[0034] Der Ausdruck „im Wesentlichen identisch“ bezieht sich im Kontext von zwei Nucleinsäuren oder Polypeptiden auf zwei oder mehr Sequenzen oder Subsequenzen, die bei Vergleich und Anordnung zur maximalen Übereinstimmung zumindest 70 %, vorzugsweise 80 % und insbesondere 90–95 %, Nucleotid- oder Aminosäure-Restidentität aufweisen, wie unter Verwendung eines der folgenden Sequenzvergleichsalgorithmen oder mittels Sichtprüfung gemessen wird. Vorzugsweise erstreckt sich die im Wesentlichen bestehende Identität über eine Region der Sequenzen, die zumindest etwa 50 Reste lang ist, noch bevorzugter über eine Region mit zumindest etwa 100 Resten, und insbesondere sind die Sequenzen über zumindest etwa 150 Reste im Wesentlichen identisch. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform sind die Sequenzen über die gesamte Länge der kodierenden Regionen im Wesentlichen identisch.

[0035] Für den Sequenzvergleich fungiert eine Sequenz typischerweise als eine Bezugssequenz, mit der Testsequenzen verglichen werden. Bei der Verwendung eines Sequenzvergleichsalgorithmus werden Test- und Bezugssequenzen in einen Computer eingelesen, es werden, falls notwendig, Subsequenzkoordinaten bestimmt, und anschließend werden Sequenzalgorithmus-Programmparameter bestimmt. Der Sequenzvergleichsalgorithmus berechnet schließlich basierend auf den bestimmten Programmparametern den Prozentsatz der Sequenzidentität für die Testsequenz(en) im Vergleich zu der Bezugssequenz.

[0036] Die optimale Anordnung von Sequenzen zum Vergleich kann z.B. durch den lokalen Homologie-Algorithmus von Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2, 482 (1981), durch den Homologie-Anordnungsalgorithmus von Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 443 (1970), durch das Verfahren der Suche nach Ähnlichkeiten von Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85, 2444 (1988), durch computerisierte Umsetzungen dieser Algorithmen (GAP, BESTFIT, FASTA und TFASTA im Wisconsin-Genetics-Software-Paket, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) oder durch Sichtprüfung (siehe allgemein Ausubel et al., s.o.) durchgeführt werden.

[0037] Ein Beispiel eines nützlichen Algorithmus ist PILEUP. PILEUP schafft eine mehrfache Sequenzanordnung aus einer Gruppe verwandter Sequenzen unter Verwendung progressiver, paarweise angeordneter Anordnungen, um die Beziehung und den Prozentsatz der Sequenzidentität zu zeigen. Es zeichnet ebenfalls eine Baumstruktur oder ein Dendrogramm, die/das die zur Herstellung der Anordnung verwendeten Clusterbildungs-Beziehungen zeigt. PILEUP verwendet eine Vereinfachung des Verfahrens der progressiven Anordnung von Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35, 351–360 (1987). Das verwendete Verfahren ähnelt dem von Higgins & Sharp, *CABIOS* 5, 151–153 (1989), beschriebenen Verfahren. Das Programm kann bis zu 300 Sequenzen anordnen, jede mit einer Maximallänge von 5.000 Nucleotiden oder Aminosäuren. Das multiple Anordnungsverfahren beginnt mit der paarweisen Anordnung der zwei Sequenzen mit der größten Ähnlichkeit, wodurch ein Cluster von zwei angeordneten Sequenzen produziert wird. Dieser Cluster wird anschließend an die am nächststärksten verwandte Sequenz oder den Cluster an angeordneten Sequenzen angeordnet. Zwei Cluster an Sequenzen werden durch eine einfache Extension der paarweisen Anordnung zwei einzelner Sequenzen angeordnet. Die finale Anordnung wird durch eine Reihe progressiver, paarweiser Anordnungen erreicht. Das Programm wird durch das Bestimmung spezifischer Sequenzen und ihrer Aminosäure- oder Nucleotidkoordinaten für Regionen des Sequenzvergleichs und durch das Bestimmung der Programmparameter laufen gelassen. Eine Bezugssequenz kann z.B. mit anderen Testsequenzen verglichen werden, um den Prozentsatz der Sequenzidentitätsbeziehung unter Verwendung der folgenden Parameter zu bestimmen: default gap weight (3,00), default gap length weight (0,10) sowie weighted end gaps.

[0038] Ein weiteres Beispiel eines Algorithmus, der zum Bestimmen des Prozentsatzes der Sequenzidentität und der Sequenzähnlichkeit geeignet ist, ist der BLAST-Algorithmus, der in Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403–410 (1990), beschrieben wird. Software zum Durchführen von BLAST-Analysen ist öffentlich durch das National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) erhältlich. Dieser Algorithmus umfasst zuerst das Identifizieren von Sequenzpaaren mit hohem Score (HSPs) durch das Identifizieren kurzer Worte („short words“) der Länge W in der Abfragesequenz, die bei Anordnung mit einem Wort derselben Länge in einer Datenbanksequenz entweder mit manchen positiv bewerteten Schwellen-Score-T-Werten übereinstimmen oder diesen gerecht werden. T wird als die Nachbar-Wort-Score-Schwelle („neighborhood Word score threshold“) bezeichnet (Altschul et al., s.o.). Diese anfänglichen Nachbar-Wort-Hits dienen als Startpunkte für beginnende Suchen, um längere HSPs, die diese enthalten, zu finden. Anschließend werden die Wort-Hits in beide Richtungen entlang jeder Sequenz erstreckt, und zwar so weit, wie der kumulative Anordnungsscore erhöht werden kann. Kumulative Scores werden für Nucleotidsequenzen unter Verwendung der Parameter M (Belohnungsscore für ein Paar von übereinstimmenden Resten; immer > 0) und N (Straf-Score für fehlgepaarte Reste; immer < 0) berechnet. Für Aminosäuresequenzen wird eine Scoring-Matrix verwendet, um den kumulativen Score zu berechnen. Die Extension der Wort-Hits in jeder Richtung wird unterbrochen, wenn: der kumulative Anordnungsscore um die Menge X von seinem erreichten Maximalwert abfällt; der kumulative Score auf Null oder darunter zurückgeht aufgrund der Akkumulierung einer oder mehrerer negativ-corender Restanordnungen; oder das Ende beider Sequenzen erreicht ist. Die BLAST-Algorithmus-Parameter W, T und X bestimmen die Empfindlichkeit und die Schnelligkeit der Anordnung. Das BLASTN-Programm (für Nucleotidsequenzen) verwendet als Standardwerte eine Wortlänge (W) von 11, eine Erwartung (E) von 10, M = 5, N = -4 und einen Vergleich beider Stränge. Für Aminosäuresequenzen verwendet das BLASTP-Programm als Standardwerte eine Wortlänge (W) von 3, eine Erwartung (E) von 10 und die BLOSUM62-Scoring-Matrix (siehe Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915 (1989)).

[0039] Zusätzlich zu der Berechnung des Prozentsatzes der Sequenzidentität führt der BLAST-Algorithmus auch eine statistische Analyse der Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen durch (siehe z.B. Karlin & Altschul,

Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90, 5873–5787 (1993)). Ein Maß der Ähnlichkeit, das vom BLAST-Algorithmus bereitgestellt wird, ist die Wahrscheinlichkeit der kleinsten Summe ($P(N)$), die einen Hinweis auf die Wahrscheinlichkeit gibt, mit der eine Übereinstimmung zwischen zwei Nucleotid- oder Aminosäuresequenzen zufällig auftreten würde. Eine Nucleinsäure wird z.B. als ähnlich zu einer Bezugssequenz angesehen, wenn die Wahrscheinlichkeit der kleinsten Summe in einem Vergleich der Test-Nucleinsäure mit der Bezugs-Nucleinsäure geringer als etwa 0,1, noch bevorzugter weniger als etwa 0,01 und insbesondere weniger als etwa 0,001, ist.

[0040] Ein weiteres Anzeichen dafür, dass zwei Nucleinsäuresequenzen oder Polypeptide im Wesentlichen identisch sind, ist, dass das Polypeptid, das von der ersten Nucleinsäure kodiert wird, immunologisch kreuzreaktiv mit dem Polypeptid ist, das von der zweiten Nucleinsäure kodiert wird, wie unten stehend beschrieben. Daher ist ein Polypeptid typischerweise mit einem zweiten Polypeptid im Wesentlichen identisch, wenn sich z.B. die zwei Peptide nur durch konservative Substitutionen unterscheiden. Ein anderes Anzeichen dafür, dass zwei Nucleinsäuresequenzen im Wesentlichen identisch sind, ist, dass die beiden Moleküle, wie unten stehend beschrieben, unter stringenten Bedingungen aneinander hybridisieren.

[0041] „Bindet/binden im Wesentlichen an“ bezieht sich im Kontext von Nucleinsäuren auf die komplementäre Hybridisierung zwischen einer Sonden-Nucleinsäure und einer Target-Nucleinsäure und umfasst geringe Fehlpaarungen, die durch Reduzieren der Stringenz des Hybridisierungsmediums untergebracht werden können, um die gewünschte Detektion der Target-Polynucleotidsequenz zu erreichen.

[0042] Der Ausdruck „hybridisiert spezifisch an“ bezieht sich auf die Bindung, Duplexierung oder Hybridisierung eines Moleküls, und zwar nur an eine bestimmte Nucleotidsequenz unter stringenten Bedingungen, wenn diese Sequenz in einem komplexen Gemisch von (z.B. vollständiger zellulärer) DNA oder RNA vorhanden ist. Der Ausdruck „stringente Bedingungen“ bezieht sich auf Bedingungen, bei denen eine Sonde an ihre Target-Subsequenz hybridisiert, jedoch an keine andere Sequenzen. Stringente Bedingungen sind sequenzabhängig und variieren in Abhängigkeit der Umstände. Längere Sequenzen hybridisieren besonders bei höheren Temperaturen. Allgemein werden stringente Bedingungen so ausgewählt, dass sie etwa 50°C niedriger sind als der thermische Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer/einem definierten Ionenstärke und pH. Der T_m ist die Temperatur (bei definierter m Ionenstärke, pH und Nucleinsäurekonzentration), im der 50 % der Sonden, die komplementär zu der Target-Sequenz sind, bei Gleichgewicht an die Targetsequenz hybridisieren (da die Target-Sequenzen beim T_m allgemein im Überschuss vorhanden sind, sind 50 % der Sonden bei Gleichgewicht besetzt). Typischerweise sind stringente Bedingungen jene, bei denen die Salzkonzentration geringer ist als etwa 1,0 M Na-Ionen, typischerweise etwa 0,01 bis 1,0 M Na-Ionenkonzentration (oder andere Salze), bei einem pH von 7,0 bis 8,3 und die Temperatur zumindest etwa 30°C bei kurzen Sonden (z.B. 10 bis 50 Nucleotiden) und zumindest etwa 60°C bei langen Sonden (z.B. mehr als 50 Nucleotide) beträgt. Stringente Bedingungen können auch mit der Zugabe von destabilisierenden Mitteln, wie z.B. Formamid, erreicht werden.

[0043] Die Ausdrücke „bindet spezifisch an ein Protein“ oder „spezifisch immunreaktiv mit“ beziehen sich bei Verweis auf einen Antikörper auf eine Bindungsreaktion, welche die Gegenwart des Proteins in der Gegenwart einer heterogenen Population an Proteinen und anderen biologischen Materialien bestimmt. Daher binden die spezifizierten Antikörper unter den genannten Immuntestbedingungen vorzugsweise an ein bestimmtes Protein und binden nicht in signifikanter Menge an andere Proteine, die in der Probe vorhanden sind. Die spezifische Bindung an ein Protein bei solchen Bedingungen erfordert einen Antikörper, der aufgrund seiner Spezifität für ein bestimmtes Protein ausgewählt wurde. Es kann eine Reihe an Immuntest-Formaten verwendet werden, um Antikörper auszuwählen, die spezifisch mit einem bestimmten Protein immunreaktiv sind. Festphasen-ELISA-Immuntests werden z.B. routinemäßig verwendet, um monoklonale Antikörper zu selektieren, die spezifisch mit einem Protein immunreaktiv sind. Siehe Harlow und Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988), für eine Beschreibung von Immuntest-Formaten und Bedingungen, die verwendet werden können, um eine spezifische Immunreaktivität zu bestimmen.

[0044] Eine „konservative Substitution“ bezieht sich bei der Beschreibung eines Proteins auf eine Veränderung der Aminosäurezusammensetzung des Proteins, die die Aktivität des Proteins im Wesentlichen nicht verändert. Daher beziehen sich „konservativ modifizierte Variationen“ einer bestimmten Aminosäuresequenz auf Aminosäuresubstitutionen jener Aminosäuren, die für die Proteinaktivität oder die Substitution von Aminosäuren mit anderen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (z.B. sauer, basisch, positiv oder negativ geladen, polar oder nicht polar etc.) nicht entscheidend sind, so dass die Substitutionen von sogar entscheidenden Aminosäuren die Aktivität nicht wesentlich verändern. Tabellen mit konservativen Substitutionen, die funktionell ähnliche Aminosäuren bereitstellen, sind nach dem Stand der Technik wohlbekannt. Die folgenden sechs Gruppen enthalten jeweils Aminosäuren, die füreinander konservative Substitutionen darstellen:

- 1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T);
- 2) Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E);
- 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);
- 4) Arginin (R), Lysin (K);
- 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V); und
- 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W).

[0045] Siehe auch Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984). Zusätzlich dazu sind auch einzelne Substitutionen, Deletionen oder Additionen, die eine einzelne Aminosäure oder einen kleinen Prozentsatz an Aminosäuren in einer kodierten Sequenz verändern, hinzufügen oder deletieren, „konservativ modifizierte Variationen“.

[0046] Der Ausdruck „Sialinsäure“ bezieht sich auf ein beliebiges Mitglied einer Familie von Neun-Kohlenstoff-carboxylierten Zuckern. Das am häufigsten vorkommende Mitglied der Familie der Sialinsäure ist N-Acetylneuraminsäure (2-Keto-5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero-D-galactononulopyranos-1-onsäure) (oft als Neu5Ac, NeuAc oder NANA abgekürzt). Ein zweites Mitglied der Familie ist N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc oder NeuGc), in der die N-Acetylgruppe von NeuAc hydroxyliert ist. Ein drittes Familienmitglied der Sialinsäure ist 2-Keto-3-desoxynonulosonsäure (KDN) (Nadano et al., J. Biol. Chem. 261, 11550–11557 (1986); Kanamori et al., J. Biol. Chem. 265, 21811–21819 (1990)). Es sind auch 9-substituierte Sialinsäuren, wie z.B. 9-O-C1-C6-Acyl-Neu5Ac wie 9-O-Lactyl-Neu5Ac oder 9-O-Acetyl-Neu5Ac, 9-Desoxy-9-fluor-Neu5Ac und 9-Azido-9-desoxy-Neu5Ac, inkludiert. Für einen Bericht über die Sialinsäure-Familie siehe z.B. Varki, Glycobiology 2, 25–40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer (Hrsg.), Springer-Verlag, New York (1992). Die Synthese und Verwendung von Sialinsäureverbindungen in einem Sialylierungsverfahren wird in der am 1. Oktober 1992 veröffentlichten internationalen Anmeldung WO 92/16640 offenbart.

[0047] Der Ausdruck „transgen“ bezieht sich auf eine Zelle, die eine spezifische genetische Modifikation umfasst, die in die Zelle oder einen Vorfahren der Zelle eingeführt wurde. Solche Modifikationen können eine oder mehrere Punktmutationen, Deletionen, Insertionen oder Kombinationen davon umfassen. Bei Verweis auf ein Tier bedeutet der Ausdruck „transgen“, dass das Tier Zellen umfasst, die transgen sind, sowie Nachkommen solcher Tiere. Ein Tier, das sowohl aus transgenen als auch aus nicht transgenen Zellen besteht, wird hierin als ein „chimäres“ Tier bezeichnet.

Ausführliche Beschreibung

[0048] Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung von Mitteln in der Herstellung von Arzneimitteln zur Inhibierung von Immunantworten bereit, die teilweise durch 2,6-Sialylgalactoside und 2,3-Sialylgalactoside vermittelt werden. Diese Sialylgalactoside sind Liganden für Zelloberflächenmoleküle, die in die interzelluläre Adhäsion und Signalübertragung involviert sind, wie z.B. CD22. Die 2,6-Sialylgalactoside sind typischerweise in die Modulation von Immunantworten involviert, die durch B-Zellen vermittelt werden, während die 2,3-Sialylgalactoside allgemein in T-Zellen-vermittelte Immunantworten involviert sind.

[0049] Verfahren und Zusammensetzungen zur Inhibierung von Immunantworten, die durch B-Lymphozyten vermittelt werden, können ebenfalls verwendet werden. Solche Verfahren können das Stören der Synthese von Sia α 2,6Gal-enthaltenden Oligosacchariden umfassen, wie z.B. Sia α 2,6Gal β 1,4GlcNAc („Sia6LacNAc“-Trisaccharid). Dieses Trisaccharid, das ein Gegenligand für CD22 und andere Moleküle ist, ist auf asparagingebundenen Kohlenhydratgruppen von Lymphozyten-Zelloberflächenglykoproteinen, wie z.B. IgM, CD45 und CD22, zu finden. Die Erfindung basiert zumindest teilweise auf der Entdeckung, dass durch Inhibieren der Aktivität einer Glykosyltransferase (z.B. einer ST6Gal-Sialyltransferase; EC 2.4.99.1 (bezüglich der Nomenklatur von Sialyltransferasen siehe Tsuji et al., Glycobiol. 6, v-xiv (1996))), die für die Synthese dieses Liganden verantwortlich ist, B-Lymphozyten-vermittelte Immunantworten inhibiert werden können. Daher betrifft die Erfindung z.B. blockierende Mittel, welche die Aktivität von Glykosyltransferasen, die in die Synthese des Sia6LacNAc-Trisaccharids involviert sind, inhibieren.

[0050] Verfahren zur Inhibierung von Immunantworten, die durch T-Lymphozyten, besonders zytolytische CD8⁺-T-Lymphozyten, vermittelt werden, können ebenfalls verwendet werden. Diese Verfahren umfassen typischerweise das Stören der Biosynthese von α 2,3-Sialylgalactosiden. Es kann z.B. einem Säugetier ein Mittel verabreicht werden, das die Biosynthese eines Sia α 2,3Gal β 1,3GalNAc-Trisaccharids inhibiert.

[0051] Das Mittel kann die Aktivität einer Sialyltransferase inhibieren, die in die Biosynthese des α 2,3-Sialyl-

galactosids involviert ist (z.B. ST3Gal-I-Sialyltransferase; EC 2.4.99.4).

Inhibitoren von Glykosyltransferasen

[0052] Die Verfahren umfassen das Reduzieren einer Immunantwort durch das Inhibieren der Enzymaktivität von Sialyltransferase-Polypeptiden, die in die Synthese der $\alpha 2,6$ - oder $\alpha 2,3$ -Sialylgalactoside involviert sind. Die Biologie und Biochemie von Enzymen, die in die Biosynthese von spezifischen Glykosiden, wie z.B. Sia $\alpha 2,6$ -Galactosiden und Sia $\alpha 2,3$ -Galactosiden, involviert sind, wurde ausführlich untersucht. Für eine Beschreibung siehe z.B. Datta und Paulson, *Indian J. Biochem. Biophys.* 34, 157–65 (1997); Guo et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 68, 1–20 (1997); Tsuji, J. *Biochem. (Tokyo)* 120, 1–13 (1996).

[0053] Glykosyltransferasen, die allgemeine Gruppe an Enzymen, die die Synthese dieser Gruppierungen katalysieren, katalysieren den Transfer eines Monosaccharids aus einem Glykosylnucleotid, dem Donorsubstrat, zu einem Akzeptorsubstrat. Das Akzeptorsubstrat kann ein anderer Glykosylrest, ein Polypeptid oder ein Lipid, in Abhängigkeit von der Spezifität der Transferase, sein. Siehe z.B. Beyer et al., *Adv. in Enzym.* 52, 24 (1981). Glykosyltransferasen werden basierend auf dem Typ des transferierten Zuckerrests in Familien eingeteilt. Enzyme, die Sialinsäure transferieren, werden z.B. Sialyltransferasen genannt, jene, die Fucose transferieren, werden „Fucosyltransferasen“ genannt, und jene, die Sialinsäuren transferieren, werden „Sialyltransferasen“ genannt. Sialyltransferasen sind eine Familie von Glykosyltransferaseenzymen, die während der Oligosaccharid-Diversifizierung Sialinsäurereste hinzufügen (für einen Bericht siehe z.B. Harduin-Lepers et al., *Glycobiology* 5, 741–758 (1995)). Die Sialinsäure-Addition tritt im Golgi-Apparat auf und beendet allgemein die weitere Oligosaccharidkettenverlängerung. In jeder Familie gibt es typischerweise 10–15 verschiedene Enzyme, die erforderlich sind, um die unterschiedlichen Kohlenhydratstrukturen darzulegen, die auf Glykoproteinen und Glykolipiden von Tierzellen zu finden sind. Jedes Enzym stellt eine definierte Struktur her, die auf den Donor- und Akzeptorsubstraten basiert, die sie verwenden, sowie auf der anomeren Bindung, die in der Transferreaktion gebildet wird.

[0054] Der Inhibitor ist vorzugsweise für die bestimmte Glykosyltransferase von Interesse spezifisch, und die Glykosyltransferase ist eine, die nicht für die Synthese anderer Oligosaccharide erforderlich ist, die nicht in eine Immunantwort involviert sind. Die Target-Glykosyltransferase ist eine Sialyltransferase, da diese Enzyme die Addition der terminalen Kohlenhydratgruppierung an die in Immunantworten involvierten Oligosacchariden katalysieren. Man kann z.B. einen Inhibitor einer β -Galactose- $\alpha 2,6$ -sialyltransferase (z.B. eine ST6Gal-Sialyltransferase) verabreichen, um Immunantworten zu modulieren, die durch B-Lymphozyten vermittelt werden, oder eine β -Galactose- $\alpha 2,3$ -sialyltransferase (z.B. eine ST3Gal), um zytotoxische T-Lymphozyten-vermittelte Immunantworten zu modulieren.

[0055] Nach der Identifikation des zu inhibierenden Target-Enzyms (eine Sialyltransferase) können viele Ansätze verwendet werden, um ihre Aktivität zu blockieren. Beispiele von Mitteln, die in der Lage sind, die Enzymaktivität zu inhibieren, umfassen verschiedene Substratanaloga. Für einen Bericht siehe Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, 2. Auflage (1985). Die Verfahren zur Modulation von Immunantworten durch Inhibierung der Glykosyltransferaseaktivität können das Verabreichen einer Verbindung an ein Säugetier umfassen, die ein Analogon eines Substrats für die Glykosyltransferase ist.

[0056] In manchen Ausführungsformen ist der Inhibitor ein Zuckernucleotid oder ein Analogon eines Donorsubstrats, z.B. ein Analogon von Sialinsäure oder CMP-Sialinsäure. Wie oben stehend beschrieben, sind das Donorsubstrat von Glykosyltransferasen Zuckernucleotide, normalerweise Diphosphonucleoside. Uridindiphosphozucker sind z.B. Donorsubstrate für die Bildung von Glykosiden von Glucose, Galactose, N-Acetylglucosamin, Xylose und Glucuronsäure. Guanosindiphosphozucker sind Donorsubstrate für die Synthese von Glykosiden von Mannose und Fucose. Die Glykoside der Sialinsäuren werden durch Transfer aus Cytidinmonophosphosialinsäure gebildet.

[0057] Unter Anwendung dieses Wissens kann ein Fachmann eine Reihe von Zuckernucleotiden leicht synthetisieren, die anschließend getestet werden können, um jene zu identifizieren, die zu einer maximalen Inhibierung eines spezifischen Enzyms in der Lage sind. Der Ausdruck „Zuckernucleotid“ bezieht sich bei Verwendung hierin sowohl auf oben beschriebene Zuckernucleotide als auch auf verschiedene Analoga davon, die synthetisiert oder aus natürlichen Quellen isoliert werden könnten. Bei der Anzahl an Variationen auf dieser Struktur gibt es keine Einschränkungen. Sowohl die Esterbindung zwischen dem Zucker und dem Phosphat als auch die Anhydridbindung des Pyrophosphats sind z.B. potentielle Ziele einer enzymatischen Spaltung. Der Ersatz der O-P- oder der C-O-Bindung mit einer stabileren C-P-Bindung ergibt Nucleotidmonophosphat- oder -diphosphatzuckeranaloga, die gegenüber enzymatischem Abbau resistenter sind. Solche Verbindungen

besitzen das Potential, die Glykoprotein- oder Glykolipid-Synthese selektiv zu inhibieren, indem sie als Substratanaloga einer bestimmten Glykosyltransferase wirken. Siehe z.B. Vaghefi et al., J. Med. Chem. 30, 1383–1391 (1987), sowie Vaghefi et al., J. Med. Chem. 30, 1391–1399 (1987). Glykosyltransferaseinhibitoren werden z.B. auch in USPN 5.461.143 beschrieben.

[0058] Ein weiterer Ansatz ist das Ersetzen der Monophosphat- oder Diphosphatbrücke zwischen dem Zuckerrest und der Nucleosidgruppierung. Die Diphosphatbrücke kann z.B. mit einem isosterischen- $\text{OCONHSO}_2\text{O}$ -Rest ersetzt werden. Siehe Samarasa et al., J. Med. Chem. 28, 40–46 (1985).

[0059] Analoga von Zuckernucleotiden, die in der Lage sind, die Glykosylierung zu inhibieren, wurden als Antibiotika und als antivirale Mittel verwendet. Beispiele solcher Verbindungen umfassen 2-Desoxy-D-glukose, die entweder in UDP-2dGlc oder in GDP-2dGlc umgewandelt wird und in dieser Form die Glykosylierung von Glykoproteinen in der viralen Hülle inhibiert. DeClercq, Biochem. J. 205, 1 (1982), hierin mittels Verweis aufgenommen. Antibiotika, wie z.B. Tunicamycin und Streptovirudin, sind ebenso wirksam aufgrund ihrer Fähigkeit, die Glykosylierung zu inhibieren. Tunicamycin ist z.B. ein Analogon von UDP-GlcNAc, dem Donorsubstrat für N-Acetylglucosaminyltransferasen. Der Ersatz der Diphosphatbrücke mit einer Kohlenstoffkette ermöglicht es Tunicamycin, die Zellmembran zu durchdringen, jedoch trotzdem die aktive Stelle des Enzyms leicht zu binden. Die Struktur dieser und verwandter Verbindungen dienen einem Fachmann als Richtungsvorgabe bei der Kreation und dem Synthetisieren von Verbindungen mit ähnlichen inhibitorischen Wirkungen, die in Einklang mit der vorliegenden Erfindung stehen, wie sie hierin beschrieben wird. Zusätzliche Analoga von Sialinsäure-Zuckernucleotiden, die in den Verfahren der Erfindung von Nutzen sind, umfassen z.B. CMP-Chinasäure sowie Derivate davon (Schaub et al., Glycoconjugate J. 15, 345–354 (1998)).

[0060] Nucleotide sind das Nebenprodukt der Reaktion, durch die Glykosylreste auf Akzeptorsubstrate transferiert werden. Es wurde herausgefunden, dass Nucleotide kompetitiv Glykosyltransferase inhibieren. Daher besitzen verschiedene Nucleotide und ihre Analoga Potential als Inhibitoren dieser Enzyme. CDP und CMP können z.B. verwendet werden, um die Sialyltransferaseaktivität zu inhibieren.

[0061] Zusätzlich zu den Donorsubstratanaloga können Analoga von Akzeptorsubstraten auch als Inhibitoren verwendet werden. Wiederum ist es dem Fachmann möglich, eine Reihe möglicher Strukturen zu erkennen, die verwendet werden können. Aufgrund der Akzeptorsubstrat-Spezifität von Sialyltransferasen kann eine spezifische Inhibierung der Sialyltransferase erreicht werden, die das Lactosesubstrat erkennt. Idealerweise sollten die inhibierenden Verbindungen in der Lage sein, als spezifische Akzeptorsubstrate für ein bestimmtes Enzym zu agieren, sogar in Gegenwart von anderen Enzymen. Zusätzlich dazu sollte die Verbindung ein wirksames Akzeptorsubstrat sein. Daher sollte der K_i des Inhibitors zumindest etwa 10^{-5} M, noch bevorzugter zumindest etwa 10^{-7} M, betragen. Beispiele von Akzeptoranaloga, welche die Sialyltransferasen inhibieren, werden im US-Patent Nr. 5.441.932 beschrieben. Andere geeignete Analoga für die Inhibierung von Sia6Gal-Sialyltransferasen umfassen Derivate von LacNAc, in denen der Galactose-Rest durch 6-Desoxygalactose ersetzt wird. Auf ähnliche Art und Weise werden Sia3Gal-I-Sialyltransferasen durch LacNAc-Derivate inhibiert, in denen der Galactose-Rest durch 3-Desoxygalactose ersetzt ist. Die Desoxygalactose-enthaltenden Verbindungen binden an die jeweiligen Sialyltransferasen, fungieren jedoch nicht als Akzeptor.

[0062] Natürlich vorkommende Moleküle, die inhibierende Wirkungen aufweisen, können auch zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung isoliert werden. Die Biosynthese von Glykoproteinen oder Glykolipiden ist ein komplexer Stoffwechselweg, der bezüglich der Regulierung von vielen Faktoren abhängt. Natürlich vorkommende inhibierende Verbindungen können gereinigt werden und verwendet werden, um die Aktivität weiter zu inhibieren. Von Ammoniumchlorid und Chloroquin wurde ebenfalls berichtet, dass sie die Sialyltransferaseaktivität inhibieren (Thorens et al., Nature 321, 618 (1986)).

[0063] Die bevorzugten Glykosyltransferaseinhibitoren der vorliegenden Erfindung besitzen die Fähigkeit, die Zellmembran zu durchdringen und in den Golgi-Apparat eindringen. Daher sind die blockierenden Mittel vorzugsweise ausreichend hydrophob, um eine Diffusion durch die Membran zu ermöglichen. Allgemein haben sie keine anderen nachteiligen Wirkungen auf den zellulären Metabolismus, so dass andere Glykosylierungsreaktionen weitergeführt werden, während die spezifische Reaktion inhibiert wird. Die blockierenden Mittel sind vorzugsweise relativ kleine Moleküle, wodurch eine Immunogenität vermieden wird und das Durchdringen der Zellmembran ermöglicht wird. Idealerweise besitzen sie ein Molekulargewicht von zwischen etwa 100–2000 Dalton, sie können jedoch auch Molekulargewichte von bis zu 5000 oder mehr aufweisen, abhängig von der gewünschten Anwendung. In den am meisten bevorzugten Ausführungsformen weisen die Inhibitoren ein Molekulargewicht von zwischen etwa 200–600 Dalton auf.

[0064] Die Inhibitoren der vorliegenden Erfindung besitzen vorzugsweise eine starke Affinität für das Target-Enzym, so dass zumindest etwa 70 % Inhibierung der Glykosyltransferaseaktivität erreicht wird, vorzugsweise etwa 75 %–85 % und insbesondere 90 %–95 % oder mehr. Die Affinität des Enzyms für den Inhibitor ist vorzugsweise ausreichend stark, so dass die Dissoziationskonstante, oder K_i , des Enzym-Inhibitor-Komplexes weniger als etwa 10^{-5} M beträgt, typischerweise zwischen etwa 10^{-6} und 10^{-8} M.

[0065] Die Enzyminhibierung umfasst allgemein die Wechselwirkung einer Substanz mit einem Enzym, um die Geschwindigkeit der von diesem Enzym katalysierten Reaktion zu verringern. Inhibitoren können gemäß einer Reihe an Kriterien klassifiziert werden. Sie können z.B. reversibel oder irreversibel sein. Bei einem irreversiblen Inhibitor kommt es sehr langsam, falls überhaupt, zu einer Dissoziation von seinem Target-Enzym, da er sehr eng an das Enzym gebunden wird, entweder kovalent oder nicht kovalent. Die reversible Inhibierung umfasst im Gegensatz dazu einen Enzym-Inhibitor-Komplex, bei dem es zu einer Dissoziation kommen kann.

[0066] Inhibitoren können auch gemäß der Tatsache klassifiziert werden, ob sie kompetitive, nichtkompetitive oder unkompetitive Inhibitoren sind. Bei der kompetitiven Inhibierung für einfache kinetische Systeme, die ein einfaches Substrat umfassen, kann das Enzym entweder das Substrat oder den Inhibitor binden, jedoch nicht beides. Typischerweise ähneln kompetitive Inhibitoren dem Substrat oder dem/den Produkt(en) und binden die aktive Stelle des Enzyms, wodurch das Substrat daran gehindert wird, die aktive Stelle zu binden. Ein kompetitiver Inhibitor verringert die Geschwindigkeit der Katalyse durch wirksames Reduzieren der Affinität des Substrats für das Enzym. Typischerweise kann ein Enzym durch sein eigenes Produkt aufgrund von Gleichgewichts-Überlegungen kompetitiv inhibiert werden. Da das Enzym ein Katalysator ist, ist es prinzipiell in der Lage, eine Reaktion in vorwärtsgerichteter oder rückwärtsgerichteter Richtung zu beschleunigen.

[0067] Nichtkompetitive Inhibitoren ermöglichen es dem Enzym, das Substrat zur gleichen Zeit zu binden, zu der es den Inhibitor bindet. Ein nichtkompetitiver Inhibitor fungiert durch das Verringern der Wechselzahl eines Enzyms anstatt durch das Verringern des Anteils an freiem Enzym. Eine weitere mögliche Kategorie der Inhibierung ist die gemischte oder unkompetitive Inhibierung, bei der der Inhibitor die Bindungsstelle beeinträchtigt und ebenfalls die Wechselzahl des Enzyms verändert. Die Enzyminhibierung von kinetisch komplexen Systemen, die mehr als ein Substrat umfassen, wie dies bei Glykosyltransferasen der Fall ist, werden in Segel, Enzyme Kinetics, Wiley, N. Y. (1975), beschrieben.

Screeningverfahren zur Identifizierung von blockierenden Mitteln

[0068] Therapeutisch wirksame, blockierende Mittel können durch Screening einer Reihe von Verbindungen und Gemischen von Verbindungen auf ihre Fähigkeit, die Glykosyltransferaseaktivität zu inhibieren, identifiziert werden. Die Verwendung von Screeningtests zur Entdeckung natürlich vorkommender Verbindungen mit gewünschten Aktivitäten ist wohlbekannt und wurde für viele Jahre auf breiter Ebene verwendet. Es wurden z.B. viele Verbindungen mit antibiotischer Aktivität ursprünglich unter Verwendung dieses Ansatzes identifiziert. Beispiele solcher Verbindungen umfassen Monolactame und Aminoglykosid-Antibiotika. Verbindungen, die verschiedene Enzymaktivitäten inhibieren, wurden mit diesem Verfahren ebenfalls entdeckt, z.B. Mevinolin, Lovastatin und Mevacor, bei denen es sich um Inhibitoren von Hydroxymethylglutamyl-Coenzym-A-Reductase handelt, ein Enzym, das in die Cholesterinsynthese involviert ist. Antibiotika, die Glykosyltransferaseaktivitäten inhibieren, wie z.B. Tunicamycin und Streptovirudin, wurden ebenfalls auf diese Art und Weise identifiziert.

[0069] Verfahren zum Screening von Proben auf die Glykosyltransferase-inhibierende Aktivität sind daher von Bedeutung. Eine „Probe“, wie sie hierin verwendet wird, kann ein beliebiges Gemisch an Verbindungen sein, das zum Testen in einem Glykosyltransferasetest geeignet ist. Eine typische Probe umfasst ein Gemisch synthetisch hergestellter Verbindungen oder alternativ dazu ein natürlich auftretendes Gemisch, wie z.B. eine Zellkulturnährlösung. Geeignete Zellen umfassen beliebige gezüchtete Zellen, wie z.B. Säugetier-, Insekten-, Mikroben- oder Pflanzen-Zellen. Mikrobielle Zellkulturen bestehen aus einem beliebigen mikroskopischen Organismus, wie z.B. Bakterien, Protozoen, Hefe, Pilzen und dergleichen.

[0070] Im typischen Screeningtest wird eine Probe, wie z.B. eine Pilznährlösung, zu einem Standard-Glykosyltransferasetest hinzugefügt. Wird eine Inhibierung der Aktivität im Vergleich zu Kontrolltests gefunden, so wird das Gemisch normalerweise fraktioniert, um Komponenten der Probe zu identifizieren, welche die inhibierende Aktivität bereitstellen. Die Probe wird unter Verwendung von Standardverfahren, wie z.B. Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie, Elektrophorese, Ultrafiltration, HPLC und dergleichen, fraktioniert. Siehe z.B. Protein Purification, Principles and Practice, Springer-Verlag (1982). Jede isolierte Fraktion wird anschließend auf die inhibierende Aktivität getestet. Falls gewünscht, werden die Fraktionen anschließend weiter subfraktioniert und getestet. Dieses Subfraktionierungs- und Testverfahren kann so oft wie ge-

wünscht wiederholt werden.

[0071] Durch das Kombinieren verschiedener Standardreinigungsverfahren kann eine im Wesentlichen reine Verbindung erhalten werden, die zum therapeutischen In-vivo-Testen geeignet ist. Ein im Wesentlichen reines blockierendes Mittel ist, wie hierin definiert, eine inhibierende Verbindung, die größtenteils als eine einzelne Bande bei Standard-Elektrophorese-Bedingungen oder größtenteils als ein einzelner Peak bei Beobachtung auf einer Chromatographie-Säule migriert. Noch spezifischer umfassen Zusammensetzungen im Wesentlichen reiner blockierender Mittel weniger als zehn Prozent an verschiedenen Verbindungen.

[0072] Die Fucosyltransferaseaktivität und ihre Inhibierung wird typischerweise gemäß Standardverfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität getestet. Für einen allgemeinen Bericht über Enzymtests siehe Rosso-mando, Measurements of Enzyme Activity, in: Guide to Protein Purification, Band 182, Methods in Enzymology, Deutscher (Hrsg.) (1990).

[0073] Ein Test für die Sialyltransferaseaktivität enthält typischerweise eine gepufferte Lösung, die auf einen physiologischen pH angepasst ist, eine Quelle zweiwertiger Kationen, ein Donorsubstrat (normalerweise mit CMP-Sialinsäure markiert), ein Akzeptorsubstrat (z.B. LacNAc oder Gal β 1,3GalNAc), Sialyltransferase (typischerweise ST6Gal oder ST3Gal) und die Probe oder Fraktion einer Probe, deren inhibierende Aktivität getestet werden soll. Nach einer vorherbestimmten Zeit bei 23°C oder 37°C wird die Reaktion angehalten, und das sialylierte Produkt wird isoliert und gemäß Standardverfahren gemessen (z.B. in einem Szintillationszähler). Sialyltransferasetests, die einen UV-markierten Akzeptor verwenden und zu einem UV-markierten Produkt führen, das leicht mittels Umkehrphasen-HPLC getrennt werden kann und mittels UV-Spektroskopie quantifiziert werden kann, werden in Schaub et al., Glycoconjugate J. 15, 345–354 (1998), beschrieben.

[0074] Zusätzlich zum Testen auf eine Wirkung auf die Sialyltransferaseaktivität zur Identifizierung geeigneter Modulatoren von Immunantworten kann direkt auf eine Wirkung auf die Immunsystemfunktion getestet werden. Geeignete Tests umfassen z.B. B-Zellen-Proliferationstests, CTL-Aktivierungstests und dergleichen. Tests werden hierin beschrieben, sowie z.B. auch in Hennessey et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95, 4504–4509 (1998).

Therapeutische und diagnostische Verwendungen der Erfindung

[0075] Die Zusammensetzungen und Verfahren, die oben stehend erwähnt wurden, können therapeutisch verwendet werden, um die Sialyltransferaseaktivität, die mit einer Reihe an Immunantworten assoziiert ist, selektiv zu inhibieren. In manchen Ausführungsformen umfassen die Immunantworten Lymphoidzellen und umfassen oftmals keine anderen Immunzellen als Neutrophile. Die Erfindung kann verwendet werden, um schädliche Immunantworten zu inhibieren, die mit Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßung und Allergien assoziiert werden. Die ungeeignete Aktivierung des Immunsystems ist eine Komponente in einer Reihe an Immunpathologien, wie z.B. Autoimmunität, Allotransplantatabstoßung und allergischen Reaktionen. Beispiele für Autoimmunerkrankungen umfassen rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Myasthenia gravis. Allergische Reaktionen umfassen Allergien auf verschiedene Pollenarten, Hausstaubmilben und dergleichen. Nahrungsmittelüberempfindlichkeiten, wie z.B. Zöliakie und die Crohn-Krankheit, sowie andere allergische Erkrankungen wurden mit ungeeigneten Immunantworten assoziiert oder es wurde vermutet, dass sie eine Autoimmunkomponente aufweisen.

[0076] Verfahren zur Modulation von Immunantworten, die durch B-Lymphozyten vermittelt werden, z.B. humorale Immunität, können verwendet werden. Diese Immunantworten, bei denen Antikörper Antigene erkennen und eliminieren, stellen den Hauptabwehrmechanismus gegen extrazelluläre Mikroben und ihre sekretierten Toxine dar. B-Lymphozyten-vermittelte Immunantworten werden durch das Stören der Biosynthese von oder das Blockieren von α 2,6-Sialylgalactosiden inhibiert.

[0077] Andere Verfahren zur Modulation der Immunantworten, die durch T-Lymphozyten vermittelt werden, insbesondere zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten, werden ebenso in Betracht gezogen. Solche Immunantworten stellen eine Verteidigung gegen Infektionen durch intrazelluläre Mikroben, wie z.B. Viren und manche Bakterien, dar, die sich in Wirtszellen vermehren und daher für die zirkulierenden Antikörper nicht zugänglich sind. CTL-Antworten werden durch das Stören der Biosynthese von oder das Blockieren von α 2,3-Sialylgalactosiden inhibiert.

[0078] In therapeutischen Anwendungen werden die Glykosyltransferaseinhibitoren der Erfindung einem Individuum verabreicht, das bereits unter einer ungeeigneten oder unerwünschten Immunantwort leidet. Zusam-

mensetzungen, die Glykosyltransferaseinhibitoren oder Mittel enthalten, die an die $\alpha 2,3$ - oder $\alpha 2,6$ -Sialylgalactoside binden oder diese blockieren, werden einem Patienten in einer Menge verabreicht, die ausreicht, um die unerwünschte Immunantwort zu unterdrücken und um die Symptome und/oder Komplikationen zu heilen oder zumindest teilweise zu einem Stillstand zu bringen. Eine Menge, die ausreicht, um dies zu bewirken, wird als „therapeutisch wirksame Dosis“ definiert. Für diese Verwendung wirksame Mengen hängen z.B. von der Zusammensetzung des Inhibitors, von der Art der Verabreichung, dem Stadium und dem Schweregrad der behandelten Krankheit, dem Gewicht und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten sowie dem Urteilsvermögen des verschreibenden Arztes ab.

[0079] Therapeutisch wirksame Mengen der Glykosyltransferaseinhibitor-zusammensetzungen befinden sich für die anfängliche Immunisierung (d.h. zur therapeutischen oder prophylaktischen Verabreichung) allgemein in einem Bereich von etwa 1,0 mg bis etwa 10 g Glykosyltransferaseinhibitor für einen Patienten mit 70 kg, normalerweise von etwa 10 mg bis etwa 5 g und vorzugsweise zwischen etwa 2 mg und etwa 1 g. Auf diese Dosierungen können wiederholte Verabreichungen über Wochen bis Monate folgen, je nach Abhängigkeit der Antwort und des Zustands des Patienten durch das Messen der Aktivität des Immunsystems.

[0080] Es ist zu beachten, dass die Zusammensetzungen bei schwerwiegenden Krankheiten, d.h. lebensbedrohlichen oder gegebenenfalls lebensbedrohlichen Situationen, verwendet werden können. In solchen Fällen ist es hinsichtlich der Minimierung von Fremdstoffen und dem verhältnismäßig nichttoxischen Wesen der Inhibitoren möglich, beträchtliche Überschussmengen dieser Zusammensetzungen zu verabreichen, was vom behandelnden Arzt auch als wünschenswert angesehen werden kann.

[0081] Zur prophylaktischen Verwendung sollte die Verabreichung an Risikogruppen erfolgen. Die therapeutische Verabreichung kann beim ersten Anzeichen von Krankheit oder ihrer Entdeckung oder, im Fall einer Immunerkkrankung, kurz nach der Diagnose beginnen. Darauf folgt oftmals eine wiederholte Verabreichung, bis zumindest die Symptome im Wesentlichen gelindert sind, sowie für eine gewisse Zeitspanne danach.

[0082] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung sind zur parenteralen, topischen, oralen oder lokalen Verabreichung gedacht. Typischerweise werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen parenteral, z.B. intravenös, subkutan, intradermal oder intramuskulär, verabreicht. Zusammensetzungen der Erfindung sind auch zur oralen Verabreichung geeignet. Daher können Zusammensetzungen zur parenteralen Verabreichung hergestellt werden, die eine Lösung des Glykosyltransferase-inhibierenden Mittels umfassen, das in einem geeigneten Träger, vorzugsweise einem wässrigen Träger, aufgelöst oder suspendiert ist. Es kann eine Reihe wässriger Träger verwendet werden, z.B. Wasser, gepuffertes Wasser, 0,9 % Salzlösung, 0,3 % Glycin, Hyaluronsäure und dergleichen. Diese Zusammensetzungen können mittels herkömmlicher, wohlbekannter Sterilisationsverfahren sterilisiert werden oder können sterilfiltriert werden. Die resultierenden wässrigen Lösungen können zur Verwendung so, wie sie sind, oder lyophilisiert verpackt werden, wobei das lyophilisierte Präparat vor der Verabreichung mit einer sterilen Lösung kombiniert wird. Die Zusammensetzungen können pharmazeutisch annehmbare Hilfssubstanzen enthalten, wie erforderlich, um sich physiologischen Bedingungen anzunähern, wie z.B. pH-Anpassungs- und Puffer-Mittel, Tonizitäts-Anpassungsmittel, Benetzungsmittel und dergleichen, z.B. Natriumacetat, Natriumlactat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Sorbitanmonolaurat, Triethanolaminoleat etc.

[0083] Die Konzentration von Glykosyltransferase-inhibierenden Mitteln der Erfindung in den pharmazeutischen Formulierungen kann großflächig variieren, d.h. von weniger als etwa 0,1 %, normalerweise bei oder zumindest etwa 2 %, bis zu einem Prozentsatz, der bei von 20 % bis zu 50 Gew.-% oder mehr liegt, und wird hauptsächlich durch Flüssigkeitsvolumina, Viskositätswerte etc. in Einklang mit der spezifischen ausgewählten Verabreichungsart ausgewählt.

[0084] Die Glykosyltransferaseinhibitoren können auch über Liposomen verabreicht werden, die dazu dienen, die Konjugate auf ein bestimmtes Gewebe, wie z.B. Lymphoidgewebe, zielen zu lassen, oder es kann mit ihnen selektiv auf infizierte Zellen gezielt werden, ebenso können sie die Halbwertszeit der Peptidzusammensetzung erhöhen. Liposomen umfassen Emulsionen, Schäume, Mizellen, unlösliche Monoschichten, Flüssigkristalle, Phospholipid-Dispersionen, Lamellenschichten und dergleichen. In diesen Präparaten ist das anzuliefernde Peptid als Teil eines Liposoms inkorporiert, alleine oder zusammen mit einem Molekül, das z.B. an einen Rezeptor bindet, der unter Lymphoidzellen weit verbreitet ist, wie z.B. monoklonale Antikörper, die an das CD45-Antigen binden, oder mit anderen therapeutischen oder immunogenen Zusammensetzungen. Daher können Liposomen, die mit einem gewünschten Peptid oder Konjugat der Erfindung gefüllt sind, an die Stelle von Lymphoidzellen gesteuert werden, wo die Liposomen anschließend die ausgewählten Glykosyltransferaseinhibitor-Zusammensetzungen anliefern. Liposomen zur Verwendung in der Erfindung werden aus Vesi-

kel-bildenden Standard-Lipiden gebildet, die allgemein neutrale und negativ geladene Phospholipide und ein Sterin, wie z.B. Cholesterin, umfassen. Die Auswahl von Lipiden erfolgt allgemein unter Berücksichtigung von z.B. der Liposomengröße, der Säurelabilität und der Stabilität der Liposomen im Blutkreislauf. Eine Reihe an Verfahren sind zur Herstellung von Liposomen erhältlich, wie z.B. in Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 467 (1980), US-Patent Nr. 4.235.871, 4.501.728 und 4.837.028 beschrieben.

[0085] Das Targeting von Liposomen unter Verwendung einer Reihe von Targeting-Mitteln ist nach dem Stand der Technik wohlbekannt (siehe z.B. US-Patent Nr. 4.957.773 und 4.603.044). Zum Targeting an die Immunzellen kann ein Ligand, der in das Liposom zu inkorporieren ist, z.B. Antikörper oder Fragmente davon, die für Zelloberflächendeterminanten der gewünschten Immunsystemzellen spezifisch sind, umfassen. Eine Liposomen-Suspension, die ein Peptid oder Konjugat enthält, kann intravenös, lokal, topisch etc. in einer Dosierung verabreicht werden, die unter anderem je nach Verabreichungsart, dem angelieferten Konjugat und dem Stadium der zu behandelnden Krankheit variiert.

[0086] Für feste Zusammensetzungen können herkömmliche, nichttoxische feste Träger verwendet werden, die z.B. pharmazeutische Güteklassen von Mannit, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Talk, Cellulose, Glucose, Saccharose, Magnesiumcarbonat und dergleichen umfassen. Zur oralen Verabreichung wird eine pharmazeutisch annehmbare, nichttoxische Zusammensetzung durch Inkorporieren eines beliebigen der normalerweise verwendeten Exzipienten, wie z.B. jene Träger, die zuvor aufgelistet wurden, und im Allgemeinen 10–95 % Wirkstoff, d.h. ein oder mehrere Konjugate der Erfindung und noch bevorzugter in einer Konzentration von 25 %–75 %, gebildet.

[0087] Zur Aerosol-Verabreichung werden die Inhibitoren vorzugsweise in einer geeigneten Form zusammen mit einem Tensid und einem Treibmittel bereitgestellt. Typische Prozentsätze von Glykosyltransferaseinhibitoren sind 0,01 %–20 Gew.-%, vorzugsweise 1 %–10 %. Das Tensid muss natürlich nichttoxisch sein und vorzugsweise im Treibmittel löslich sein. Beispiele solcher Mittel sind die Ester oder Partialester von Fettsäuren, die von 6 bis 22 Kohlenstoffatome enthalten, wie z.B. n-Capronsäure, Oktansäure, Laurinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Linolsäure, Olesterinsäure und Ölsäure mit einem aliphatischen mehrwertigen Alkohol oder seinem zyklischen Anhydrid. Es können gemischte Ester, wie z.B. gemischte oder natürliche Glyceride, verwendet werden. Das Tensid kann 0,1 %–20 Gew.-% der Zusammensetzung, vorzugsweise 0,25–5 %, darstellen. Der Rest der Zusammensetzung ist normalerweise ein Treibmittel. Es kann, wie gewünscht, auch ein Träger inkludiert werden, wie z.B. Lecithin zur intranasalen Anlieferung.

[0088] Verfahren zur Beobachtung der Immunfunktion durch Detektieren der Mengen von α 2,3-Sialylgalactosiden (um die CTL-Immunsystemfunktion zu beobachten) und α 2,6-Sialylgalactosiden (um die humorale Immunsystemfunktion zu beobachten) in einer Probe eines Patienten können gemäß Standardverfahren zur Detektion gewünschter Kohlenhydratstrukturen durchgeführt werden. Es können z.B. spezifische Lectine oder Antikörper, die gegen den Liganden gezüchtet wurden, verwendet werden. Um z.B. Mengen von α 2,6-Sialylgalactosiden zu detektieren, besitzt das Lectin Sambucus-nigra-Rinden-Agglutinin (SNA), das aus der Innenrinde (Bastgewebe) von Holunderstämmen und -zweigen isoliert werden kann oder kommerziell erhalten werden kann (Sigma Chemical Co., St. Louis MO), eine Affinität für NeuNAc- α 2-6-Gal, NeuNAc- α 2-6-GalNAc und, in geringerem Ausmaß, NeuNAc-[2-3]-Gal (Shibuya et al., J. Biol. Chem. 262, 1596 (1987)). CD22 oder eine Gruppierung mit der Sia6LacNAc-Bindungsaktivität von CD22 kann auch verwendet werden, um die Gegenwart oder das Fehlen von Sia6LacNAc zu detektieren. Immunerkrankungen, die CTLs involvieren, können unter Verwendung eines Mittels detektiert werden, das an α 2,3-Sialylgalactoside bindet. Ein Beispiel eines geeigneten Bindungsmittels für α 2,3 ist das MAL-II-Lectin, das aus Maackia-amurensis-Samen isoliert werden kann.

[0089] Glykosyltransferasen selbst, besonders die akzeptorbindende Domäne einer Glykosyltransferase, sind auch als Bindungsgruppierungen in den diagnostischen Tests der Erfindung von Nutzen. Bei Fehlen einer bestimmten Sialyltransferase tendiert z.B. die Konzentration von Akzeptorgruppierungen dazu, anzusteigen. Als ein Beispiel führt eine Defizienz von ST6Gal-Sialyltransferase zu einem dramatischen Anstieg terminaler Galactose-Reste (d.h. Gal β 1,4GlcNAc-) auf B-Zellen. Daher kann die ST6Gal-Sialyltransferase als Detektionsgruppierung verwendet werden, um zu bestimmen, ob ST6Gal in Zellen fehlt. Eine ST3Gal-Transferase kann auf ähnliche Art und Weise als Detektionsgruppierung verwendet werden.

[0090] In typischen Ausführungsformen werden die Detektionsgruppierungen mit einer detektierbaren Markierung markiert. Die detektierbaren Markierungen können Primärmarkierungen sein (wobei die Markierung ein Element umfasst, das direkt detektiert wird oder das ein direkt detektierbares Element produziert) oder Sekundärmarkierungen (wobei die detektierte Markierung an eine Primärmarkierung bindet, wie es bei der immunologischen Markierung üblich ist). Eine Einführung bezüglich Markierungen, Markierungsverfahren und der

Detektion von Markierungen ist in Polak und Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2. Auflage, Springer Verlag, NY (1997), sowie in Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996), einem kombinierten Handbuch und Katalog, veröffentlicht von Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, zu finden. Primär- und Sekundärmarkierungen können nicht detektierte Elemente sowie detektierte Elemente umfassen. Nützliche Primär- und Sekundärmarkierungen in der vorliegenden Erfindung können Spektralmarkierungen umfassen, wie z.B. fluoreszierende Farbstoffe (z.B. Fluorescein und Derivate, wie z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Oregon-GrünTM, Rhodamin und Derivate (z.B. Texas-Rot, Tetrahydrodaminisothiocyanat (TRITC) etc.), Digoxigenin, Biotin, Phycoerythrin, AMCA, CyDyesTM und dergleichen), Radiomarkierungen (z.B. ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P etc.), Enzyme (z.B. Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase etc.), spektrale kolorimetrische Markierungen, wie z.B. kolloidales Gold oder gefärbte Glas- oder Plastik-Perlen (z.B. Polystyrol, Polypropylen, Latex etc.). Die Markierung kann gemäß Verfahren, die nach dem Stand der Technik wohlbekannt sind, direkt oder indirekt an eine Komponente des Detektionstests (z.B. das Detektionsreagens) gekoppelt sein. Wie oben stehend angegeben, kann eine große Vielzahl an Markierungen verwendet werden, wobei die Wahl der Markierung von der erforderlichen Empfindlichkeit, der Leichtigkeit der Konjugation mit der Verbindung, den Stabilitätsanforderungen, den erhältlichen Instrumenten und den Entsorgungsvorschriften abhängig ist.

[0091] Bevorzugte Markierungen umfassen jene, die Folgendes verwenden: 1) Chemilumineszenz (unter Verwendung von Meerrettich-Peroxidase oder Luciferase mit Substraten, die, wie oben stehend beschrieben, Photonen als Abbauprodukte produzieren, wobei die Sets z.B. bei Molecular Probes, Amersham, Boehringer-Mannheim und Life Technologies/Gibco BRL erhältlich sind); 2) Farbproduktion (unter Verwendung von sowohl Meerrettichperoxidase und/oder alkalischer Phosphatase mit Substraten, die ein gefärbtes Präzipitat produzieren [Sets bei Life Technologies/Gibco BRL und Boehringer-Mannheim erhältlich]); 3) Hemifluoreszenz unter Verwendung von z.B. alkalischer Phosphatase und dem Substrat AttoPhos [Amersham] oder anderen Substraten, die fluoreszierende Produkte produzieren; 4) Fluoreszenz (z.B. unter Verwendung von Cy-5 [Amersham], Fluorescein und anderen fluoreszierenden Markierungen); 5) Radioaktivität. Andere Verfahren zur Markierung und zur Detektion sind für den Fachmann nach dem Stand der Technik leicht ersichtlich.

[0092] Bevorzugte Enzyme, die an Detektionsreagenzien der Erfindung konjugiert werden können, umfassen z.B. Luciferase und Meerrettichperoxidase. Das chemilumineszierende Substrat für Luciferase ist Luciferin. Ausführungsformen von alkalischer-Phosphatase-Substraten umfassen p-Nitrophenylphosphat (pNPP), das mit einem Spektrophotometer detektiert wird; 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblautetrazolium (BCIP/NBT) und Echtröt/Naphthol-AS-TR-phosphat, die visuell detektiert werden; sowie 4-Methoxy-4-(3-phosphonophenyl)spiro[1,2-dioxetan-3,2'-adamantan], das mit einem Luminometer detektiert wird. Ausführungsformen von Meerrettichperoxidasesubstraten umfassen 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS), 5-Aminosalicylsäure (5AS), o-Dianisidin und o-Phenylendiamin (OPD), die mit einem Spektrophotometer detektiert werden; sowie 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) und 4-Chlor-1-naphthol (4CIN), die visuell detektiert werden. Andere geeignete Substrate sind dem Fachmann bekannt.

[0093] Allgemein wird ein Detektor, der eine bestimmte Markierung beobachtet, verwendet, um die Markierung zu detektieren. Typische Detektoren umfassen Spektrophotometer, Photozellen und Photodioden, Mikroskope, Szintillationszähler, Kameras, Filme und dergleichen sowie Kombinationen davon. Beispiele geeigneter Detektoren sind auf breiter Ebene bei einer Reihe kommerzieller Quellen erhältlich, die dem Fachmann bekannt sind. Normalerweise wird ein optisches Bild eines Substrats, das gebundene Markierungsgruppierungen umfasst, zur anschließenden Computeranalyse digitalisiert.

[0094] Kommerziell erhältliche Detektionsgruppierungen, die zur Verwendung in den Verfahren der Erfindung geeignet sind, umfassen SNA-Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-Lectin (FL-1301, Vector Laboratories, Burlingame, CA) und biotinyliertes SNA-Lectin (B-1305, Vector Laboratories) für α 2,3-Sialylgalactoside. Für die Detektion von α 2,6-Sialylgalactosiden sind MAL-II-FITC-Lectin und biotinyliertes MAL-II-Lectin (B-1265, Vector Laboratories) Beispiele für geeignete Detektionsgruppierungen.

[0095] Immundefizienz wird durch eine wesentliche Reduktion von α 2,3- oder α 2,6-Sialylgalactosiden in einer Probe, z.B. Lymphozyten, die von einem Patient erhalten wurden, angezeigt. Alternativ dazu können Verfahren zur Detektion von Mengen spezifischer Glykosyltransferaseaktivitäten verwendet werden. Standardtests zur Detektion von Glykosyltransferasen, wie z.B. ST6Gal und ST3Gal-I, werden hierin beschrieben. Wieder wird eine Immundefizienz durch eine wesentliche Reduktion der Aktivität der bestimmten Glykosyltransferase angezeigt. Wie hierin verwendet, bezieht sich eine „wesentliche Reduktion“ in den geeigneten Sialylgalactosidmengen oder der Glykosyltransferaseaktivität auf eine Reduktion von zumindest etwa 30 % in der Testprobe.

im Vergleich zu einer nicht immundefizienten Kontrolle. Vorzugsweise beträgt die Reduktion zumindest etwa 50 %, noch bevorzugter zumindest etwa 75 %, und insbesondere werden Sialylgalactosid- oder Glykosyltransferasemengen um zumindest etwa 90 % in einer Probe eines immundefizienten Säugetiers im Vergleich zu einer nicht immundefizienten Kontrolle reduziert.

Transgene Tiere, denen ST6Gal-Sialyltransferase oder ST3Gal-Sialyltransferase fehlt

[0096] Chimäre und transgene, nichtmenschliche Tiere, die Zellen enthalten, denen zumindest ein Sialyltransferasegen fehlt, das in Wildtyp-Zellen des Tiers zu finden ist, sowie Verfahren zur Produktion solcher Tiere können verwendet werden. Von besonderem Interesse sind chimäre und transgene Tiere, denen entweder ein ST6Gal-Sialyltransferase-Gen oder ein ST3Gal-Sialyltransferase-Gen fehlt. Diese Tiere sind für mehrere Zwecke von Nutzen, unter anderem für die Untersuchung der Mechanismen, mit denen sialylierte Oligosaccharide Immunantworten und andere Wirkungen beeinflussen. Diese „Knockout“-Tiere können auch für die Produktion von Glykoproteinen und Glykolipiden verwendet werden, die bei Produktion in einem Wildtyp-Tier einen Sialinsäurerest in sich tragen würden, der für eine gewisse Anwendung nicht erwünscht ist.

[0097] Ein „chimäres Tier“ umfasst manche Zellen, denen das funktionale Sialyltransferasegen von Interesse fehlt, sowie andere Zellen, die das deaktivierte Gen nicht aufweisen. Ein „transgenes Tier“ besteht im Gegensatz dazu aus Zellen, die alle die spezifische Modifikation inkorporiert haben, die das Sialyltransferasegen deaktiviert. Während ein transgenes Tier in der Lage ist, das deaktivierte Sialyltransferasegen an seine Nachkommen weiterzugeben, hängt die Fähigkeit eines chimären Tieres, die Mutation weiterzugeben, davon ab, ob das deaktivierte Gen in den Keimzellen des Tieres vorhanden ist. Die Modifikationen, die das Sialyltransferasegen deaktivieren, können z.B. Insertionen, Deletionen oder Substitutionen von einem oder mehreren Nucleotiden umfassen. Die Modifikationen können die Transkription des Gens selbst, die Translation und/oder die Stabilität der resultierenden mRNA stören, oder sie können dazu führen, dass das Gen für ein inaktives Sialyltransferase-Polypeptid kodiert.

[0098] Die Verfahren sind für die Produktion transgener und chimärer Tiere der meisten Wirbeltier-Spezies von Nutzen. Solche Spezies umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, nicht menschliche Säugetiere, unter anderem Nagetiere, wie z.B. Mäuse und Ratten, Kaninchen, schafartige Tiere, wie z.B. Schafe und Ziegen, schweinartige Tiere, wie z.B. Schweine, sowie Rinder, wie z.B. Rindvieh und Büffel. Verfahren zum Erhalt transgener Tiere werden z.B. in Genetic Engineering of Animals, A. Puhler (Hrsg.), VCH Publ. (1993); Transgenesis Techniques: Principles and Protocols (Methods in Molecular Biology, Band 18), Murphy und Carter (Hrsg.) (1993); sowie Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, CA Pinkert (Hrsg.), Academic Press (1994), beschrieben.

[0099] Ein Verfahren zum Erhalt eines transgenen oder chimären Tieres mit einem deaktivierten Sialyltransferasegen in seinem Genom ist das Kontaktieren befruchteter Oozyten mit einem Vektor, der ein für eine Sialyltransferase kodierendes Polynucleotid umfasst, das modifiziert ist, um eine deaktivierende Modifikation zu enthalten. Bei manchen Tieren, wie z.B. Mäusen, wird die Befruchtung in vivo durchgeführt, und befruchtete Eizellen werden durch einen Eingriff entfernt. Bei anderen Tieren, besonders bei Rindern, wird es bevorzugt, Eizellen aus lebenden oder Schlachthäustieren zu entfernen und die Eizellen in vitro zu befruchten. Siehe DeBoer et al., WO 91/08216. Die In-vitro-Befruchtung ermöglicht die Einführung von Modifikationen in im Wesentlichen synchrone Zellen. Befruchtete Eizellen werden anschließend in vitro gezüchtet, bis ein Präimplantationsembryo erhalten wird, der etwa 16-150 Zellen enthält. Das 16-32-Zellstadium eines Embryos wird als eine Morula bezeichnet. Präimplantationsembryos, die mehr als 32 Zellen enthalten, werden Blastozysten genannt. Diese Embryos zeigen die Entwicklung einer Blastozöhlöhle typischerweise im Stadium der 64 Zellen. Falls gewünscht kann die Gegenwart eines gewünschten deaktivierten Sialyltransferase-Gens in den Embryozellen mittels Verfahren detektiert werden, die dem Fachmann bekannt sind. Verfahren zum Züchten befruchteter Oozyten bis zum Präimplantationsstadium werden von Gordon et al., Methods Enzymol. 101, 414 (1984); Hogan et al., Manipulation of the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, C. S. H. L. N. Y. (1986) (Maus-Embryo); Hammer et al., Nature 315, 680 (1985) (Kaninchen- und Schweine-Embryos); Gandolfi et al., J. Reprod. Fert. 81, 23-28 (1987); Rexroad et al., J. Anim. Sci. 66, 947-953 (1988) (Schaf-Embryos), und Eyestone et al., J. Reprod. Fert. 85, 715-720 (1989); Camous et al., J. Reprod. Fert. 72, 779-785 (1984); sowie Heyman et al., Theriogenology 27, 5986 (1987) (Rinder-Embryos), beschrieben. Manchmal werden Präimplantationsembryos bei bevorstehender Implantation für eine gewisse Zeitspanne gefroren gelagert. Präimplantationsembryos werden in ein geeignetes Weibchen transferiert, was zu der Geburt eines transgenen oder chimären Tieres führt, je nach Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium, in dem das Transgen integriert wird. Chimäre Säugetiere können so gezüchtet werden, dass sie tatsächliche Keimbahn-transgene Tiere bilden.

[0100] Alternativ dazu kann das modifizierte Sialyltransferase-Gen in embryonale Stammzellen (ES) eingeführt werden. Diese Zellen werden aus Präimplantationsembryos erhalten, die in vitro gezüchtet werden. Siehe z.B. ML Hooper, *Embryonal Stem Cells: Introducing Planned Changes into the Animal Germline*, Modern Genetics, Band 1, Int'l. Pub. Distrib. Inc. (1993); Bradley et al., *Nature* 309, 255–258 (1984). Transformierte ES-Zellen werden mit Blastozysten aus einem nichtmenschlichen Tier kombiniert. Die ES-Zellen siedeln sich in dem Embryo an und bilden in manchen Embryos die Keimbahn des resultierenden chimären Tieres. Siehe Jaenisch, *Science* 240, 1468–1474 (1988). Alternativ dazu können ES-Zellen oder somatische Zellen, die einen Organismus neu bilden können („somatische Wiederbesiedelungszellen“), als eine Quelle von Nuclei zur Transplantation in eine entkernte, befruchtete Oozyte verwendet werden, wodurch ein transgenes Tier entsteht. Siehe z.B. Wilmut et al., *Nature* 385, 810–813 (1997).

[0101] Die Einführung des modifizierten Sialyltransferasegens in Rezipientenzellen kann mittels Verfahren erreicht werden, die dem Fachmann bekannt sind. Mit dem modifizierten Gen kann z.B. mittels homologer Rekombination auf den Wildtyp-Sialyltransferase-Locus abgezielt werden. Alternativ dazu kann ein Rekombinasesystem verwendet werden, um den ganzen oder einen Teil eines Locus von Interesse zu deletieren. Beispiele von Rekombinasesystemen umfassen das cre/lox-System von Bakteriophage P1 (siehe z.B. Gu et al., *Science* 265, 103–106 (1994); Terry et al., *Transgenic Res.* 6, 349–356 (1997)) und das FLP/FRT-ortsspezifische Integrationssystem (siehe z.B. Dymecki, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 93, 6191–6196 (1996)). In diesen Systemen werden Stellen, die von der spezifischen Rekombinase erkannt werden, typischerweise an einer Position in das Genom eingeführt, welche den Abschnitt des Gens flankiert, der zu deletieren ist. Die Einführung der Rekombinase in die Zellen katalysiert anschließend die Rekombination, die aus dem Genom die Polynucleotidsequenz deletiert, die von den Rekombinationsstellen flankiert wird. Falls gewünscht, kann man Tiere erhalten, bei denen nur gewissen Zelltypen das Sialyltransferasegen von Interesse fehlt. Siehe z.B. Tsien et al., *Cell* 87, 1317–26 (1996); Brocard et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 93, 10887–10890 (1996); Wang et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 93, 3932–6 (1996); Meyers et al., *Nat. Genet.* 18, 136–41 (1998).

[0102] Die folgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung und nicht der Einschränkung der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 1

Konstruktion und Analyse transgener Mäuse, die bezüglich ST6Gal-Sialyltransferase defizient sind

[0103] Das folgende Beispiel zeigt, dass die Inhibierung der Sialyltransferaseaktivität, die mit der Synthese von Sia6LacNAc assoziiert ist, zu einer Unterdrückung des Immunsystems bei Mäusen führt. Mäuse, die bezüglich Sia6LacNAc defizient waren, wurden durch Deletion des Sialyltransferasegens, das für seine Synthese verantwortlich ist, ST6Gal-I, kreiert. Mäuse, die bezüglich ST6Gal-I defizient waren, schienen größtenteils normal, zeigten jedoch Merkmale einer tiefgehenden Immunsuppression. Beachtenswert war, dass Serumspiegel von IgM signifikant reduziert waren, und die Mäuse waren bezüglich der Produktion von Antikörpern als Antwort auf eine Immunisierung mit T-unabhängigen und T-abhängigen Antigenen deutlich defizient. Als biochemische Korrelate dieses Phänotyps reagierten B-Lymphozyten hinsichtlich einer IgM- und CD40-Vernetzung in überdurchschnittlichem Ausmaß. Diese Studien zeigen, dass die ST6Gal-I-Sialyltransferase und die entsprechende Produktion des Sia6LacNAc-Trisaccharidliganden von CD22 für die normale B-Zellen-Aktivierung essentiell ist.

Materialien und Verfahren

ST6Gal-Gen-Targeting

[0104] Mäuse, die in sich ein mutiertes ST6Gal-I-Gen trugen, wurden nach einer gezielten Deletion des ST6Gal-I-Exon 2, enthaltend die N-terminalen 200 Aminosäuren der kodierten Sialyltransferase, aus embryonalen Stammzellen erzeugt. Der ST6Gal-I-Targeting-Vektor wurde aus einem genomischen 129/Sv-Klon durch Insertieren des 1,9-kb-Acc-I-Bam-HI-Fragments, enthaltend Exon 2 von ST6Gal-I, kodierend für die ersten 200 Aminosäuren, in die Bam-HI-Stelle des pflox-Vektors assembliert. Daneben liegende genomische 129/Sv-ST6Gal-I-Sequenzen wurden durch Subklonieren des 1,8-kb-Nhe-I-Acc-I-Fragments in die Sal-I-Stelle bzw. des Bam-HI-Bam-HI-12-kb-Fragments in die Hind-III-Stelle von pflox hinzugefügt. Zehn µg Not-I-linearisierter Targeting-Vektor wurden in ES-Zellen elektroporiert, und G418-resistente Transfektanten (120 µg/ml), zur homologen Rekombination nach PCR positiv, alle drei loxP-Stellen beibehaltend, wurden mit Cre-Expressionsvektor transfiziert. Nach vier Tagen Gancyclovir-Selektion (2 µM) wurden Subklone isoliert, und jene, die entweder das ST6Gal^f-Allel (B3) oder das ST6Gal-I^Δ-Allel (B9) in sich trugen, wurden mittels Southern-Blotting

mit genomischen loxP- und Hind-III-Hind-III-Sonden bestätigt. B3- und B9-ES-Zellen wurden verwendet, um chimäre Mäuse in C57BL/6-Wirtsembryos zu erzeugen. Die Nachkommen wurden mittels Southern-Blotting mit Bgl-II-verdauter Tail-DNA, an die genomische Hind-III-Hind-III-500-bp-Sonde hybridisiert, einer Genotypisierung unterzogen. Heterozygote Nachkommen wurden mit C57BL/6-Paarungspartnern gepaart, und die Mutationen wurden vor Kreuzungen in diesem Stamm für zumindest zwei Generationen vermehrt, um Homozygoten für Experimente zu produzieren. Die ST6Gal-I-Mutation wurde in der C57BL/6-Inzuchtlinie vor Analysen 3–5 Generationen lang beibehalten (siehe Fig. 1A). Die beschriebenen Phänotypen wurden in darauf folgenden Studien, die mehr als vier Generationen umfassten, an Mäuse gebunden vorgefunden, die den homozygoten ST6Gal^I-Mutantenphänotyp in sich trugen. Mäuse, die für den ST6Gal^I-Genotyp homozygot waren, zeigten keine phänotypischen Konsequenzen und enthielten, wie erwartet, normale Mengen an Sia6LacNAc.

[0105] Die Deletion von ST6Gal-I-Exon 2 führt zu einem Verlust von zytoplasmatischen, Transmembran- und beträchtlichen katalytischen Domänen-Sequenzen, so dass jedes translatierte, trunkierte Enzym ebenfalls nicht in der Lage wäre, in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums und in Golgi einzutreten. Mäuse, die für die ST6Gal^I-Deletion homozygot waren, wurden mit Mendelscher Häufigkeit geboren und schienen während der postnatalen Entwicklung im Großen und Ganzen normal zu sein.

Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierer-Analyse

[0106] Die ST6Gal-I-Funktion wurde in Tests unter Verwendung von SNA- und CD22-Ig-Lectinen getestet, die das Sia₂-6Gal_β1-4GlcNAc-(Sia6LacNAc-)Trisaccharid spezifisch binden, das auf verschiedenen Asparagin-(N)-gebundenen Oligosacchariden zu finden ist. Einzelzellsuspensionen aus der Milz, der Thymusdrüse, den Lymphknoten und dem Knochenmark wurden einer Ammoniumchlorid-Lyse roter Blutkörperchen unterzogen. Die Zellen wurden mit einem Hämozytometer gezählt, und 500.000 Zellen wurden in einer Endvolumeneinheit von 100 µl mit entweder SNA-FITC (5 µg/ml; Vector Laboratories) oder MAL-II-FITC (5 µg/ml; Vector Laboratories) und/oder 1 µl monoklonalem Antikörper oder CD22-Ig-Chimäre 10 Minuten lang markiert. Alle Inkubationen und Waschvorgänge wurden auf Eis in FACS-Puffer durchgeführt (2 % FCS in PBS). Die Zellen wurden unter Verwendung eines „FACScan“-Durchflusszytometers und Cellquest-Software (Becton Dickinson) analysiert. Serum-Isotyp-spezifische Antikörpertiter wurden mittels ELISA unter Verwendung von Platten bestimmt, die mit Anti-Maus-Isotyp-spezifischen Antikörpern überzogen waren. Es wurde eine Standardkurve unter Verwendung von gereinigtem Maus-IgM, -IgA (Sigma) und -IgG₁ (PharMingen) erzeugt, um OD-Werte in µg/ml umzuwandeln. Antikörper und Lectine, die im Verlauf dieser und anderer Studien hierin verwendet wurden, umfassten (alle von PharMingen, falls nicht anders angegeben): Anti-CD3 (2C11), Anti-CD4 (RM4-5), Anti-CD8 (53-6.7), Anti-CD11b-FITC oder -PE (Mac-1, M1/70), Anti-CD21.35 (7G6), Anti-CD22-PE (Cy34.1), Anti-CD23 (B3B4), Anti-CD43 (S7), Anti-CD44 (IM7), Anti-B7.2 (G1.1), Anti-B220-PE (RA3-6B2), Anti-Maus-IgM-Biotin (II/41), Anti-Maus-IgD-FITC (11-26c.2a), Anti-CD24-(HSA)-FITC (M1/69), Anti-CD40-FITC (HM40-3), Anti-CD19-FITC (1D3), Anti-Maus-I-A^b-FITC (AF6-120.1), Anti-Erythroid (Ter-119); Anti-Klasse-I-MHC (KH95), Anti-Ly-6G-(Gr-1-)PE (RB6-8C5) (PharMingen), SNA-FITC, ECA-FITC und PNA-FITC (Vector Laboratories). In FACS-Analysen wurden biotinylierte Antikörper unter Verwendung von Streptavidin-Tri-Color detektiert (CalTag, South San Francisco, CA). Die CD22-hlg-Fusionschimäre war wie in Stamenkovic et al., Cell 66, 1133 (1991), beschrieben.

ST6Gal-Sialyltransferaseaktivitätsmessungen

[0107] Es wurden Gewebeproben in 3 ml 500 mM Saccharose, 1 mM MgCl₂, 1 % Dextran und 5 mM 2-Mercaptoethanol homogenisiert. Nach der Entfernung von Zelltrümmern bei 10.000 × g wurden Membranen mittels Zentrifugierung bei 40.000 U/min in einem Beckman-SW50.1-Rotor für die Dauer von einer Zeitspanne von 1 h isoliert. Membranen wurden in 25 mM Kakodylatpuffer (pH 6,8)/2 % Triton X-100 für eine Zeitspanne von 15 min auf Eis solubilisiert. Die Membran- und zytosolischen Fraktionen (12,5 µl) wurden in 25-µl-Tests mit 25 mM Kakodylat (pH 6,8), 0,4 mM CMP-Sialinsäure (Sigma), 10⁵ cpm CMP-[¹⁴C]-Sialinsäure (170 pmol) (Amersham) und 1 mM LacNAc-Octyl auf Sialyltransferaseaktivität analysiert. Die Reaktionen wurden bei 37°C 1 h lang inkubiert. Produkte wurden von nicht inkorporierter Sialinsäure mittels Chromatographie auf Sep-Pak-C₁₈-Kartuschen (Waters) getrennt, mittels zentrifugaler Evaporation getrocknet, erneut in 50 µl 50-mM-Natriumcitratpuffer (pH 6,0) aufgelöst und nach der Hinzufügung von zwei Einheiten Salmonella-typhimurium-LT2-Sialidase (New England Biolabs) 1 h lang bei 37°C inkubiert. Die Verdauprodukte wurden auf Sep-Pak-C₁₈-Kartuschen aufgebracht, mit 15 ml H₂O gewaschen und mit 5 ml Methanol eluiert. Die Menge an [¹⁴C]-Sialinsäure in den Methanol-Eluaten wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (RackBeta, Pharmacia) gemessen. Es wurde getrennt eine rekombinante, lösliche Form des menschlichen ST6Gal-Enzyms, das in Pichia pastoris produziert wurde, im Sialinsäuretransfer zum LacNAc-Octyl-Akzeptor verwendet, gefolgt von der oben beschriebenen Sialidasebehandlung. Es wurde keine signifikante Spaltung durch den Verlust der Radiomarkierung beob-

bachtet, wodurch die Spezifität der LT2-Sialidase für die $\alpha 2,3$ -Bindung bei Verwendung unter den oben genannten Bedingungen bestätigt wurde. ST6Gal-Aktivitätsmessungen, die mit zytosolischen Fraktionen durchgeführt wurden, zeigten weder bei Wildtyp-(wt-) noch bei Mutanten-Extrakten eine signifikante Aktivität.

B-Zellen-Proliferationstests

[0108] Die B-Lymphozyten-Isolation wurde durch das Unterziehen von Splenozyten oder Lymphknotenzyten-Suspensionen einer Komplement-vermittelten Lyse mit Anti-Thy1.2 (Becton Dickinson), Anti-Ly-6G (GR-1) und Kaninchenkomplement (Accurate Chemicals), gefolgt von einer Polster-Zentrifugierung auf NycoPrep (Life Technologies, Gaithersburg, MD), um Trümmer und tote Zellen zu entfernen, erreicht. Lebensfähige Zellen wurden unter Verwendung von Anti-B220 mittels FACS als $> 90\%$ B-Lymphozyten identifiziert. Äquivalente Anzahlen an B-Zellen eines jeden Genotyps (1×10^5) wurden in vollständigem RPMI-1640-Medium, enthaltend 2-Mercaptoethanol (0,1 mM), 10 % FCS und L-Glutamin, mit den angegebenen Konzentrationen von Ziegen-F(ab')₂-Anti-Maus-IgM-Antiserum (Jackson, West Grove, PA), Anti-CD40 mit oder ohne IL-4 (Genzyme) oder Lipopolysaccharid (LPS)(Sigma) gezüchtet. Die Proliferation wurde mittels [³H]-Thymidin-Inkorporierung (2,5 µCi pro Well) während der letzten 16 h einer 64-h-Testperiode gemessen.

Calcium-Messungen

[0109] Es wurden Einzelzellsuspensionen von Splenozyten isoliert und einer Ammoniumchlorid-Erythrozyten-Lyse unterzogen. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung eines Hämozytometers gezählt, und 10^7 Zellen wurden mit 10 µM Indo-1-AM-Ester (Molecular Probes) bei 37°C 30 Minuten lang in 1 ml vollständigem RPMI-1640-Medium inkubiert. Die Zellen wurden in FACS-Puffer gewaschen und mit FITC-konjugiertem Anti-B220 (PharMingen) 10 Minuten lang bei Raumtemperatur gefärbt, erneut gewaschen und in 1 ml vollständigem RPMI-1640-Medium, enthaltend 10 mM Hepes (pH 7,4), resuspendiert. Zweihundert Mikroliter dieser Suspension wurden zu 750 µl RPMI-Hepes-Medium hinzugefügt, und B220⁺-Zellen wurden mittels FACS unter Verwendung einer Coulter-Elite (Coulter) mit MULTITIME™-Software (Phoenix Flow Systems, San Diego) analysiert. Grundlinien-Fluoreszenzverhältniswerte (525/405 nm) wurden vor der Hinzufügung der Antikörper eine Minute lang gemessen. Die Endkonzentrationen von verwendetem Ziegen-F(ab')₂-Anti-Maus-IgM lagen bei 10 µg/ml und 30 µg/ml.

Protein-Phosphotyrosin-Analysen

[0110] Milz-B-Zellen wurden mittels Komplement-vermittelter Lyse (siehe oben) isoliert, und es wurden 5×10^5 isolierte B-Zellen in 50 µl RPMI-1640-Medium mit 0,5 % FCS resuspendiert. Die Zellen wurden vor der Stimulierung mit 10 µl Ziegen-F(ab')₂-Anti-Maus-IgM (120 µg/ml) auf 37°C erwärmt. Zu den angegebenen Zeiten wurden 15 µl Lyse-Puffer hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 1 % Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Na₂MoO₄, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin, 2 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor und 40 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid zu ergeben. Extrakte ganzer Zellen, die 1×10^5 Milz-B-Zellen darstellten, wurden auf einem SDS/10%-PAGE-Gel laufen gelassen und auf Nitrozellulose transferiert. Proteine, die am Tyrosin phosphoryliert waren, wurden mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) durch Immunblotting detektiert.

Immunisierungen und Serum-Antikörper-Tests

[0111] Mäusen wurde im Vorhinein Blut abgenommen, um Präimmun-Sera zu erhalten, anschließend wurden sie mit einer i.p.-Injektion mit entweder 10 µg oder 100 µg Dinitrophenyl-(DNP)-Keyhole-Limpet-Hämocyanin-(KLH)(Calbiochem) in vollständigem Freund-Adjuvans oder mit 0,1 µg oder 10 µg dNP-Ficoll (Biosearch) in PBS immunisiert. Serum wurde zu den angegebenen Zeiten abgenommen, und die Anti-DNP-Titer wurden mittels ELISA unter Verwendung von Platten bestimmt, die mit 20 µg DNP-BSA überzogen und mit 10 % FCS in PBS blockiert wurden. Mäuse, die das DNP-KLH-Antigen erhielten, bekamen zu den angegebenen Zeiten eine Boosterdosis mit derselben Menge des Antigens in vollständigem Freund-Adjuvans. Sera wurden auf verschiedene Konzentrationen verdünnt und unter Verwendung Anti-Maus-Isotyp-spezifischer Antikörper, die an alkalische Phosphatase konjugiert waren (für IgM, Sigma; für IgG₁, Caltag; für IgG₃, Southern Biotechnology Associates), analysiert. Die OD₄₀₅-Werte wurden unter Verwendung eines Mikroplatten-Lesegeräts (Molecular Devices) erhalten. Resultate, die in **Fig. 4** gezeigt werden, umfassen die angegebene Sera-Verdünnung im linearen Bereich für die erhaltenen OD₄₀₅-Werte.

[0112] ST6Gal-Allele wurden in embryonalen Stammzellen mittels homologer Rekombination und Cre-Rekombinase-Wirkung mutagenisiert (**Fig. 1A** und **Fig. 1B**). Um eine systematische Mutation zu erreichen, wurde Exon 2 zur Deletion ausgewählt. Dieses Exon enthält die N-terminalen 200 Aminosäuren und über 50 % der für ST6Gal kodierenden Sequenz. Die Deletion von Exon 2 führt zu einem Verlust von zytoplasmatischen, Transmembran- und beträchtlichen katalytischen Domänensequenzen, so dass jedes resultierende, stabil translatierte, trunkierte und aktive Enzym nicht in der Lage wäre, in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums und den Golgi-Apparat einzudringen. Mäuse, die für das deletierte ST6Gal^Δ-Allel homozygot waren, wurden mit normaler Häufigkeit geboren, waren fruchtbar und zeigten bezüglich Gewicht und zur Schau gestelltem Verhalten keine Anomalien (**Fig. 1B** und Daten nun dargestellt). Histologische Studien verschiedener Gewebe, unter anderem der Leber, des Gehirns, der Nieren, der Milz und der Thymusdrüse, waren unauffällig. Zusätzlich dazu wurde ein normales hämatologisches Profil, das Leukozyten, Erythrozyten und Blutplättchen umfasst, bei peripheren Blutproben beobachtet. Enzymatische Studien von Leber- und Splenozyten-Extrakten unter Verwendung des Galβ1-4GlcNAc-Octyl-Akzeptors (siehe Materialien und Verfahren) zeigten, dass Mäuse, die für das ST6Gal^Δ-Allel homozygot waren, bezüglich der ST6Gal-Aktivität defizient waren (Tabelle 1), was darauf hindeutet, dass die Exon-2-Deletion zu einer Nullmutation führte.

[0113] Tabelle 1: ST6Gal-Aktivitätsmengen in Membranen, die von Wildtyp-(wt/wt-) und homozygoten Mutanten-(Δ/Δ-)ST6Gal-Genotypen abstammen.

ST6Gal-Aktivität, pmol/min pro mg Protein		
Genotyp	Leber	Splenozyten
wt/wt	13,4 ± 1,0	33,1 ± 9,5
Δ/Δ	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2

[0114] Die Expression des ST6Gal-Produkts wurde unter Verwendung des von Sambucus nigra abstammenden Lectins SNA und einer rekombinanten löslichen CD11-Ig-Lectin-Chimäre untersucht, die beide das Sia6LacNAc-Trisaccharid mit hoher Spezifität binden (Powell et al., J. Biol. Chem. 268, 7019–7027 (1993); Sgroi et al., J. Biol. Chem. 268, 7011–7018 (1993); Powell & Varki et al., J. Biol. Chem. 269, 10628–10636 (1994)). Im Gegensatz zu den analysierten erythroiden und myeloischen Zellen wurde von Lymphozyten herausgefunden, dass sie Zelloberflächen-Sia6LacNAc in hohem Ausmaß exprimierten (**Fig. 1C**). Lymphozyten von Mäusen, die für die ST6Gal^Δ-Mutation homozygot waren, waren bezüglich der Bindung an SNA und CD22-Ig defizient, wohingegen Mäuse, die für das loxP-flankierte ST6Gal^F-Allel homozygot waren, normale Mengen an Sia6LacNAc auf ihren Zelloberflächen exprimierten (**Fig. 1C** und Daten nicht dargestellt). Mengen von α2-3-gebundenen Sialinsäuren wurden unter Verwendung des von Maackia amurensis abstammenden Lectins MAL-II sichtbar gemacht. Es wurden dadurch keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Mengen an α2-3-gebundener Sialinsäure unter Lymphoidzellen beobachtet, die aus Mäusen isoliert wurden, die für das ST6Gal^Δ-Allel homozygot waren (**Fig. 1C**). Reste der SNA- oder CD22-Ig-Bindung oder eine SNA- oder CD22-Ig-Bindung in geringem Ausmaß kann die Gegenwart von Siaα2-6GalNAc auf O-Glycanen widerspiegeln (Hanasaki et al., J. Biol. Chem. 270, 7533–7542 (1995)), obwohl es auch im Bereich des Möglichen bleibt, dass zusätzliche Enzyme existieren, die geringe Mengen an Sia6LacNAc produzieren. Trotzdem führt die im ST6Gal-Locus erzeugte Deletion zu einem Verlust an ST6Gal-Aktivität und einer Defizienz bezüglich der Sia6LacNAc-Produktion auf der Zelloberfläche, was im Einklang mit der beschriebenen biochemischen Rolle von ST6Gal und seiner Deaktivierung bei Mäusen steht, die für das ST6Gal^Δ-Allel homozygot sind.

[0115] Sia6LacNAc-defiziente Mäuse enthielten normale Anzahlen von myeloischen Gr-1⁺-, erythroiden Ter-119⁺-, lymphoiden B220⁺-B-Zellen und lymphoiden (CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-) T-Zellen in der Thymusdrüse, der Milz, den Lymphknoten und dem Knochenmark. Die B-Lymphozytenentwicklung im Knochenmark von ST6Gal-defizienten Mäusen blieb unverändert. Der Prozentsatz von Pro-B-Zellen im ST6Gal-defizienten Knochenmark (B220^{lo} CD43⁺, Hardy et al., J. Exp. Med. 173, 1213–1225 (1991)) war normal (**Fig. 2A**, Gate a). Weiters wurde die Häufigkeit unreifer B-Zellen (B220^{lo} Ig-M^{int}, Carsetti et al., J. Exp. Med. 181, 2129–2140 (1995)) durch die ST6Gal-Deaktivierung nicht beeinträchtigt (**Fig. 2A**, Gates b und c). Auf ähnliche Art und Weise wurden keine statistisch signifikanten Veränderungen im Übermaß reifer B-Zellen im Mark (B220^{hi} IgM^{int} und B220^{hi} HSA^{lo}, Verweis: Carsetti et al., s.o.; **Fig. 2A**, Gates e und f) oder in der zuvor definierten B-Zellen-Übergangspopulation, die einer Reifung und einer negativen Selektion unterzogen wurde (B220^{lo-hi} IgM^{hi}, Carsetti et al., s.o.; **Fig. 2A**, Gate d), gefunden.

[0116] Obwohl das B-Lymphozyten-Übermaß und deren Entwicklung bei SiaoLacNAc-defizienten Mäusen

unverändert schien, zeigten ihre B-Zellen stets Reduktionen bei Zelloberflächen-IgM und -CD22. Obwohl die HSA-Mengen nicht beeinträchtigt wurden, führte die ST6Gal-Defizienz zu Peak-IgM-Mengen, die bei 65 % der Kontrollen lagen, und zu CD22-Mengen, die bei 38 % der Normalwerte lagen ([Fig. 2A](#), rechts). Es gab jedoch keine Beweise für eine B-Lymphozyten-Aktivierung in Analysen der Zelloberflächenaktivierungsmarker CD44, 67.2 und der Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Klasse II (I-A^b) ([Fig. 2B](#)). Zusätzlich dazu blieb die CD40-Expression mit ST6Gal-Defizienz unverändert ([Fig. 2B](#)). Zusätzliche Analysen von Milz-B-Zellen von Sia6LacNAc-defizienten Mäusen zeigten eine normale Expression von Zelloberflächen-CD19, -CD21, -CD23 und -CD45RA⁺ (B220) (Daten nicht dargestellt).

[0117] Reduktionen, die bei Zelloberflächen-IgM und -CD22 beobachtet wurden, führten zu Analysen von Serum-Ig-Spiegeln, um anfangs die B-Zellen-Funktion bei nicht immunisierten Mäusen zu untersuchen. Sia6LacNAc-defiziente Mäuse zeigten signifikante Rückgänge der IgM-Mengen auf einen Mittelwert von 37 % des Normalwerts, während statistisch unveränderte Mengen von IgA und IgG beobachtet wurden ([Fig. 2C](#)). Obwohl die Sia6LacNAc-Defizienz die Lymphozytenentwicklung oder deren Transport nicht verhindert, könnten dysfunktionale B-Lymphozyten in Mäusen zu finden sein, die für das ST6Gal^Δ-Allel homozygot sind.

[0118] Die B-Lymphozyten-Immunaktivierung erfolgt durch erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung und Ca²⁺-Mobilisierung, die zu Genaktivierung und -proliferation führen, die für eine wirksame humorale Immunität notwendig sind (Campbell & Sefton, EMBO J. 9, 2125–21312 (1990); Gold et al., Nature 345, 810–813 (1990); Plieman et al., Immunol. Today 15, 393–399 (1994); Cooke et al., J. Exp. Med. 179, 425–438 (1994)). B-Lymphozyten aus Kontroll- und ST6Gal-defizienten Mäusen wurden aus der Milz oder den Lymphknoten isoliert und mittels Vernetzung von Zelloberflächen-IgM, -CD40 oder der Zugabe von LPS aktiviert. Es wurde herausgefunden, dass die Proliferation von ST6Gal-defizienten B-Lymphozyten als Antwort auf diese Stimuli signifikant reduziert war ([Fig. 3A](#)). Interessanterweise wurde eine normale Reaktionsfähigkeit beobachtet, als Interleukin-4 (IL-4) während der Stimulierung in verschiedenen und suboptimalen Konzentrationen stimulatorischer Anti-IgM- oder Anti-CD40-Antikörper vorhanden war. IL-4 fördert den Ig-Klassenwechsel von IgM zu IgG und IgE (WE Paul, Blood 77, 1859–1870 (1991); Coffman et al., Adv. Immunol. 54, 229–270 (1993)) und kann mit einer suboptimalen Antigen-Rezeptor-Aktivierung, wahrscheinlich durch Co-Aktivierung von „stromab“ befindlichen, zytosolischen und nuklearen Signalübertragungsvorkommnissen, eine Synergie eingehen. Resultate, die mit IL-4 erhalten wurden, zeigen die innere Fähigkeit von ST6Gal-defizienten B-Lymphozyten, unter manchen Bedingungen normal zu antworten; die Aktivierung von N-Lymphozyten durch den Antigen-Rezeptor-Komplex und nach der CD40-Ligation wird jedoch nachteilig beeinflusst.

[0119] Die Wirksamkeit früher Signalübertragungsvorkommnisse wurde durch das Messen der Ca²⁺-Mobilisierung und der Phosphotyrosin-Akkumulierung direkt nach der Anti-IgM-Stimulierung untersucht. Die zytosolische Mobilisierung von Ca²⁺ aus intrazellulären Kompartimenten tritt schnell nach der IgM-Vernetzung durch Hydrolyse von Inositol-Phospholipiden auf (Plieman et al., s.o., Cooke et al., s.o.). B-Lymphozyten aus ST6Gal-Null-Mäusen konnten Ca²⁺ nicht so wirksam wie Kontrolltiere mit einer Verringerung von sowohl der Geschwindigkeit der Ca²⁺-Mobilisierung als auch der Menge von mobilisiertem Ca²⁺ mobilisieren ([Fig. 3B](#)). ST6Gal-defiziente B-Lymphozyten wurden als Nächstes auf ihre Fähigkeit analysiert, Phosphotyrosin auf zellulären Proteinen als Antwort auf die Anti-IgM-Stimulierung zu akkumulieren. CD22 befindet sich unter jenen Proteinen, die am Tyrosin nach der B-Zellen-Antigen-Rezeptor-Aktivierung phosphoryliert wurden, und von dieser Phosphorylierung wird berichtet, dass sie durch SH2-Bindungswechselwirkungen die SHP-Tyrosin-Phosphatase und andere Effektormoleküle an den Antigen-Rezeptor-Komplex zieht (Campbell & Klinman, Eur. J. Biochem. 25, 1573–1579 (1995); Law et al., J. Exp. Med. 183, 547–560 (1960)). Die Phosphotyrosin-Akkumulierung auf CD22 wurde nach der Anti-IgM-Stimulierung auf ST6Gal-defizienten B-Zellen beobachtet (reduzierte Mengen an Zelloberflächen-CD22 ([Fig. 2](#)) erfordern jedoch zusätzliche quantitative Studien bezüglich der CD22-Lokalisierung und des relativen Phosphorylierungspotentials). Trotzdem wurde unter den gesamten zellulären Proteinen, die nach der Anti-IgM-Stimulierung analysiert wurden, eine Reduktion der Phosphotyrosin-Akkumulierung auf einem Protein festgestellt, das bei etwa 42 kDa migrierte, und zwar mit verschiedenen Veränderungen auf Proteinen mit etwa 37 kDa ([Fig. 3C](#)).

[0120] Auf die potentielle physiologische Bedeutung dieser Veränderungen wurde durch die Analyse der Fähigkeit von ST6Gal-defizienten Mäusen eingegangen, eine Immunantwort auf T-unabhängige und T-abhängige Antigene zu produzieren, wie durch die Antikörperproduktion beurteilt. Kontroll- und ST6Gal-defiziente Mäuse wurden entweder mit DNP-Ficoll (T-unabhängiges Antigen) oder mit DNP, an (KLH) konjugiert (T-abhängiges Antigen), immunisiert. Anti-DNP-Antikörpertiter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung gemessen. Mäuse, die bezüglich Sia6LacNAc defizient waren, konnten nach der Immunisierung mit dem T-unabhängigen Antigen DNP-Ficoll durchwegs keine hohen Titer von Anti-DNP-Antikörper erzeugen ([Fig. 4A](#)). Kontrollmäuse produzierten hohe Anti-DNP-IgM-Titer innerhalb von 7–10 Tagen nach der Immuni-

sierung, wohingegen Mäuse, denen ein funktionales ST6Gal-Allel fehlte, bezüglich Anti-DNP-IgM- und -IgG₁-Antikörper defizient waren, und eine reduzierte Antwort war klar ersichtlich, die Anti-DNP-IgG₃-Antikörper-Produktion involvierte. Als Antwort auf die Immunisierung mit dem T-abhängigen Antigen DNP-KLH waren ST6Gal-defiziente Mäuse erneut stark in ihrer Fähigkeit eingeschränkt, einen Anti-DNP-IgM-Antikörper zu produzieren ([Fig. 4B](#)). Nach einer zweiten „Booster“-Immunisierung mit DNP-KLH ergaben Sia6LacNAc-defiziente B-Zellen immer noch reduzierte Anti-DNP-IgG₁-Antikörper-Mengen und erzeugten keine signifikanten Anti-DNP-IgG₃-Antikörper. Aus diesen Studien geht klar und deutlich hervor, dass Mäuse, die bezüglich des Sia6LacNAc-Trisaccharids defizient sind, in ihrer Fähigkeit gehindert werden, Immunantworten zu erzeugen.

Diskussion

[0121] Die Effektorrolle der ST6Gal-Sialyltransferase in der B-Lymphozyten-Aktivierung offenbart ein zusätzliches Ausmaß biologischer Kontrolle, die auf der Immunzellenoberfläche durch Oligosaccharidvariation stattfindet. Die Produktion des Sia6LacNAc-Trisaccharids scheint für die B-Lymphozytenentwicklung nicht erforderlich zu sein, ist jedoch für wirksame Immunantworten notwendig. Obwohl B-Zellen von ST6Gal-defizienten Mäusen eine signifikante Reduktion der CD22-Zellenoberflächenmengen aufweisen, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass dies die Ursache der beobachteten Immundefizienzen ist, da eine reduzierte CD22-Expression bei Mäusen, die ein heterozygotes CD22-Null-Allel in sich trugen, die B-Zellen-Immunfunktion nicht beeinträchtigte (O'Keefe et al., *Science* 274, 798–801 (1996); Otipoby et al., *Nature* 384, 634–637 (1996); Sato et al., *Immunity* 5, 551–562 (1996); Nitschke et al., *Curr. Biol.* 7, 133–143 (1997)). Weiters weisen ST6Gal-defiziente Mäuse ganz im Gegensatz zu jener, von der bei CD22-defizienten Mäusen berichtet wird, eine schwerwiegende und weit verbreitete Immundefizienz auf. Die Resultate der Erfinder zeigen, dass die Funktion von ST6Gal bestimmte und einzigartige Aktivitäten bezüglich der Regulation der Immun-Reaktionsfähigkeit umfasst, die sich gegebenenfalls nur teilweise mit der Funktion von CD22 überlappen.

[0122] Die B-Zellen-Aktivierung und die Annahme eines anergischen Zustands reduziert die Zelloberflächen-IgM-Mengen, und von der Aktivierung wird ebenfalls berichtet, dass sie CD22 hinunterreguliert (Pezzutto et al., *J. Immunol.* 140, 1791–1795 (1988); Dorken et al., *J. Immunol.* 136, 4470–4479 (1988)). Sia6LacNAc-defiziente B-Zellen zeigen Merkmale, die eine vorangegangene abnorme Antigen-Rezeptor-Signalübertragung widerspiegeln können, die zu einem anergischen Phänotyp führt. Reduzierte IgM-Mengen auf ST6Gal-defizienten B-Lymphozyten ähneln dem anergischen Phänotyp, der sich nach der naiven B-Zellen-Stimulierung durch endogene Antigen-Produktion entwickelt (Goodnow, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 93, 2264–2271 (1996)). Trotzdem zeigen Sia6LacNAc-defiziente B-Zellen keinen aktivierten Phänotyp. Eine Hypothese über die mögliche normale Funktionsweise von Sia6LacNAc in reifen B-Lymphozyten erfordert Wissen bezüglich der Sia6LacNAc-Expression.

[0123] Eine Untergruppe von sekretierten oder Zelloberflächen-Lymphoid-Glykoproteinen trägt den Sia6LacNAc-Liganden von CD22 in sich. Manche dieser wurden identifiziert und umfassen IgM, CD45 und CD22 selbst (Stamenkovic et al., *Cell* 66, 1133–1144 (1991); Braesch-Anderson & Stamenkovic, *J. Biol. Chem.* 269, 11783–11786 (1994); Hanasaki et al., *J. Biol. Chem.* 270, 7533–7542 (1995); Hickman et al., *J. Biol. Chem.* 247, 2156–2163 (1972); Sato et al., *Biochemistry* 32, 12694–12704 (1993)). Obwohl von einer selektiven, hochgradig affinen Bindung von CD22 an lösliches IgM berichtet wurde (Hanasaki et al., s.o.), ist den Berichten zufolge die Stöchiometrie der Zelloberflächen-CD22-IgM-Wechselwirkung sowohl vor als auch nach der B-Zellen-Stimulierung gering (LePrince et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90, 3236–3240 (1993); Hanasaki et al., *J. Biol. Chem.* 270, 7543–7550 (1995); Peaker et al., *Eur. J. Biochem.* 23, 1358–1363 (1993)). Da die in der letzten Experimentart verwendeten Bedingungen die Lectinbindung dissoziieren können, können homotypische und heterotypische Zellwechselwirkungen, die Antigen-Rezeptoren von B- und T-Lymphozyten involvieren, normalerweise bei CD22-CD22- oder CD22-CD45-Sia6LacNAc-abhängiger Bindung auftreten. Innerhalb von B-Zellen kann der Verlust von Sia6LacNAc auf IgM und CD22 dadurch zu einer abnormen Antigen-Rezeptor-Komplex-Anordnung auf der Zelloberfläche führen. Vielleicht spielt Sia6LacNAc eine Rolle in der strukturellen Stabilisierung eines oder mehrerer B-Lymphozyten-Membranmoleküle, die an der Antigen-Rezeptor-Signalübertragung beteiligt sind. Die beobachteten Reduktionen der Serum-IgM- und Zelloberflächen-CD22-Spiegel könnten eine destabilisierende Wirkung einer Sia6LacNAc-Defizienz, unter anderem eine erhöhte Clearance von Serum-Glykoproteinen, widerspiegeln.

[0124] Eine veränderte Protein-Phosphotyrosin-Akkumulierung nach der ST6Gal-defizienten B-Zellen-Aktivierung impliziert dennoch eine Dysfunktion von Signalübertragungsvorgängen, die vom B-Zellen-Antigen-Rezeptor-Komplex ausgeht. Die Identifikation veränderter Phosphoproteine würde weiters die Mechanismen definieren, mit denen ST6Gal in der B-Zellen-Aktivierung wirkt. Solche Unsicherheiten sind häufig und existieren momentan hinsichtlich des Mechanismus der CD22-Funktion (Cyster und Goodnow, *Immunity* 6,

509–517 (1977)). Es ist wichtig, zu verstehen, wie Moleküle, die bezüglich der Signalübertragung kollaborieren, in der Lage sind, sich mit dem B-Zellen-Antigen-Rezeptor-Komplex in einem normalen Membranumfeld ohne kovalente Bindungswechselwirkungen zu assoziieren.

[0125] Die Position von Oligosacchariden, wie z.B. Sia6LacNAc, auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran zeigt, dass sich solche Moleküle dahingehend entwickelt haben, dass sie in Zell-Zell- und Rezeptor-Untereinheits-Wechselwirkungen wirken (J. D. Marth, *Glycoconjugate J.* 11, 3–8 (1994); Varki & Marth, *Semin. Dev. Biol.* 6, 127–138 (1995)). Zusätzlich dazu wurde herausgefunden, dass die Funktionen von Glykosyltransferasen und Glykosidasen in manchen Fällen auf eine bestimmte Zelllinie fokussiert waren (Chui et al., *Cell* 90, 157–167 (1997)). In diesen Untersuchungen haben die Erfinder die bevorzugte Akkumulierung von Sia6LacNAc auf Lymphoidzellen-Oberflächen unter hämatopoetischen Zelltypen beobachtet. Weiters haben die Erfinder eine scheinbar zelltypspezifische Rolle von ST6Gal und Sia6LacNAc bei der Regulierung der B-Lymphozyten-Immunfunktion beobachtet. Bis jetzt wurden keine Beweise für eine T-Zellen-Dysfunktion unter Verwendung von In-vitro-Anti-CD3-Aktivierungsverfahren gefunden. Weitere Forschungen bezüglich des Verstehens der B-Lymphoid-Rolle von Sia6LacNAc sollten den Grund für die schwerwiegendere und weit verbreitete Immundefizienz beleuchten, die bei Sia6LacNAc-defizienten Mäusen im Vergleich zu Studien mit CD22-Null-Mäusen beobachtet wurde. Es ist möglich, dass die Gegenwart von CD22 bei Fehlen seines Liganden durch ungeeignete Lokalisierung und Sequestrierung intrazellulärer Signalmoleküle besonders schädlich für die B-Lymphozytenfunktion sein kann. Alternativ dazu gibt es eine Redundanz der CD22-Funktion, die durch andere, bis jetzt nicht identifizierte Sia6LacNAc-bindende Lectine vermittelt wird, die auf der B-Lymphozyten-Zelloberfläche agieren und die auch wichtige Rollen in der Lymphozyten-Adhäsion und der intrazellulären Signalübertragung spielen. Diese letztere Hypothese spiegelt das biologische Paradigma wider, das als Beispiel des Sialyl-Lewis-X-Oligosaccharids und der E-, L- und P-Selectine in der Entzündungsantwort dargestellt wird, die eine Leukoyzten-Intravasation umfasst (Butcher und Picker, *Science* 272, 60 (1996); Maly et al., *Cell* 86, 643 (1996); Frenette et al., *Cell* 84, 573–574 (1996)). Während diese Möglichkeiten getestet werden können, bietet der immundefiziente Phänotyp von Mäusen, denen Sia6LacNAc fehlt, eine rationale Erklärung zur Verwendung einer Sia6LacNAc-abhängigen Signalübertragung in der B-Zellen-Aktivierung und der Sia6LacNAc-Expression zur Steuerung der Immun-Dysfunktion.

Beispiel 2

Konstruktion und Analyse transgener Mäuse, die bezüglich der Sialyltransferase ST3Gal defizient sind

[0126] Die Produktion ST3Gal-I-defizienter Mäuse wurde auf ähnliche Art und Weise erreicht wie die Produktion einer ST6Gal-Defizienz bei Mäusen, wie sie in Beispiel 1 beschrieben wurde. Der wesentliche Unterschied war die Positionierung der Mutation (d.h. der ST3Gal-I-Locus und nicht der ST6Gal-Locus). Die Mutation des ST3Gal-I-Allels umfasste die Deletion eines Exons, das für die ST3Gal-I-Enzymproduktion essentiell ist (siehe [Fig. 5](#)). Während eine beliebige Art der Insertionsmutagenese auch dasselbe Endresultat ergeben würde (d.h. ST3Gal-I-Defizienz), entschieden sich die Erfinder dafür, das Gen mittels Cre-Rekombination mit einer Deletion von Exon 2 zu mutieren. Eine Positionierung von loxP-Stellen in einem genomischen Kontext und um Exon 2 herum wird in [Fig. 5A](#) dargestellt. In [Fig. 5B](#) wird das modifizierte ST3Gal-I-Allel bei seinem Auftreten in embryonalen Stammzellen nach der homologen Rekombination dargestellt. Anschließend ([Fig. 5C](#)) stellte die Cre-Rekombination von ES-Zellen, die für das $F^{[tkneo]}$ -Allel heterozygot sind, gefolgt von einer Ganciclovir-Selektion, die Typ-1- und Typ-2-Deletionen bereit. ES-Zellen, die die Typ-1-Deletion in sich tragen, wurden verwendet, um Mäuse zu produzieren, denen die ST3Gal-I-Funktion fehlt.

[0127] Mäuse, denen ein Wildtyp-ST3Gal-I-Allel fehlte, entwickelten sich normal und schienen in einer pathogenfreien Umgebung im Großen und Ganzen unverändert zu sein. Als ein Resultat der ST3Gal-I-Defizient hatten diese Mäuse jedoch den Großteil ihrer reifen CD8⁺-T-Zellen verloren. Diese T-Zellen waren in peripherem Blut defizient, und sie waren auch in sekundären Lymphoidorganen stark reduziert (siehe [Fig. 6](#)). Die verbleibenden CD8⁺-T-Zellen schienen nicht lebensfähig zu sein, da sie bei der Isolation hochgradig apoptotisch waren. Es gab nur einen sehr geringen Rückgang der CD4⁺-Helfer-T-Zelllinie. Diese Resultate zeigen, dass die Defizienz von ST3Gal-I die Häufigkeit und Funktion zytotoxischer T-Zellen dramatisch verringert. Daher würde eine Inhibierung des ST3Gal-I eine ähnliche Wirkung auf CTL-Immunantworten haben.

[0128] Die oben genannten Beispiele dienen der Veranschaulichung der Erfindung, jedoch nicht der Einschränkung ihres Umfangs. Andere Varianten der Erfindung sind für den Fachmann leicht ersichtlich.

Patentansprüche

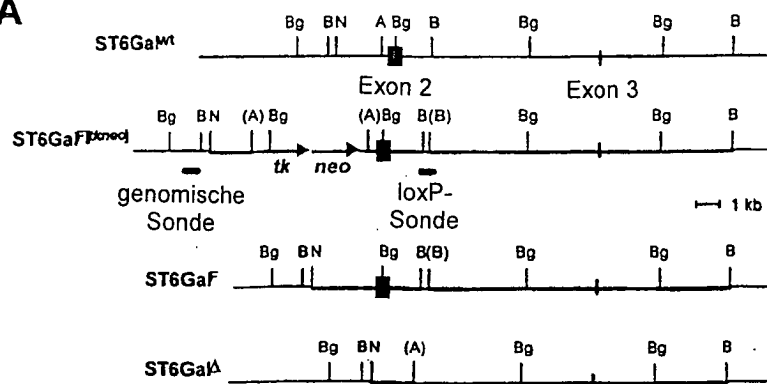
1. Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Inhibitors von Sialyltransferase zur Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung von ungeeigneter Aktivierung des Immunsystems bei einer Autoimmunantwort, einer Alлотransplantatabstoßungsantwort, einer allergischen Reaktion oder einer Nahrungsmittelüberempfindlichkeit, worin der Inhibitor ein Analogon eines Substrats für die Sialyltransferase ist, worin der Inhibitor die Mengen von sialyliertem Oligosaccharid reduziert, das auf Lymphoidzellen im Säugetier gegenwärtig ist, und worin das sialylierte Oligosaccharid eine Formel umfasst, die aus der Gruppe bestehend aus Sia α 2,6Gal- und Sia α 2,3Gal- ausgewählt ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin das sialylierte Oligosaccharid eine Formel umfasst, die aus der Gruppe bestehend aus Sia α 2,6Gal β 1,4GlcNAc und Sia α 2,3Gal β 1,3GalNAc ausgewählt ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Sialyltransferaseinhibitor ein Analogon eines Donorsubstrats ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3, worin das Analogon eines Donorsubstrats ein Zuckernucleotid oder Analogon davon ist.
5. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Zuckernucleotid ein Analogon von CMP-Sialinsäure ist.
6. Verwendung nach Anspruch 3, worin das Analogon des Donorsubstrats ein Nucleotid oder Nucleotidanalogue ist.
7. Verwendung nach Anspruch 3, worin das Analogon des Donorsubstrats ein Analogon von Sialinsäure ist.
8. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Sialyltransferaseinhibitor ein Analogon eines Akzeptorsubstrats ist.
9. Verwendung nach Anspruch 8, worin das Analogon eines Akzeptorsubstrats ein Analogon von LacNAc ist, in welchem der Galactoserest durch 6-Desoxygalactose oder 3-Desoxygalactose ersetzt ist.
10. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Säugetier ein Mensch ist.
11. Verwendung nach Anspruch 1, worin die ungeeignete Aktivierung des Immunsystems eine B-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort ist und das sialylierte Oligosaccharid eine Formel Sia α 2,6Gal-umfasst.
12. Verwendung nach Anspruch 1, worin die ungeeignete Aktivierung des Immunsystems eine T-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort ist und das sialylierte Oligosaccharid eine Formel Sia α 2,3Gal-umfasst.
13. Verwendung nach Anspruch 12, worin die T-Lymphozyten CD8⁺-T-Lymphozyten sind.
14. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Sialyltransferase aus der Gruppe bestehend aus einer ST6Gal-Sialyltransferase und eine ST3Gal-I-Sialyltransferase ausgewählt ist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

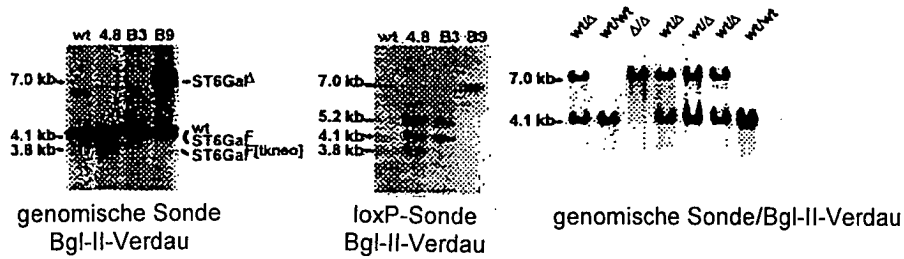
Anhängende Zeichnungen

Figur 1

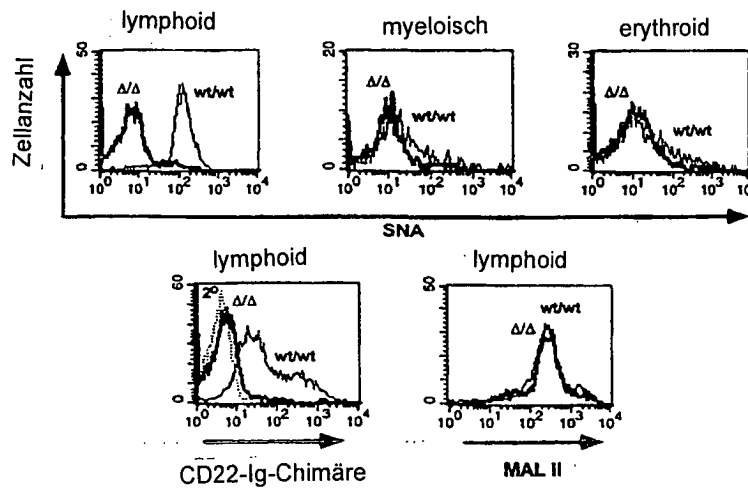
1A



1B



1C



Figur 2.

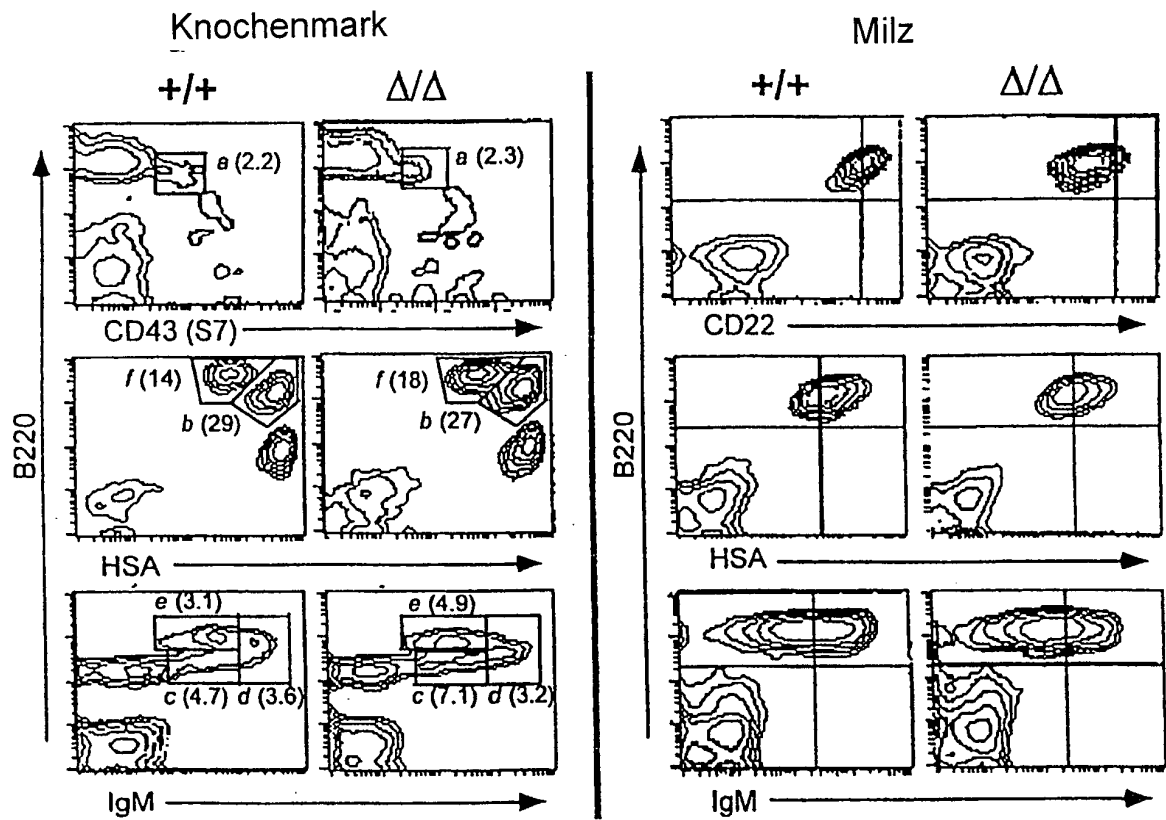


Fig. 2A

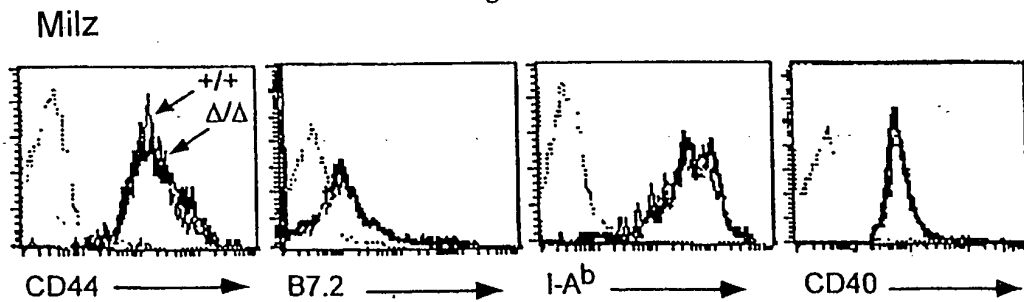


Fig. 2B

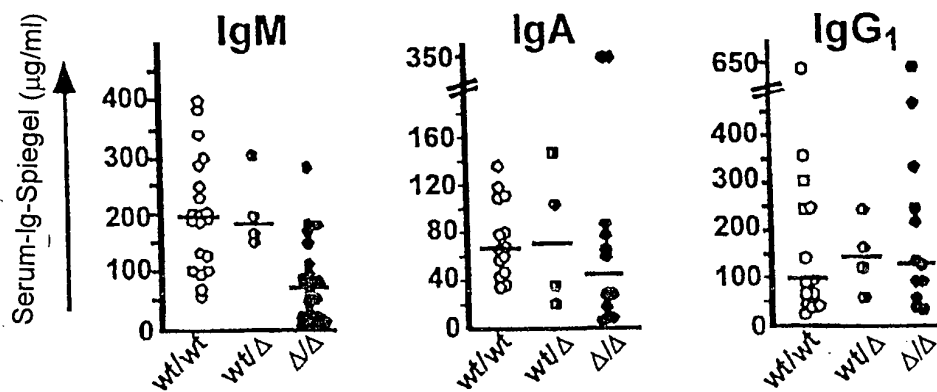
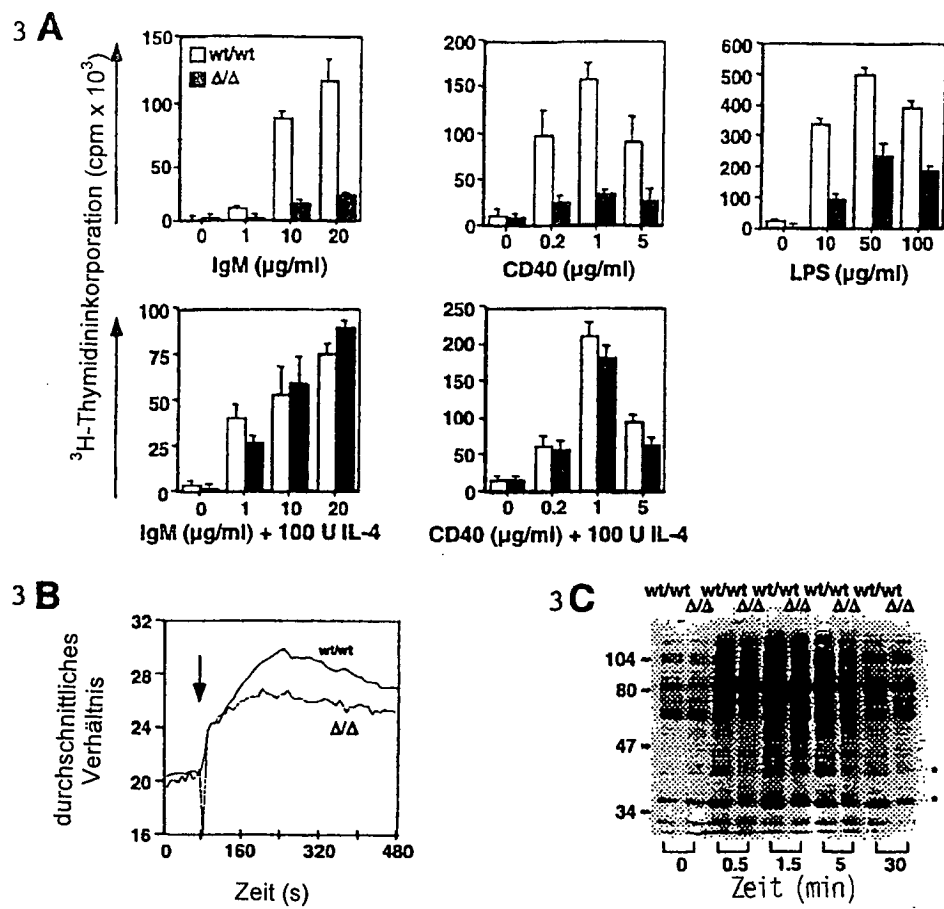
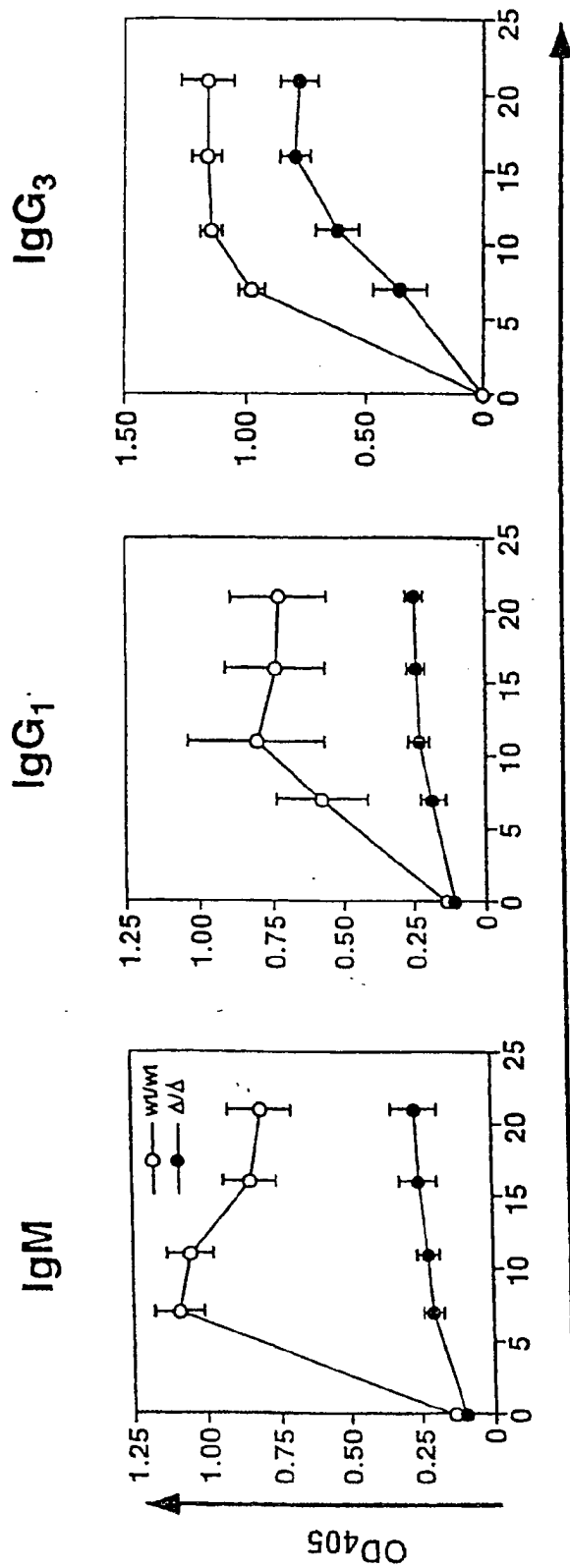


Fig. 2C

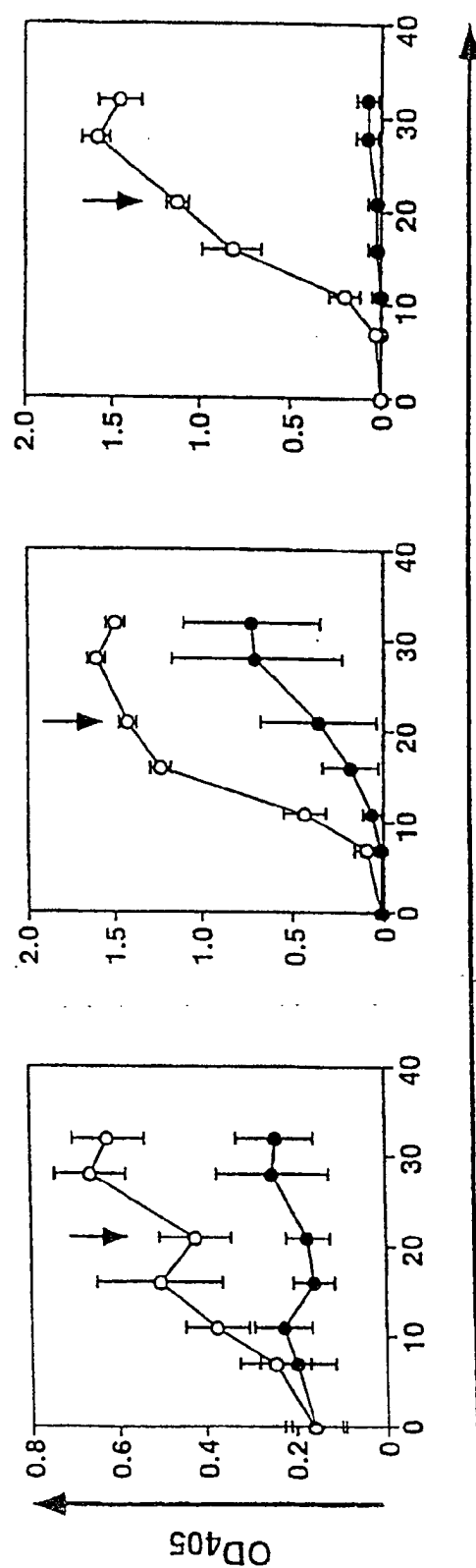


Figur 3



Zeit (Tage)

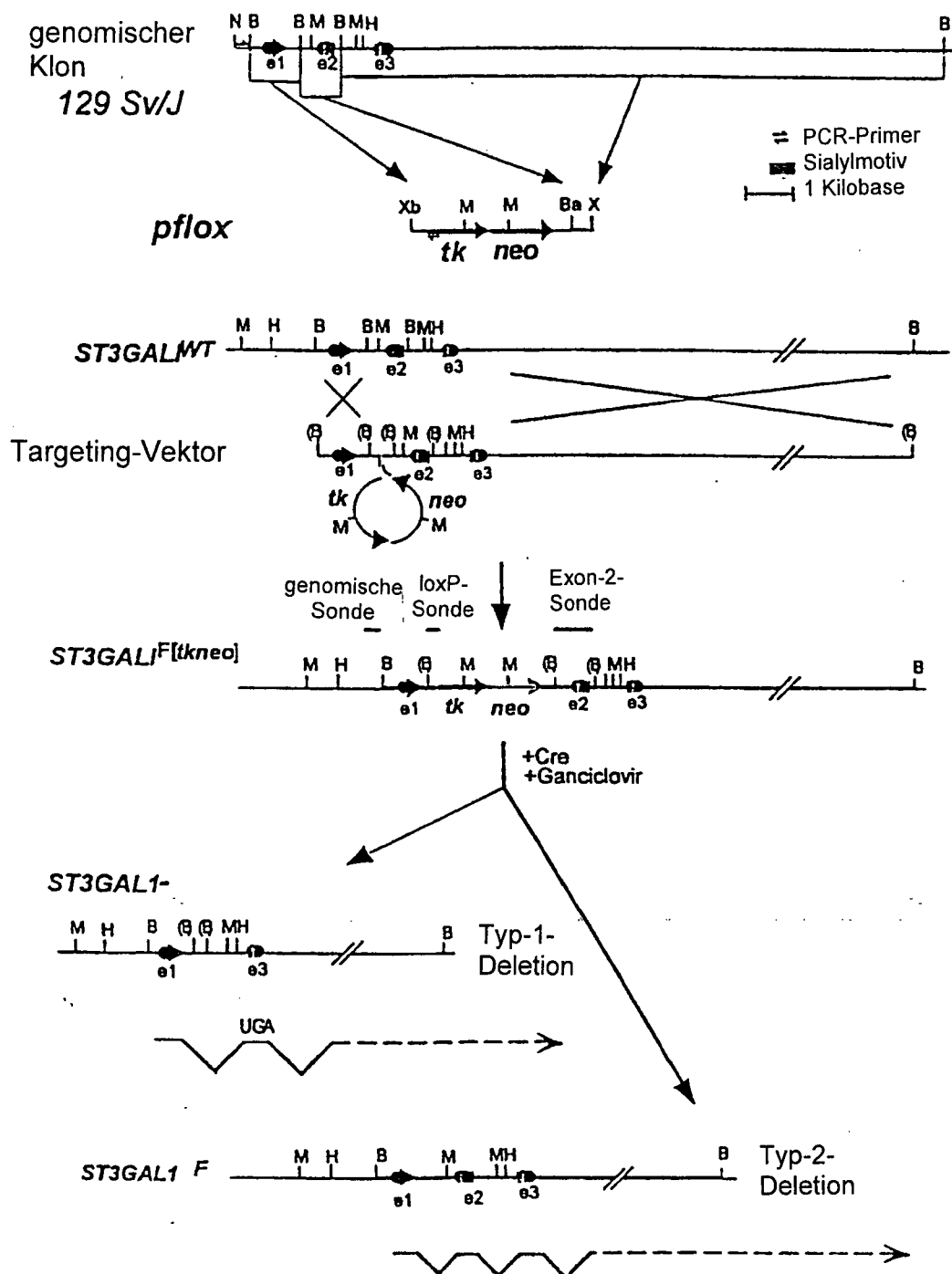
Fig. 4A



Zeit (Tage)

Fig. 4B

Figure 4



Figur 5.

Verlust von ST3Gal-I-Funktion führt zu einer Defizienz peripherer CD8⁺-T-Zellen

