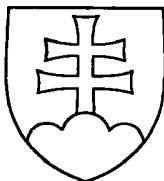


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA  
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 01.07.96  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9513683.4  
(32) Dátum priority: 05.07.95  
(33) Krajina priority: GB  
(40) Dátum zverejnenia: 16.05.2000  
(86) Číslo PCT: PCT/GB96/01577, 01.07.96

(21) Číslo dokumentu:

**13-98**

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

C 12N 15/70  
C 12N 15/62  
C 12N 9/24  
C 12N 1/21  
A 61K 38/47  
C 12Q 1/34  
/(C 12N 1/21,  
C 12R 1:19)

- (71) Prihlasovateľ: ENDOZYME LIMITED, Billingshurst, West Sussex, GB;  
CAMBRIDGE UNIVERSITY TECHNICAL SERVICES LIMITED, Trinity Lane, Cambridge, GB;
- (72) Pôvodca vynálezu: Taylor Peter William, Billingshurst, West Sussex, GB;  
Luzio John Paul, Little Eversden, Cambridge, GB;  
Bryant Jonathan Mark, Topsham, Exeter, GB;
- (74) Zástupca: Rott, Růžička, Guttman, v. o. s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Rekombinantný proteín majúci enzymatickú aktivitu bakteriofágovej endosialidázy**

- (57) Anotácia:  
Rekombinantný proteín majúci enzymatickú aktivitu bakteriofágovej endosialidázy, získateľný expresiou z rekombinantného vektora zahŕňajúceho sekvenciu DNA, kódujúcu bakteriofágovú endosialidázu, viazanú na sekvenciu DNA expresného vektora, ktorý exprimuje polypeptid, ktorý sa aduje na N-terminálny koniec endosialidázy alebo analóg tohto proteínu, ktorým je mutant, funkčný fragment alebo derivát tohto proteínu majúci endosialidázovú enzymatickú aktivitu.

## Rekombinantný proteín majúci enzymatickú aktivitu bakteriofágovej endosialidázy

### Oblasť techniky

Vynález sa týka rekombinantného proteínu majúceho enzymatickú aktivitu bakteriofágovej endosialidázy, spôsobu jeho výroby a rekombinantných expresných systémov na použitie pri jeho výrobe.

### Doterajší stav techniky

Bakteriofág E je členom fágovej skupiny PK1A-PK1E; tieto fágy boli pôvodne izolované z odpadov v Európe na podporu klinickej identifikácie infekcií *Escherichia coli* K1, ktoré môžu spôsobovať vysokú úmrtnosť v prípadoch novorodeneckej meningitídy. Má sa za to, že endosialidáza bakteriofága E (endosialidáza K1 E) je enzýmom zodpovedným za počiatočnú väzbu na hositeľskú baktériu tak, že špecificky rozpoznáva a hydrolyzuje v glykocalyxu K1 uhl'ohydrátové polyméry  $\alpha$ -2,8-viazanej poly-N-acetylneuramínovej kyseliny (kyseliny polysialovej, PSA).  $\alpha$ -2,8-viazaná PSA je exprimovaná tiež na bunkovom povrchu niekoľkých ďalších patogénnych baktérií a rôznych nádorových buniek a bunkových línií. V patente US č. 4,695.541 sa navrhuje, že vďaka vysokej špecificite endosialidázy K1E pre hydrolyzu  $\alpha$ -2,8-sialosylových väzieb je možné tento enzým používať pri diagnóze a terapii meningitídy K1, septikémie alebo bakterémie. Bolo uvádzané, že PSA môže pôsobiť ako marker onkologického vývoja v ľudských nádoroch obličky a neuroendokrinných tkanív a môže tiež prispievať k invazívnemu a metastatickému potenciálu niektorých nádorov.

V J. Bacteriol. 1993, 175, 4354-4363, sú opísané pokusy získať enzymaticky účinný proteín expresiou z konštruktú DNA, odvodeného od príbuzného fága K1F; tieto pokusy boli neúspešné.

Teraz sa zistilo, že proteín majúci enzymatickú aktivitu bakteriofágovej endosialidázy, t.j. proteín, ktorý sa špecificky viaže na  $\alpha$ -2,8-polysialovú kyselinu alebo ju štiepi, je možné získať expresiou z konštruktú DNA, ktorý je odvoditeľný z génu endosialidázy K1E a je klonovaný do

expresného vektora, ktorý exprimuje polypeptid, ktorý sa aduje na N-terminálny koniec endosialidázovej sekvencie.

### Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu je teda jednak rekombinantný proteín, majúci enzymatickú aktivitu bakteriofágovej endosialidázy, získateľný expresiou z rekombinantného vektora zahrnujúceho sekvenciu DNA, kódujúcu bakteriofágovú endosialidázu, viazanú na sekvenciu DNA expresného vektora, ktorý exprimuje polypeptid, ktorý sa aduje na N-terminálny koniec endosialidázy, alebo analóg tohto proteínu, ktorým je mutant, funkčný fragment alebo derivát tohto proteínu majúci endosialidázovú enzymatickú aktivitu.

Uvedeným mutantom môže byť napríklad proteín s nahradenou alebo vypustenou aminokyselinou v jednej alebo niekoľkých polohách. Funkčným fragmentom môže byť fragment skrátený na C- alebo N-terminálnom konci alebo fragment z vnútra polypeptidického reťazca, ktorý má endosialidázovú enzymatickú aktivitu. Derivátom môže byť napríklad farmaceuticky prijateľná soľ s kyselinou, ako je kyselina chlorovodíková, kyselina sírová, kyselina fosforečná, kyselina pyrofosforečná, kyselina benzénsulfónová, kyselina p-toluénsulfónová, kyselina metánsulfónová, kyselina mliečna, kyselina palmová, kyselina vínna, kyselina askorbová alebo kyselina citrónová; s bázou, obvykle dusíkatou bázou, ako je báza obsahujúca sodík, draslík, horčík alebo amónny dusík; alebo vnútorná soľ.

Ďalej je predmetom vynálezu rekombinantný vektor zahrnujúci sekvenciu DNA, kódujúcu bakteriofágovú endosialidázu, viazanú na sekvenciu DNA expresného vektora, ktorý exprimuje polypeptid, ktorý sa aduje na N-terminálny koniec endosialidázy, pričom tento rekombinantný vektor je schopný riadiť expresiu uvedeného proteínu v kompatibilnej hostiteľskej bunke.

Ďalej je predmetom vynálezu spôsob výroby proteínu, majúceho enzymatickú aktivitu endosialidázy bakteriofága E, zahrnujúci kultiváciu hostiteľskej bunky transformovanej vyššie definovaným rekombinantným vektorom v podmienkach umožňujúcich expresiu uvedeného proteínu a izoláciu takto získaného proteínu. Ďalej je predmetom vynálezu hostiteľská bunka, transformovaná vyššie definovaným rekombinantným vektorom.

Prednostným proteínom podľa vynálezu je proteín získateľný expresiou z vyššie definovaného rekombinantného vektora, kde sekvencia DNA, kódujúca endosialidázu, je odvodená od konštruktú DNA kódujúceho zvyšky aminokyselín, kódované nukleotidmi 172 až 1744 génu endosialidázy bakteriofága E, t.j. nukleotidmi 172 až 1744 ďalej definovanej sekvencie SEQ ID No. 1, alebo mutant, funkčný fragment alebo derivát tohto proteínu, majúci endosialidázovú enzymatickú aktivitu. Zvlášť výhodným proteínom podľa vynálezu je proteín získateľný expresiou z vyššie definovaného rekombinantného vektora, kde sekvencia DNA, kódujúca endosialidázu, je odvodená od konštruktú DNA kódujúceho zvyšky aminokyselín, kódované nukleotidmi 1 až 2436 génu endosialidázy bakteriofága E, t.j. nukleotidmi 1 až 2436 ďalej definovanej sekvencie SEQ ID NO. 1, alebo mutant, funkčný fragment alebo derivát tohto proteínu majúci endosialidázovú enzymatickú aktivitu.

Proteín podľa vynálezu je obvykle exprimovaný vo forme fúzneho proteínu zahrnujúceho endosialidázu, viazanú priamo alebo cez ramienko na polypeptid odvodený z expresného vektora, t.j. vektora použitého na expresiu proteínu vo vhodnej hostiteľskej bunke, pričom takýmto výhodným polypeptidom je glutatión S-transferáza. Ak je žiaduce, aby boli polypeptidické komponenty fúzneho proteínu oddeliteľné, keď fúzny proteín prirodzene neobsahuje oblasť, ktorá môže byť špecificky chemicky alebo enzymaticky štiepená, je možné takú oblasť bežnými postupmi zabudovať. Príklady selektívnych štiepiacich činidiel alebo štiepiacich enzýmov pre fúzne proteíny sú proteáza V8, trypsin, trombín, faktor X, CNBr, peptidáza ysc $\alpha$  a yscF.

Vo zvlášť výhodnom uskutočnení vynálezu je proteín podľa vynálezu vo forme fúzneho proteínu zahrnujúceho endosialidázu bakteriofága E, viazanú na glutatión S-transferázu, pričom tento fúzny proteín má prednostne molekulovú hmotnosť asi 100 kDa.

Konštrukt DNA, t.j. rekombinantná molekula DNA, vhodná na expresiu proteínu podľa vynálezu, môže byť tvorená izolovaným fragmentom DNA kódujúcim bakteriofagovú endosialidázu, napríklad tvoreným len kódujúcou oblasťou alebo predĺženým o homológne alebo heterológne sekvencie DNA. Konštrukt môže tvoriť fragment DNA kódujúci endosialidázu, klonovaný do vhodného klonovacieho vektora, prednostne bakteriálneho vektora, ako je pBR317, pBR322, pUC18, pSF2124 alebo hlavne Bluescript SK<sup>+</sup>. Pokiaľ v takomto klone chýbajú konvenčné reštrikčné miesta na izoláciu len otvoreného čítacieho rámca endosialidázy, je možné ich amplifikovať pomocou polymerázovej reakcie (PCR) s použitím primérov zahrnujúcich požadované reštrikčné miesta.

Fragment DNA, kódujúci bakteriofágovú endosialidázu, môže byť získaný z genómovej DNA bakteriofága E alebo syntetickej DNA, ktorá je s ňou v podstate homológna, t.j. homológna z 80 až 100 %. Čistenie bakteriofága E a extrakciu celkovej genómovej DNA je možné vykonávať bežnými postupmi. Extrakt DNA je potom možné štiepiť príslušným reštrikčným enzýmom, ako je Bgl II, Eco RI, Hinc II, Hind III, Bam HI alebo Pst I. Produkt štiepenia môže byť podrobený preparatívnej elektroforéze s nízko topiacim sa agarózovým gélom pre obohatenie frakcií DNA s určitou dĺžkou za účelom obohatenia fragmentov DNA kódujúcich proteín podľa vynálezu.

Ak je známa nukleotidová sekvencia kódujúca bakteriofágovú endosialidázu alebo jej aminokyselinová sekvencia, je možné DNA kódujúcu endosialidázu pripraviť tiež metódami vedúcimi priamo k požadovanej DNA, ako sú konvenčné postupy PCR alebo chemická syntéza in vitro.

Na expresiu proteínu podľa vynálezu je konštrukt DNA klonovaný do expresného vektora, ktorý exprimuje polypeptid, ktorý sa aduje na N-terminálny koniec endosialidázy a poskytuje tak rekombinantný vektor podľa vynálezu. Expresný vektor sa samozrejme volí podľa charakteru hostiteľskej bunky, vybranej na expresiu proteínu. Takéto vhodné expresné vektory sú komerčne dostupné. Expresia sa prednostne uskutočňuje v prokaryotickom hostiteľovi, hlavne v mikrobiálnom hostiteľovi, zvlášť v *E. coli*, ak je vhodným expresným vektorom prokaryotický expresný vektor, ako je fág  $\lambda$  alebo bakteriálny plazmid. Príklady konkrétnych prokaryotických expresných vektorov sú vektory pGEX, napríklad pGEX-2T (Pharmacia Biotech), ktoré vyvolávajú expresiu fúzneho proteínu endosialidáza - glutatión S-transferáza (GST), pMAL (New England Biolabs), ktorý vyvoláva expresiu fúzneho proteínu endosialidáza - maltózový väzbový proteín, systém „pinpoint“ fy Promega, ktorý biotinyluje exprimovaný proteín, systém „strep-tag“ fy Biometra, ktorý na exprimovaný proteín umiestňuje streptavidínový väzbový peptid, systém Ni-NTA fy Qiagen, ktorý k exprimovanému proteínu pridáva 6 histidínov pre väzbu niklu, a systém Xpress fy Invitrogen, pracujúci na podobnom princípe ako systém Ni-NTA.

Výhodnými expresnými vektormi sú vektory pGEX, ktoré majú promótor tac, vnútorný gén lac I<sup>Q</sup> a rozpoznávacie miesto proteázy trombínu alebo faktoru Xa, hlavne pGEX-2T, ktorý má sekvenciu

Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Ile His Arg Asp

CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA CTG ACG

Klonovanie konštrukt DNA do expresného vektora na získanie rekombinantného vektora podľa vynálezu môže byť vykonávané s použitím konvenčných metód reštrikcie a ligácie. Ak teda konštrukt DNA obsahuje reštrikčné miesta Bam HI a Eco RI, ktoré mohli byť vložené amplifikáciou pomocou PCR, je možné tento konštrukt DNA a expresný vektor štiepiť súčasne pomocou Bam HI a EcoRI a ligáciu pomocou DNA ligázy vykonávať podľa pokynov výrobcu.

Ako je vyššie uvedené, sú hostiteľské bunky, používané na expresiu proteínu podľa vynálezu, prednostne prokaryotické, hlavne mikrobiálne bunky, vrátane buniek baktérií, ako je *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* alebo zvlášť *E. coli*.

Transformácia hostiteľských buniek môže byť vykonávaná bežnými metódami, pre tieto bunky vhodnými. Pri transformácii buniek sa tak napríklad bunky podrobia vopred pôsobeniu  $Ca^{2+}$  na umožnenie príjmu DNA a potom inkubácii s rekombinantným vektorom. Následnú selekciu transformovaných buniek je možné napríklad vykonávať prenesením buniek do selektívneho živného média, ktoré umožňuje separáciu transformovaných buniek od buniek rodičovských, alebo reštrikčnou analýzou vzorky DNA miniprep získanej z inkubovaných buniek.

Transformované hostiteľské bunky môžu byť kultivované známymi metódami v kvapalnom médiu s obsahom asimilovateľného zdroja uhlíka, napríklad uhľohydrátu, ako je glukóza alebo laktóza, dusíka, ako je aminokyselina, peptid, proteín alebo ich degradačný produkt, ako je peptón, amónna soľ apod., a anorganickej soli, napríklad síranu, fosforečnanu a/alebo uhličitanu sodného, draselného, horečnatého alebo vápenatého. Médium môže ďalej napríklad obsahovať látku na podporu rastu, ako je stopový prvok, napríklad železo, zinok, mangán apod.

Kultivácia môže byť vykonávaná postupmi, ktoré sú v odbore známe. Podmienky kultivácie, ako je teplota, hodnota pH média a doba fermentácie, sa volia tak, aby sa dosiahla maximálna úroveň expsie proteínu podľa vynálezu. Kmeň *E. coli* sa tak prednostne kultivuje v aeróbných podmienkach v submerznej kultúre za trepania alebo miešania pri teplote asi 20 až 40

°C, prednostne pri asi 37 °C, a hodnote pH 4 až 8, prednostne asi 7, počas doby asi 4 až 30 h, prednostne do dosiahnutia maximálneho výťažku proteínu podľa vynálezu.

Exprimovaný proteín môže byť extrahovaný z mikrobiálnych buniek, ako sú bunky *E. coli*, alebo zo supernatantu bunkovej kultúry bežnými metódami, ktoré zahŕňujú napríklad rozklad buniek, chromatografiu, napríklad chromatografiu s výmenou iónov, hydrofóbnu alebo rozdeľovaciu chromatografiu, zrážanie, napríklad síranom amónnym alebo kyselinou, preparatívnu elektroforézu, ako je elektroforéza na polyakrylamidovom géle s dodecylsulfátom sodným (SDS-PAGE), alebo izoelektrickú fokusáciu apod. Ak je, ako vo zvlášť výhodných uskutočneniach vynálezu, exprimovaným proteínom fúzny proteín endosialidáza - glutatión S-transferáza, môže byť čistený naviazaním na glutatiónové guľôčky, ako je opísané v Smith a Johnson (1988) *Gene* 67, 31-40. Štiepenie čisteného fúzneho proteínu je potom možné vykonávať trombínom, napríklad podľa pokynov Pharmacia Biotech, výrobcu expresného vektora pGEX-2T.

Predmetom vynálezu je tiež farmaceutický prípravok, obsahujúci ako účinnú zložku proteín podľa vynálezu alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ, popri prípade spolu s fyziologicky prijateľným nosičom, ktorým môže byť napríklad vehikulum, riedidlo alebo iný bežný pomocný prostriedok do farmaceutických prípravkov.

Proteíny podľa vynálezu môžu byť používané pri diagnóze alebo ošetrovaní medicínskych stavov, hlavne ľudského organizmu, vrátane rôznych onemocnení, hlavne meningitídy a typov rakoviny, charakterizovaných expresiou polysialovej kyseliny na povrchu nádorovej bunky, ako je Wilmov obličkový nádor, malobunkový pľúcny karcinóm, neuroblastóm, medulárny karcinóm štítnej žľazy, nádor močového traktu, neuroektodermálny nádor, teratóm, rabdomyosarkóm, feochromocytóm, Ewingov sarkóm, inzulinóm, rakovina prsníka a nádor hypofýzy. Tieto proteíny môžu byť používané na inhibíciu metastázy nádorov, napríklad postchirurgickej metastázy. Môžu byť používané tiež pri diagnóze alebo ošetrovaní ďalších stavov, vyvolávaných *E. coli* K1, ako je sepsa a infekcie močového ústrojenstva, alebo inými baktériami exprimujúcimi na povrchu svojich buniek polysialovú kyselinu.

Vynález ďalej umožňuje spôsob liečenia stavu vyvolaného baktériou, exprimujúcou na svojom bunkovom povrchu polysialovú kyselinu, rakoviny charakterizovanej expresiou polysialovej kyseliny na povrchu nádorových buniek alebo metastáz nádorov, pri ktorom sa proteín ale-

bo jeho vyššie definovaný analóg podľa vynálezu podáva teplokrvnému cicavcovi, vyžadujúcemu takú liečbu.

Farmaceutický prípravok podľa vynálezu, hlavne pre vyššie uvedené indikácie, môže byť podávaný parenterálne, napríklad intravenózne, intrakutánne, subkutánne alebo transkutánne. Dávkovanie závisí v zásade od spôsobu podávania a od účelu ošetrovania. Jednotlivé dávky a režim podávania je možné určiť najlepšie jednotlivým posúdením konkrétneho prípadu onemocnenia. Terapeuticky účinné množstvo proteínu podľa vynálezu, keď sa podáva injekčne, činí obvykle od asi 0,005 do asi 0,1 mg/kg telesnej hmotnosti.

Okrem účinnej zložky môže injekčný farmaceutický prípravok podľa vynálezu obsahovať pufer, napríklad fosfátový pufer, chlorid sodný, mannitol alebo sorbitol pre úpravu izotonicity a antibakteriálne účinný konzervačný prostriedok, ako je metyl- alebo etylester p-hydroxybenzovej kyseliny.

Proteíny podľa vynálezu môžu byť vzhľadom ku svojej enzymatickej aktivite používané tiež pri analýze glykoproteínov, napríklad na detekciu a sekvenovanie oligosacharidových skupín dekorujúcich glykoproteíny, pretože môžu z glykoproteínov selektívne odstraňovať konkrétne cukrové zvyšky.

### Príklady uskutočnenia vynálezu

Na osvetlenie vynálezu sú uvedené príklady uskutočnení, ktoré sa vzťahujú ku zvlášť výhodným uskutočneniam.

#### Príklad 1

Príprava konštruktu DNA obsahujúceho otvorený čítací rámec endosialidázy bakteriofága E

Ak nie je uvedené inak, vykonávajú sa všetky postupy spôsobom opísaným v Sambrook a spol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).

Degenerované oligonukleotidové sondy sa navrhujú s odkazom na tabuľky používania kodónu *E. coli* (Holm (1986), *Nuc. Acids Res.* 14, 3075-3087), pripravujú s použitím automatického syntetizátora DNA Applied Biosystems PCR-MATE model 391 a značia na 5'-konci pomocou [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (Amersham International Plc., Amersham, Bucks, U.K.) s použitím T4 polynukleotid kinázy. Rádioaktívne značené oligonukleotidové sondy sa hybridizujú s produktami štiepenia DNA bakteriofága E reštrikčnými enzýmami, podrobia sa elektroforéze na agarózových géloch a prenesú na nylonovú membránu Hybond-N (Amersham International Plc.) Fragmenty DNA bakteriofága E, reagujúce so sondami, sa identifikujú autorádiografiou, čistia z agarózových gélov stupňa čistoty NA (Pharmacia Biosystems Ltd., Milton Keynes, Bucks, U.K.) a ligujú pomocou T4 DNA ligázy (NEB Inc.) do Bluescript SK+ (Stratagene Inc., La Jolla, CA, USA). Transformácie buniek *E. coli* Epicurian SURE (Stratagene Inc.) pomocou Bluescript SK+ sa vykonávajú metódou elektroporácie (Dower a spol. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145) s použitím zariadenia na generovanie a riadenie pulzov Bio-Rad alebo sa alternatívne vysoko účinné kompetentné bunky *E. coli* JM109 (Promega Inc. Madison, WI, USA) transformujú tepelným šokom počas doby 60 s pri 42 °C. Klony transformované rekombinantným plazmidom sa identifikujú kultiváciou na agarových doštičkách 2TY/ampicilín a pomocou zmesi 50 mg/ml 5-bróm-4-chlór-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranozidu (X-Gal) a 0,1 M izopropyl- $\beta$ -D-tiogalaktopyranozidu (IPTG) na rozdelenie kolónií podľa modrej a bielej farby. Uskutočňuje sa sekvenovanie dvojvláknovej DNA pomocou súpravy Sequenase verzia 2.0 od United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA, a sekvenovacieho zariadenia model SA od BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA. Sekvenovanie je uľahčené metódou hromadených delécií alebo použitím syntetických oligonukleotidových primérov, pripravených v British Biotechnology Products Ltd, Abingdon, Oxon, UK, alebo vyššie uvedeným spôsobom.

Degenerovaná oligonukleotidová sonda - sonda 1 [5'-TAC(T)CAC(T)CAGGGT (G)GAC(T)GTG(T)GCG(C)CC-3'] - je odvodená od brómkyánového (CNBr) fragmentu endosialidázy K1E s najdlhšou jednoznačnou aminokyselinovou sekvenciou a jedná sa o najmenej degenerovanú z piatich sond konštruovaných s použitím čiastočných aminokyselinových sekvencií, získaných z brómkyánových fragmentov. Ako fragment génomovej DNA bakteriofága E, potenciálne kódujúci endosialidázovú sekvenciu, je Southernovým prenosom pomocou  $^{32}\text{P}$ -značenej sondy 1 identifikovaný 1,9 kb produkt reštrikčného štiepenia BglII. Reštrikčné endonukleázy BglII a BamHI vytvárajú u rovnakej sekvencie kohezívne vyčnievajúce konce, čo umožňuje ligáciu 1,9 kb fragmentu BglII do miesta BamHI klonovacieho vektora Bluescript SK+ (Promega

Inc.). Plazmid miniprep DNA z klonu transformovaného vzniknutým rekombinantným vektorom (klon I) poskytuje sekvenciu DNA, ktorá kóduje odvodenú proteínovú sekvenciu obsahujúcu identický úsek sekvencie ako fragment CNBr použitý ku konštrukcii sondy 1.

Sonda 2 [5'-GATCTTGGTCTAATCCCT-3'], nedegenerovaný 18-mérový oligonukleotid, sa syntetizuje s použitím sekvencie na 5'-konci klonu I. Táto sonda identifikuje jeden z dvoch produktov štiepenia genómovej DNA bakteriofága E pomocou SinI, ktorý sa prejavuje ako singletový ekvivalent k asi 3,3 kb. Štiepením inzertu DNA klonu I pomocou SinI sa overí, že tento fragment kóduje sekvenciu DNA pred 5'-koncom klonu I. Výsledok tohto štiepenia ukazuje, že v inzerte DNA klonu I sú aspoň 3 miesta SinI a najväčší fragment má 1,1 kb. Pretože reštrikčná analýza DNA bakteriofága E ukazuje, že v celom genóme sú len dve miesta BglII, štiepia sa gélovo čistené fragmenty SinI pomocou BglII a fragment obsahujúci sekvenciu rozpoznávajúcu sondu 2 a miesto BglII poskytuje dva fragmenty 2,1 kb a 1,1 kb. 2,1 kb fragment štiepenia SinI x BglII je klonovaný do Bluescript SK+ ligáciou konca BglII ku koncu BamHI s následným vyplnením koncov pomocou Klenowho fragmentu T4 DNA polymerázy a ligáciou vzniknutých tupých koncov pre vytvorenie kruhového plazmidu. Porovnaním s N-terminálnou sekvenciou aminokyselín ~ 76 kDa enzýmovej podjednotky sa zisťuje, že vzniknutý klon (klon 2) obsahuje otvorený čítací rámec kódujúci N-terminálny koniec endosialidázy K1E. Pre klony 1 a 2 sa získajú v smere 5' aj 3' prekrývajúce sa sekvencie a polohy otvorených čítacích rámcov sa zistia analýzou kodónovej preferencie a polohovej preferencie báz (Staden a spol. (1982) *Nuc. Acids Res.* 10, 141-156, a Staden (1990) *Meth. Enzymol.* 183, 163-180).

Z klonu 2 sa čistí rekombinantná plazmidová DNA, linearizuje štiepením v jedinom mieste EcoRI a RNA, naviazaná na čiapočku 5', sa prepíše pomocou SP6 RNA polymerázy a súpravy mCAP pre naviazanie mRNA na čiapočku (Stratagene Inc.). Translačné reakcie (25  $\mu$ l) in vitro sa vykonávajú s použitím 0,1  $\mu$ g transkriptu RNA, 20  $\mu$ Ci [ $^{35}$ S]metionínu a systému králičieho retikulocytového lyzátu podľa pokynov výrobcu (Promega Inc.). Potvrdenie, že systémy SP6 RNA polymerázy a translácie in vitro sú funkčné, sa získa súčasným vykonávaním pozitívnych kontrol. Kontrolný plazmid je linearizovaný konštrukt SV64-karboxypeptidáza E s predradenou oblasťou promotora SP6 (Fricker a spol. (1989), *Mol. Endocrinol.* 3, 666-673).

Z klonu 1 sa pomocou EcoRI a XbaI vyreže fragment DNA bakteriofága E s veľkosťou 1892 bp, obsahujúci kompletný inzert klonu 1. Ten je smerovo klonovaný do vektora pGEM-IIz (Promega Inc.), vyrezaného rovnakými reštrikčnými enzýmami, takže miesto SacI je umiestnené

v polohe 3' vzhľadom k inzertu klonu 1. Z tohto nového konštrukt sa vyreže fragment SacI/AvrII 707 bp. Tento fragment 707 bp kóduje predpokladaných C-terminálnych 114 aminokyselín endosialidázy a 3' nepreloženú oblasť DNA K1E. Liguje sa do 3253 bp produktu štiepenia klonu 2 pomocou SacI/AvrII. Vzniknutý plazmid (klon 3) obsahuje len krajné oblasti 5' a 3' pôvodne klonovanej DNA K1E vo vektore Bluescript SK+ a skutočne neobsahuje stredových 2975 bp sekvencie DNA, ktorá zahŕňa sekvenciu kódujúcu predpokladaný otvorený čítací rámec endosialidázy. Ku klonu 3, štiepenému pomocou AvrII, sa liguje fragment 2975 bp, odvodený od produktu štiepenia celkovej DNA K1E pomocou AvrII. Vzniknutý konštrukt v Bluescript SK+ (klon 4) obsahuje plnú dĺžku génu endosialidázy, predtým kódovaného v klonoch 1 a 2; gén sa sekvenuje pomocou súpravy Sequenase 2.0 (USB Corp.). Jeho sekvencia je znázornená ako SEQ ID NO: 1.

## Príklad 2

### Príprava rekombinantného plazmidu na expresiu endosialidázy bakteriofága E

Klon 4, t.j. konštrukt DNA obsahujúci kompletný otvorený čítací rámec endosialidázy, pripravený podľa príkladu 1, sa s použitím primérov

5'-CCGGGGATCCATGATTCAAAGACTAGGTTCTTCATTA-3' a

3'-CGTTAGACGACGTGCGGTCTTGTGTATCTTAAGACAC-5'

podrobí PCR na uľahčenie amplifikácie otvoreného čítacieho rámca endosialidázy so zabudovaním reštrikčného miesta BamHI na 5'-konci a reštrikčného miesta EcoRI na 3'-konci otvoreného čítacieho rámca.

Produkt PCR 2483 bp sa čistí extrakciou najprv zmesou rovnakých objemov fenolu (ekvilibrovaného na pH 8,0 2-amino-2-hydroxymetylpropán-1,3-diolom) a zmesi chloroformu a izoamylalkoholu 24:1, potom samotnou zmesou chloroform : izoamylalkohol, s nasledujúcim zrážaním etanolom a resuspendovaním v pufré TE (10 mM 2-amino-2-hydroxymetylpropán-1,3-diolhydrochlorid, 1 mM EDTA, pH 8,0). Prečistený produkt PCR a expresný vektor pGEX-2T (Pharmacia Biotech) sa súčasne štiepi pomocou BamHI a EcoRI a čistí elektroforézou na agarózovom géle a extrakciou Qiaex (Quiagen Corp.). Vyrezaný produkt PCR sa liguje podľa poky-

nov výrobcu pomocou T4 DNA ligázy (New England Biolabs) s expresným vektorom za vzniku rekombinantného vektora, ktorý sa sekvenuje pomocou súpravy USB Sequenase 2.0 cez dve klonovacie miesta na potvrdenie, že bol zachovaný správny čítací rámec.

### Príklad 3

#### Transformácia a expresia

Produkt ligácie podľa príkladu 2 sa použije na transformáciu elektrokompetentných buniek *E. coli* MC 1061 pomocou elektroporačného zariadenia Bio Rad a transformované bunky sa selektujú reštrikčnou analýzou vzorky miniprep DNA získanej z buniek.

Za účelom expresie fúzneho proteínu sa transformované bunky kultivujú prídavkom IPTG do konečnej koncentrácie 0,5 mM, kedy  $OD_{600}$  dosiahla 0,3, a potom sa nechajú rásť ešte 4 h pri 37 °C za miešania s rýchlosťou otáčania  $250 \text{ min}^{-1}$ . Exprimovaný fúzny proteín sa čistí z kultivačného média väzbou na glutatiónové gulôčky postupom podľa Smitha a Johnsona (1988) *Gene* 67, 31-40.

Vzorky bakteriálnej kultúry a čistených frakcií fúzneho proteínu sa podrobia SDS-PAGE, elektroforeticky prenesú na nitrocelulóзовú membránu, premyjú a hybridizujú s antiendosialidázovým polyklonálnym antisérom metódou podľa Sambrooka a spol. (1989). Imunoreaktívne pásy sa detegujú väzbou sekundárnej protilátky konjugovanej s alkalickou fosfatázou a reakciou s (a) 50 mg/ml roztoku nitromodrej tetrazóliumchloridu v zmesi dimetylformamidu a vody 70:30 a (b) 50 mg/ml roztoku disodnej soli 5-bróm-4-chlór-3-indolylfosfátu vo vode.

Uvoľňovanie N-acetylneuramínovej kyseliny (NANA) z polysialovej kyseliny čistenými frakciami fúzneho proteínu sa meria s použitím testu TBA podľa Horgana (1981) *Clin. Chim. Acta* 116, 409-415. Merania ukazujú, že rýchlosť uvoľňovania NANA je priamo úmerná koncentrácii fúzneho proteínu. Ak je fúzny proteín nahradený proteínom glutatión S-transferázou samotným, nie je pozorované žiadne uvoľňovanie NANA.

## SEKVENČNÝ PROTOKOL

- (I) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 1
  - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:
    - (A) DĹŽKA: 2436 párov báz
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH REŤAZCA: dvojreťazcová
  - (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genómová)
  - (iv) PÔVODNÝ ZDROJ:
    - (A) ORGANIZMUS: bakteriofág E
  - (ix) ZNAK:
    - (A) NÁZOV/KLÚČ: CDS
    - (B) POZÍCIA: 1..2436
  - (D) INÉ INFORMÁCIE: /produkt = „kódujúca oblasť pre endosialidázu bakteriofága E“
- (xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 1



## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rekombinantný fúzny proteín majúci enzymatickú aktivitu bakteriofágovej endosialidázy, získateľný expresiou z rekombinantného vektora zahrnujúceho sekvenciu DNA, kódujúcu bakteriofágovú endosialidázu, viazanú na sekvenciu DNA expresného vektora, ktorý exprimuje polypeptid, ktorý sa aduje na N-terminálny koniec endosialidázy, pričom uvedený proteín zahŕňa endosialidázu viazanú k uvedenému polypeptidu priamo alebo cez ramienko, alebo analóg tohto proteínu, ktorým je mutant, funkčný fragment alebo derivát tohto proteínu majúci endosialidázovú enzymatickú aktivitu.
2. Proteín alebo analóg podľa nároku 1, kde sekvencia DNA kódujúca endosialidázu je odvodená z konštruktu DNA kódujúceho aminokyselinové zvyšky kódované nukleotidmi 172 až 1744 SEQ ID NO: 1.
3. Proteín alebo analóg podľa nároku 1, kde sekvencia DNA kódujúca endosialidázu je odvodená z konštruktu DNA kódujúceho aminokyselinové zvyšky kódované nukleotidmi 1 až 2436 SEQ ID NO: 1.
4. Proteín alebo analóg podľa nároku 1, 2 alebo 3, kde polypeptidom je glutatión S-transferáza.
5. Proteín podľa nároku 4, zahrnujúci endosialidázu bakteriofága E viazanú na glutatión S-transferázu.
6. Proteín alebo analóg podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, kde sekvencia DNA kódujúca endosialidázu je odvodená od konštruktu DNA zahrnujúceho fragment DNA kódujúci endosialidázu, klonovaný do bakteriálneho klonovacieho vektora.

7. Proteín alebo analóg podľa nároku 6, kde fragment DNA je odvodený od genómovej DNA bakteriofága E alebo syntetickej DNA, ktorá je s ňou v podstate homológna.
8. Proteín alebo analóg podľa nároku 6 alebo 7, kde konštrukt DNA je amplifikovaný polymerázovou reakciou s použitím primérov zahrnujúcich reštrikčné miesta.
9. Rekombinantný vektor, zahrnujúci sekvenciu DNA kódujúcu endosialidázu bakteriofága, viazanú na sekvenciu DNA expresného vektora, ktorý exprimuje polypeptid, ktorý sa aduje na N-terminálny koniec endosialidázy, pričom uvedený rekombinantný vektor je schopný riadiť expresiu uvedeného proteínu v kompatibilnej hostiteľskej bunke.
10. Rekombinantný vektor podľa nároku 9, kde uvedenou kódujúcou sekvenciou DNA je konštrukt DNA podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 až 8.
11. Rekombinantný vektor podľa nároku 9 alebo 10, kde expresným vektorom je prokaryotický expresný vektor.
12. Rekombinantný vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 9 až 11, kde expresným vektorom je vektor pGEX.
13. Rekombinantný vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 9 až 12, kde expresným vektorom je vektor pGEX-2T.
14. Spôsob výroby proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, vyznačujúci sa tým, že sa kultivuje hostiteľská bunka transformovaná rekombinantným vektorom podľa ktoréhokoľ-

vek z nárokov 9 až 13 v podmienkach umožňujúcich expresiu uvedeného proteínu a takto získaný proteín sa izoluje.

15. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že hostiteľskou bunkou je mikrobiálna bunka.
16. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že hostiteľskou bunkou je bunka *E. coli*.
17. Hostiteľská bunka, transformovaná rekombinantným vektorom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 9 až 13.
18. Hostiteľská bunka podľa nároku 17, ktorou je transformovaná mikrobiálna bunka.
19. Hostiteľská bunka podľa nároku 17, ktorou je transformovaná bunka *E. coli*.
20. Farmaceutický prípravok, vyznačujúci sa tým, že zahrnuje proteín alebo analóg podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8 alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ, poprípade spolu s fyziologicky prijateľným nosičom.
21. Proteín alebo analóg podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8 na použitie pri diagnóze alebo liečení chorobného stavu.

22. Použitie proteínu alebo analógu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8 na prípravu liečiva pre diagnózu alebo liečenie meningitídy alebo iného stavu vyvolaného E. coli K1 alebo inou baktériou exprimujúcou polysialovú kyselinu na svojom bunkovom povrchu, rakoviny charakterizovanej expresiou polysialovej kyseliny na povrchu nádorovej bunky alebo nádorovej metastázy.
23. Použitie proteínu alebo analógu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8 pri analýze glykoproteínu.
24. Spôsob liečenia stavu vyvolaného baktériou exprimujúcou polysialovú kyselinu na svojom bunkovom povrchu, rakoviny charakterizovanej expresiou polysialovej kyseliny na povrchu nádorovej bunky alebo nádorovej metastázy, vyznačujúci sa tým, že sa teplokrvnému cicavcovi, vyžadujúcemu také liečenie, podáva proteín alebo analóg podľa nároku 1.