

A Kemokin-mutánsok a *sclerosis multiplex* kezelésében**KIVONAT**

5

A találmány tárgyát olyan kemokinmutánsok képezik, amelyek szerkezetében a 40-es hurok kationos helyén legalább két mutációt tartalmaznak, és amelyek a vad típusú molekulával összehasonlítva csökkent GAG-kötő aktivitást mutatnak. Különösképpen, azt 10 figyeltük meg, hogy az ilyen mutált kemokinek hatékonyak a *sclerosis multiplex* és/vagy más, a mielinpusztulással járó betegségek kezelésében. A háromszoros mutációt hordozó RANTES az a vegyület, amely a legjobb eredményeket mutatta.

jellemező a'ora φ

J. J. J.



Kemokin-mutánsok a *sclerosis multiplex* kezelésében

A találmány tárgyát olyan kemokinmutánsok képezik, amelyek szerkezetében a 40-es hurok kationos helyén legalább két mutációt tartalmaznak, és amelyek a vad típusú molekulával összehasonlítva csökkent GAG-kötő aktivitást mutatnak. Különösképpen, azt figyeltük meg, hogy az ilyen mutált kemokinek hatékonyak a *sclerosis multiplex* és/vagy más, a mielinpusztulással járó betegségek kezelésében.

A leukocitákra kemotaktikus és azokat aktiváló kemokinek a kisméretű, gyulladásgátló citokinek egyik családját képezik. Az első konzervált ciszteinek helyzetének függvényében, a kemokinek családját C-C, C-X-C és C-X₃-C kemokinekre lehet osztani [Baggiolini és mtsai., Adv. Immunol. 55, 97-179 (1994); Baggiolini és mtsai., Annu. Rev. Immunol. 15, 675-705 (1997); Taub és mtsai., Cytokine Growth Factor Rev. 7, 355-376 (1996)].

Számos C-X-C kemokin, mint például az interleukin-8 (IL-8), a neutrofilekre kemotaktikus, míg a C-C kemokinek különféle leukocitákon, így monocitákon, limfocitákon, eosinophileken, basophileken, NK-sejteken és dendritikus sejteken, aktívak.

A kemokinek NH₂-terminális doménje a receptorhoz való kötődésben vesz részt, és az NH₂-terminális processzálása a kemokineket aktiválhatja vagy éppen teljesen inaktívvá alakíthatja.

Szintetikus C-C kemokinek N-terminális változatait már korábban tesztelték arra nézve, hogy természetes formákat gátló vagy antagonistá aktivitást mutatnak-e. Az olyan MCP-1, MCP-3 és RANTES kemokinek, amelyekből 8-9 NH₂-terminális aminosav hiányzik, monocitákon inaktívak, és receptor-antagonistának alkalmasak [Gong és mtsai., J. Exp. Med. 181, 631-640 (1995); Gong és mtsai., J. Biol. Chem. 271, 10521-10527 (1996)].

A RANTES egyetlen metioninnal történő meghosszabbítása eredményeként egyrészt a molekula csaknem teljesen inaktív lesz, másrészt a Met-RANTES az eredeti RANTES antagonistájaként viselkedik [Proudfoot és mtsai., J. Biol. Chem. 271, 2599-2603 (1996)].

A WO 99/16877 sz. nemzetközi közzétételi irat tárgyát a természetes körülmények között előforduló RANTES NH₂-terminális 1., 1-2., 1-3., vagy 1-4. aminosavainak megfelelő NH₂-terminális aminosavakat nem tartalmazó, kemokin-antagonista aktivitású RANTES, az ezt kódoló cDNS-szekvenciák, és ezeknek a kemokinhatás gátlását igénylő

betegségek terápiájában és/vagy diagnosztizálásában történő alkalmazása képezi. Egy előnyös csonkolt kemokin-antagonista a RANTES (3-68).

Bár a RANTES és általában más CC kemokinek, főként a specifikus sejtmembrán-receptorokkal kapcsolatos kemoattraktáns aktivitását tanulmányozták eddig, a RANTES glükózaminoglikánokkal (GAG-ok) is képes kölcsönhatásba lépni. A glükózaminoglikánok olyan rendkívül változatos, elágazó cukorcsoportok, amelyek számos, általában proteoglikánoknak (PG-k) nevezett fehérjéhez kötődnek a poszttranszlációs módosítások során. Ilyen fehérjék vannak jelen a sejtmembránon, az extracelluláris mátrixban és a véráramban, ahol egyébként izolált GAG-ok szintén jelen lehetnek.

A GAG-okkal történő kölcsönhatás a sejt szignálfolyamataiban közreműködő számos oldható molekula (interleukinok, növekedési faktorok) esetében létrejön. PG-k, vagy izolált GAG-ok oldható molekulákkal komplexet képezhetnek, feltehetően abból a célból, hogy ezen oldható molekulákat az extracelluláris környezetben a proteolízistől megvédjék. Feltételezzük azt is, hogy a GAG-ok elősegíthetik a sejt szignálmolekuláinak helyes bemutatását azok specifikus receptorainak, és így modulálhatják a célsejtek aktiválását is.

A kemokinek esetében úgy tűnik, hogy a gyulladás helyén, immobilizált gradienként történő koncentrálódást, és ennek következtében, a sejt receptoraival való kölcsönhatást és a kemokinek aktivációs stádiumát a GAG-ok különböző formái modulálják [Hoogewerf és mtsai., *Biochemistry* **36**, 13570-13578 (1997)]. Ezért feltételezzük, hogy az ilyen kölcsönhatások modulációja a gyulladással kapcsolatos betegségek [Schwarz és Wells, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 407-417 (1999)] és HIV-fertőzés [Burns és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14499-14504 (1999)] gyógyításának egyik lehetőségeként merül fel.

A GAG-RANTES kölcsönhatás szerkezeti feltételeit és funkcionális hatásait különféle modelleken tanulmányozták már. Emberi köldökzsinórból származó véna endotéliumsejtjein (HUVEC-ek) a RANTES mikromoláris koncentrációkban, más kemokinekénél, például MCP-1, IL-8, vagy MIP-1 α , nagyobb affinitással és specificitással kötődik a GAG-okhoz. Az ilyen kölcsönhatás feltehetően nem egyszerűen elektrosztatikus természetű, hanem számos más paramétertől, például a GAG-ok hosszától és N- és O-szulfatáltságának mértékétől is függ [Kuschert és mtsai., *Biochemistry* **38**, 12959-12968 (1999)]. GAG-ban hiányos sejtvonalak képesek kemokineknek kötni, de a sejtfelszíni GAG-ok jelenléte jelentős mértékben fokozza receptorokra gyakorolt aktivitásukat, amennyiben alacsony koncentrációban vannak jelen [Ali és mtsai., *J. Biol. Chem.* **275**, 11721-11727 (2000)]. Más kísérletek kimutatták, hogy a GAG-ok és a heparinszulfát különösen elősegí-

tik a RANTES kölcsönhatását a makrofágok sejtfelületével és ennek következményeként a HIV-fertőzés gátlását. Ez az eredmény összhangban van a heparinszulfátot gyengén expresszáló sejtek jól ismert rezisztens tulajdonságával, illetve a RANTES antivirális hatásaival [Oravecz és mtsai., *J. Immunol.* 159, 4587-4592 (1997)].

5 Oldható GAG-ok versenyeznek (kompetíciót mutatnak) a sejtmembrán-eredetű GAG-okkal, és képesek a RANTES által indukált aktiválási felszín specifikus inhibitoraként [Appay és mtsai., *Int. Immunol.* 12, 1173-1182 (2000)], vagy HIV-fertőzés szuppresszoraként működni [Burns és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14499-14504 (1999)].

10 Mivel a hagyományos konszenzus szekvencia (BBXB, ahol B bázikus aminosavat, X pedig bármilyen aminosavat jelent) túlságosan általános, a szerkezet és funkció közötti összefüggésre irányuló néhány vizsgálattal megpróbálták azonosítani a RANTES azon doménjét, amely felelős a GAG-okkal történő kölcsönhatás kialakulásáért. Rekombináns, emberi RANTES ellen előállított, az antivirális hatás és a RANTES által
15 közvetített intracelluláris kalciummobilizálás blokkolására képes monoklonális antitest alkalmazásával epitóptérképezési vizsgálatot végeztek [Burns és mtsai., *J. Exp. Med.* 188, 1917-1927 (1998)]. E megközelítés lehetővé tette, hogy meghatározzák 55-66. aminosavat tartalmazó szakaszt, mint az ilyen aktivitásokhoz és a GAG-gal való kölcsönhatáshoz szükséges régiót, és ezzel bizonyították, hogy a GAG-kölcsönhatásoknak a kanonikus re-
20 ceptorok által közvetítettekkel komplementer vagy attól elkülönült funkciójuk van, ahogyan az a megváltoztatott aggregációs tulajdonságú RANTES-variánsokon végzett kísérletekből is kiderült azóta [Appay és mtsai., *J. Biol. Chem.* 274, 27505-27512 (1999)].

A C-terminális α -helikális szegmentumot alkotó, 55-66. aminosavak alkotta régió homológ más kemokinek, például IL-8, GAG-ot kötő doménjével [Witt és Lander, *Curr. Biol.* 4, 394-400 (1994)], és lizint és arginint tartalmazó kationos helyet (KKWVR) tartalmaz. Az ilyen kötőrégió az N-terminálison található sejtreceptor-kötőhelytől eltér [Pakianathan és mtsai., *Biochemistry* 36, 9642-9648 (1997)], és bizonyos, a RANTES monomerjeinek aggregációjában résztvevő aminosavakat tartalmaz, ámbár az e területet érintő diszaggregációs mutációk, úgy tűnik, nincsenek hatással a GAG-okkal való kölcsönhatásra
30 [Czaplewski és mtsai., *J. Biol. Chem.* 274, 16077-16084 (1999); WO 98/13495 sz. nemzetközi közzétételi irat].

A RANTES tartalmaz egy másik kationos helyet is (RKNR) a 44-47. aminosavak által határolt szakasznál, amely más kemokinek, például MIP-1 α [Koopman és Krangel, *J.*

Biol. Chem. 272, 10103-10109 (1997)] és MIP-1 β [Koopman és mtsai., J. Immunol. 163, 2120-2127 (1999)], GAG-ot kötő doménjében konzervált.

E kationos helyeken egyetlen mutációt hordozó, emberi RANTES-változatokat, mint a HIV-fertőzés és gyulladásos vagy allergiás betegségek kezelésében potenciálisan terápia-
5 san alkalmazható RANTES-antagonistákat ismertet a WO 99/33989 sz. nemzetközi közzétételi irat.

Szintén ismert, hogy a RANTES csak azon háromszoros mutánsa vesztette el GAG-ot kötő képességét, amelyben a 44., 45. és 47. pozíciókban lévő három aminosavat alaninnal szubsztituáltak [Proudfoot és mtsai., Chemokine Gordon Conference, Session I.,
10 2000. július 24., személyes közlés].

Az alábbiakban leírjuk a találmány szerinti megoldást.

Felismertük, hogy az úgy nevezett „40-es hurok” kationos helyén két mutációt tartalmazó CC kemokinek hatékonyak a *sclerosis multiplex* és/vagy más, a mielinpusztulással
15 járó betegségek kezelésében. E hely a CC kemokinekben (mint a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3, MIP-4, HCC1, I309, MCP-2), konzervált GAG-kötőhelynek felel meg. A megfelelő vad típusú molekulákhoz képest, a kemokinek e mutánsainak GAG-ot kötő aktivitása lecsökkent.

Azt a régiót (az úgynevezett 40-es hurkot), amelyben a találmány szerint legalább
20 két mutációnak jelen kell lennie, az 1. ábrán bemutatott számos CC kemokinnél megjelöltük. Különösen a RANTES háromszoros mutánsa – amelyben a 44., 45. és 47. pozíciókban lévő bázikus aminosavakat alaninnal szubsztituáltuk – bizonyult aktívnek a *sclerosis multiplex* kezelését modellező állatmodellben. Az egér EAE modellben a RANTES ezen háromszoros mutánsa egyrészt dózistól függő hatást mutatott, másrészt pedig a rekombináns
25 β -interferonnal végzett referenciakezeléssel összevethető hatékonyságú volt. Analóg eredményeket kaptunk a RANTES csonkolt, háromszoros mutánsa – amelyben a 44., 45. és 47. pozíciókban lévő bázikus aminosavakat alaninnal szubsztituáltuk, és amelyből az első két N-terminális aminosav hiányzik - esetében is. A RANTES e csonkolt mutánsa (a szekven-
30 cialistában 3. azonosítószámon bemutatott szekvencia) új és a találmány szerinti megoldás kidolgozása során egy másik célunk volt.

Hasonló kísérletes bizonyítékokhoz jutottunk a MIP-1 α és MIP-1 β háromszoros mutánsainak – már ismert mutánsok, és amelyek a találmányban MIP-1 α háromszoros, R18A-R46A-R48A mutánsként [Koopman és Krangel, J. Biol. Chem. 272, 10103-10109

(1997)] és MIP-1 β háromszoros, K45A-R46A-K48A mutánsként [Laurence, Biochemistry 40, 4990-4999 (2001)] szerepelnek - vizsgálatával is.

A leírás szerinti értelemben, a „csökkent GAG-kötő aktivitás” kifejezés azt jelenti, hogy a találmány szerinti mutánsok GAG-ot kötő képessége alacsonyabb, azaz a megfelelő vad típusú molekulához képest e mutánsok mindegyike alacsonyabb arányban kötődik a GAG-okhoz (mint például heparinszulfáthoz).

Előnyösebbek az emberi RANTES azon mutánsai, amelyekben a vad típusú molekula 44., 45. és 47. pozícióiban lévő, három bázikus aminosavat más aminosavval szubsztituáltunk. Ezen aminosavak kisméretű, alifás, nem poláros vagy gyengén poláros aminosavakkal, mint például Ala, Ser, Thr, Pro és Gly, szubsztituálhatók. Előnyös az alanin.

Az MS kezelésében különösen hatékonyak bizonyult RANTES-mutánsok azok, amelyek aminosav-szekvenciáit a szekvencialistában 2. azonosítószámon bemutatott szekvencia és a szekvencialistában 3. azonosítószámon bemutatott szekvencia tartalmazza.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során egy másik célunk az volt, hogy a fentiekben meghatározott kemokinmutánsokat *sclerosis multiplex* és/vagy más, a mielinpusztulással járó betegségek kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk.

A *sclerosis multiplex* (MS) a CNS lassan kifejlődő betegsége, amely során az agyban és gerincvelőben elszórt foltokban a mielin leépül, és ennek többszörös és többféle, általában átmeneti enyhüléssel/javulással és súlyosbodással járó, neurológiai szimptóma és tünet lép fel [lásd, The Merck Manual, 16. kiadás].

A kiváltó ok ismeretlen, azonban néhány jel arra mutat, hogy valamilyen specifikus mechanizmus útján végbemenő, immunológiai abnormalitás áll a háttérben. A lehetségesnek tartott kiváltó okok közé lassú vagy látens vírus általi fertőzés, és enzimek általi mielinbontás tartozik. A CNS-ben az IgG szintje általában megnő. E megnövekedett szintet már számos vírussal, így kanyarót okozó vírussal, hozták kapcsolatba. E felismerések és a HLA-allotípusokkal fennálló asszociációk, illetve a T-sejtek megváltozott számának jelentősége nem világos, mivel a bizonyítékok némileg ellentmondásosak. Az esetek egyes családokban tapasztalt megnövekedett száma felveti a genetikai örökölhetőség esélyét; a nők esetében bizonyos mértékig gyakrabban fordul elő a betegség, mint a férfiakban. Környezeti faktorok is úgy tűnik, befolyásolják az MS kialakulását. Bár a veszélyeztetett életkor általában 20-40. életévnél kezdődik, léteznek olyan földrajzi területek, ahol az MS-ben

megbetegedett páciens mégcsak a 15. életévét töltötte be. A 15. életév betöltését követő lakóhely-változtatás nem befolyásolja a megbetegedés esélyét.

5 Oligodendroglia-pusztulással és perivaszkuláris gyulladással járó mielin-pusztulások plakkok vagy szigetek széles körben elterjednek a CNS-ben, elsődlegesen a fehérállományban, főként a laterális és poszterior kötegekben (különösen a nyaki és háti régiókban), a szemidegekben, és a periventrikuláris területekben. A betegség a középagy, híd (*pons*) és kisagy idegpályáit szintén megtámadja, és a betegség a kisagy és gerincvelő szürkeállományát is érintheti.

10 A sejtestek és axonok általában megmaradnak, különösen a károsodás korai szakaszában. A későbbiekben az axonok elpusztulhatnak, különösen a hosszú kötegekben lévők, és a kialakuló szális gliózis miatt az idegkötegek „szklerózisos” megjelenésűeknek lesznek. A korai és késői károsodás egyidejűleg, egyaránt megtalálható. A mielin lipid- és fehérje-összetételében bekövetkező kémiai változások kimutathatók a plakkok környékén.

15 A betegséget a CNS kóros működésére visszavezethető, átmeneti enyhülés/sel/javulással és ismétlődően jelentkező súlyosbodással járó, különböző panaszok és tünetek jellemzik.

Sok plakk kimutatható a legérzékenyebb leképezési eljárással a mágneses rezonancia-leképezéssel. Léziók szintén láthatóvá tehetők kontraszt tekintetében felerősített CT-leképezésekben.

20 *A sclerosis multiplex (MS)* kezelésében csak mérsékelt fokú fejlődés tapasztalható, részben azért, mert az elváltozás patogenezise nem teljesen ismert. A tapasztalaton alapuló kezelésben a legfőbb akadályt az MS igen változatos megjelenési formái mellett az jelenti, hogy a legfontosabb következtetéseket csak hosszú idő elteltével vonhatjuk le, és hogy a kezelés hatásait, különösen a rövid időtartamú hatásokat, objektíven jelző markerek 25 hiányoznak.

Bár az MS patogenezise még mindig homályos, a betegség természetének tanulmányozása folyamatban van. A mágneses rezonancia-leképezésen (MRI) alapján objektíven levonható következtetések és a klinikai tesztek számos csapdájának ismerete tökéletesített teszteljárásokhoz és az eredmények jobb értelmezéséhez vezetett.

30 Ezért, a találmány szerinti megoldás egy másik célja MS kezelésére szolgáló eljárás kifejlesztése, amelyben a találmány szerinti kemokinmutánsok hatékony mennyiségét és gyógyászatilag elfogadható kötőanyagot tartalmazó készítményt adunk be.

A leírás szerinti értelemben, a „hatékony mennyiség” kifejezés az aktív összetevő azon mennyiségét jelenti, amely a betegség lefolyását és súlyosságát befolyásolva, az ilyen

patológiás állapot redukálását vagy enyhülését eredményezi. A hatékony mennyiség függ a beadás módjától és a páciens állapotától.

A találmány szerinti megoldás további célja a találmány szerinti kemokin-mutánsokat, egy vagy több gyógyászatilag elfogadható kötőanyag jelenlétében tartalmazó, MS és/vagy más mielinpusztulós betegség kezelésére szolgáló készítmény kifejlesztése.

A leírás szerinti értelemben, a „gyógyászatilag elfogadható” kifejezés bármely olyan hordozóanyagot jelent, amely az aktív összetevő biológiai hatékonyságát nem akadályozza, és amely nem toxikus arra a gazdára nézve, amelynek beadjuk. Például, parenterális beadásra, a fenti aktív összetevőket injektálásra szolgáló egységnyi dózisformába formulázhatjuk olyan vivőanyagokkal, mint például sóoldat, dextrózoldat, szérumbumin és Ringer-féle oldat.

A találmány szerinti készítmény, a gyógyászatilag elfogadható vivőanyagok mellett, tartalmaz kis mennyiségű adalékanyagokat, mint például stabilizálókat, kötőanyagokat, puffereket és tartósítószereket.

Ilyen aktív összetevőt beadhatunk intravénásan, intramuszkulárisan vagy szubkután módon. A megfelelő összetevő koncentrációját a vérben biztosítani képes más beadási módok is a találmány tárgykörébe tartoznak.

Az aktív összetevő optimális dózist a beadás módjának, a páciens állapotának és jellemzőinek (nem, kor, testtömeg, egészség, méret), a szimptómák elterjedtségének, a párhuzamos kezelésnek, a kezelések gyakoriságának és az elérni kívánt hatásnak függvényében választjuk ki. A dózishatárok beállítása és manipulálása a szakember számára ismert.

Rendszerint, az aktív összetevő napi dózisa testtömeg-kilogrammonként 0,01-100 mg lehet. A kívánt eredmény elérésére, szokásosan, naponta, testtömeg-kilogrammonként 1-40 mg-ot adunk be felosztott dózisokban, vagy késleltetett felszabadulást biztosító formában. Második vagy rákövetkező beadás történhet olyan dózisban, amely azonos, kevesebb, vagy több, mint az egyednek a kiinduláskor vagy előzőleg beadott dózis.

A találmányt leírjuk a specifikus megvalósítási módokra hivatkozva, azonban a leírás tartalma magában foglalja az összes olyan módosítást vagy helyettesítést, amely a szakember számára, a szabadalmi igénypontok jelentésétől és céljától való eltérés nélkül, egyértelmű.

A találmányt az alábbi példák segítségével is leírjuk, azonban e példák a találmányt semmiben sem korlátozzák. A példákban, az alábbiakban specifikált ábrákra hivatkozunk.

Az alábbiakban leírjuk a találmányhoz tartozó ábrákat.

Az 1. ábra példaként néhány, a 40-es hurok mentén egymás mellé rendezett, CC kemokin szekvenciájának egyeztetését mutatja be. E fehérjeszegmenst és a GAG-kötőmotívumnak megfelelő kationos helyet bekereteztük.

5 A 2. ábra a vad típusú RANTES és ennek, a példák szerinti mutánsai klónozására alkalmazott plazmid térképét mutatja be.

A 3. ábra a [¹²⁵I]-RANTES-sel és annak mutánsaival, heparin alkalmazásával, heparinnal bevont gyöngyökön végzett kompetíciós kötési vizsgálat eredményeit mutatja be.

10 A 4. ábra a RANTES-sel és a RANTES háromszoros, 40-es mutánsával végzett kompetíciós egyensúlyi kötési vizsgálat eredményeit mutatja be.

Az 5. ábra a monocita és T-sejt kemotaxis RANTES-sel és a háromszoros, 40-es és 50-es RANTES-mutánsokkal történt indukálását mutatja be.

15 A 6. ábra a peritoneális sejtek toborzásának („recruitment”), háromszoros, 40-es RANTES-mutánssal történt gátlását mutatja be.

A 7. ábra peritoneális sejtek, RANTES által indukált toborzásának, *Pichia pastoris*ban előállított, csonkolt, háromszoros, 40-es RANTES-mutánssal (3-68) történt gátlását mutatja be.

20 A 8. ábrán a peritoneális sejtek MIP-1 β -vel indukált toborzásának háromszoros, 40-es MIP-1 β mutánssal (K45A-R46A-K48A) történt gátlását láthatjuk.

A 9. ábrán a peritoneális sejtek MIP-1 α -vel indukált toborzásának, háromszoros, 40-es MIP-1 α mutánssal (K18A-R46A-K48A) történt gátlását láthatjuk.

A 10. ábra a peritoneális sejtek tioglikoláttal indukált toborzásának, háromszoros, 40-es RANTES-mutánssal történt gátlását mutatja be.

25 A 11. ábra a kísérleti autoimmun enkefalomyelitisz-rohamnak a találmány szerinti összes háromszoros RANTES-mutánssal történt gátlását mutatja be.

Példák

1. Anyagok és eljárások

30 a) Heparint nem kötő RANTENS-mutánsok előállítása

A RANTES mutagenézisét inverz polimeráz-lánreakciós eljárással végeztük. A pontmutációkat az emberi RANTES kódoló szekvenciájával (GenBank katalógusszáma: NM_002985) történő hibridizálásra alkalmazott két láncindító egyikével, ellentétes orien-

tációban vittük be. A láncindító-anellálás hatékonyságának fokozására (különösen akkor, amikor többszörös mutációkat vittünk be láncindítódba) a DNS-t lúggal denaturáltuk. A denaturált DNS-t körülbelül 10 pg/reakció koncentrációra hígítottuk a nem mutált DNS-nek a transzformációs reakcióba való beépülésének elkerülése céljából.

- 5 Az aminosavaknak a példákban és a leírásban megadott számozása az érett fehérjének felel meg, azaz a szekvencialista szerinti 24. pozícióban található szerinrel kezdődik. Ezért, a szekvencialistában és a példákban megadott aminosavak számai közötti tökéletes megfelelés miatt, a példákban vagy a leírásban megjelent számokhoz 23-at kell hozzáadni.
- 10 A mutagenézisben alkalmazott láncindítók szekvenciái az alábbiak, a mutált bázisokat aláhúzással jeleztük:
- R44A (szensz)
5'-TTT GTC ACC GCA AAG AAC CGC CAA G-3' P1
R44A (antiszensz)
- 15 5'-GAC GAC TGC TGG GTT GGA GCA CTT G-3' P2
K45A (szensz)
5'-TTT GTC ACC CGA GCG AAC CGC CAA G-3' P3
K45A (antiszensz)
5'-GAC GAC TGC TGG GTT GGA GCA CTT G-3' P4
- 20 R47A (szensz)
5'-CGA AAG AAC GCC CAA GTG TGT GCC A-3' P5
R47A (antiszensz)
5'-GGT GAC AAA GAC GAC TGC TGG GTT G-3' P6
R44A-K45A-R47A (háromszoros, 40-es mutáns, szensz)
- 25 5'-TTT GTC ACC GCA GCG AAC GCC CAA GTG TGT GCC AAC P7
R44A-K45A-R47A (háromszoros, 40-es mutáns, antiszensz)
5'-GAC CGA CTG CTG GGT TGG AGC ACT TGC C-3' P8
K55A (szensz)
5'-GCC AAC CCA GAG GCG AAA TGG GTT CGG-3' P9
- 30 K55A (antiszensz)
5'-ACA CAC TTG GCG GTT CTT TCG GGT GAC-3' P10
K56A (szensz)
5'-AAC CCA GAG AAG GCA TGG GTT CGG GAG-3' P11

K56A (antiszensz)

5'-GGC ACA CAC TTG GCG GTT CTT TCG GGT-3' P12

R59A (szensz)

5'-AAG AAA TGG GTT GCG GAG TAC ATC CAA C-3' P13

5 R59A (antiszensz)

5'-CTC TGG GTT GGC ACA CAC TTG GCG-3' P14

K55A-K56A-R59A (háromszoros, 50-es mutáns, szensz)

5'-GCC AAC CCA GAG GCG GCA TGG GTT GCG GAG TAC ATC-3' P15

K55A-K56A-R59A (háromszoros, 50-es mutáns, antiszensz)

10 5'-ACA CAC TTG GCG GTT CTT TCG GGT GAC AAA GAC-3' P16

Az amplifikációt DNS-hőciklizáló készülékben (Perkin-Elmer-Cetus), 35 ciklusban, *pfuturbo*® DNS-polimeráz (Stratagene) alkalmazásával végeztük. DNS-ligálást követően, Top 10 F' kompetens *E. coli* sejteket (InVitrogen) transzformáltunk. A mutánsok szekvenciáját DNS-szekvenálással ellenőriztük.

15 b) Vad típusú (WT) RANTES és RANTES-mutánsok expresszálása és tisztítása *E. coli*-ban

A fentiekben leírtak szerint PCR-rel előállított DNS-fragmentumokat pET24d plazmidba (2. ábra) klónozva vektorsorozatot készítettünk. WT vagy mutált RANTES kódoló szekvenciáját a pT7 promóter 3' végébe klónoztuk az *Xba*I és *Nhe*I/*Xho*I helyek közé.

20 A plazmid két markergént (Km és lacI) és egy aktív replikációs origót (Ori fl) tartalmaz.

Az eredményül kapott vektorokat BL21(DE3) *E. coli* törzs, amely a pT7/LacI rendszer alkalmazásakor erős fehérjeexpressziót biztosít, újratranszformálására alkalmaztuk. A fehérjeexpresszió indukálásra a tenyészdathoz 1 mM izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidot adtunk. Az összegyűjtött sejteket lízispufferben (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM MgCl₂, 5 mM benzamidin-HCl, 1 mM DTT, 0,1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid (PMSF), 20 mg/l DNáz) szuszpendáltuk fel. A sejteket Franciaprés-egységen történt háromszori átpréseléssel törtük össze. A szuszpenziót 10000 x g-vel, 4°C-on, 30 percig centrifugáltuk. A WT RANTES-t vagy az egyik RANTES-mutánst tartalmazó inklúziós testekből álló üledéket 0,1 M Tris-HCl-ben (pH 8,0, + 6 M guanidin, 1 mM DTT) feloldottuk

30 és 30 percig, 60°C-on kevertük. Az oldatot háromszor cserélt, 1%-os ecetsav ellen dializáltuk. Az oldhatatlan anyagot 10000 x g-vel, 30 percig történt centrifugálással eltávolítottuk. A WT RANTES-t vagy az egyik RANTES-mutánst tartalmazó felülúszót liofilizáltuk.

A liofilizált port 0,1 M Tris-HCl-ben (pH 8,0, + 6 M guanidin-HCl, 1 mM DTT) feloldottuk úgy, hogy körülbelül 1 mg/ml koncentrációjú oldatot kapjunk. A fehérjéket tízszeres mennyiségű, 0,01 mM oxidált glutationt és 0,1 mM redukált glutationt tartalmazó 20 mM Tris-HCl-hez (pH 8,0) cseppenként hozzáadva renaturáltuk. Az oldatot 12 órán át 4°C-on kevertük. Az oldhatatlan anyagot 10000 x g-vel, 30 percig történt centrifugálással eltávolítottuk. A pH-t ecetsavval 4,5-re, a vezetőképességet pedig vízzel történt hígítással 20 mS-re állítottuk be. Az oldatot 20 mM nátriumacetáttal (pH 4,5) ekvibrált HiLoad S 26/10 oszlopra vittük fel, és a fehérjét ugyanazzal a pufferrel készült, lineáris 0-2 M NaCl-gradienssel eluáltuk. A WT RANTES-fehérjét vagy az egyik RANTES-mutánsfehérjét tartalmazó frakciókat összeöntöttük, és háromszor cserélt ecetsav ellen dializáltuk, azután liofilizáltuk.

A liofilizált fehérjéket 50 mM-os Tris-HCl pufferben (pH 8,0) oldottuk fel. A klónozási folyamatból visszamaradt MKKKWPR leader szekvenciát a WT RANTES-fehérjéről vagy az egyik mutáns RANTES-fehérjéről endoproteináz Arg-C enzimmel (1:600 enzim:szubsztrátum, w/w), 37°C-on, 12 órán át végzett inkubálással hasítottuk le. A hasított fehérjéket a nem hasítottaktól 20 mM nátriumacetáttal (pH 4,5, + 6 M karbamid) ekvibrált HiLoad S 26/10 oszlopon választottuk el, és a fehérjéket ugyanazzal a pufferrel készült, lineáris 0-2 M NaCl-gradienssel eluáltuk. A hasított fehérjét tartalmazó frakciókat összeöntöttük, és előbb kétszer cserélt 1%-os ecetsav, végül pedig 0,1%-os trifluorecetsav ellen dializáltuk, azután liofilizáltuk [Edgerton és mtsai., Chemokine Protocols, Methods in Molecular Biology 2000, 138, 33-40, kiad.: Humana Press; Proudfoot és mtsai., Chemokine Protocols, Methods in Molecular Biology 2000, 138, 75-87, kiad.: Humana Press].

A WT RANTES-fehérje és mutáns RANTES-fehérje eredetiségét tömegspektrometriával igazoltuk. Ezzel analóg eljárással egy másik, az NH₂-terminálisán további Met aminosavat tartalmazó mutáns mellett, egyszeres vagy háromszoros 40-es RANTES-mutánsokat és egyszeres vagy háromszoros 50-es mutánsokat is előállítottunk.

c) Vad típusú (WT) RANTES és RANTES-mutánsok expresszálása és tisztítása *Pichia pastoris*ban

Érett, háromszoros, 40-es RANTES-mutánst (R44A-K45A-R47A) állítottunk elő mega-láncindítón alapuló PCR-mutagenézis [Datta, Nucl. Acid Res. 23, 4530-4531 (1995)] alkalmazásával. A mutánst, *S. cerevisiae*-eredetű Mat- α pre-proszignálpeptiddel, pPIC9K *Pichia pastoris* expressziós vektorba, leolvasási keretbe klónoztuk.

A szekvencia ellenőrzése után, a plazmidot elektroporációval *Pichia pastoris* GS115(*his4*) gazdatörzsbe transzferáltuk. His⁺-klónokat szkríneltünk a RANTES-mutáns expressziójára nézve. A kisléptékű expressziós vizsgálatot az InVitrogentől (Life Technologies) származó Pichia Expression Kit reagenskészlethez mellékelt leírás szerinti standard eljárásokkal végeztük. Röviden, a tenyészetet szénforrásként glicerint tartalmazó, dúsított tápoldatban felszaporítottuk, majd leüleptítettük és metanolt tartalmazó tápoldattal indukáltuk a mutáns RANTES-fehérje expresszióját. A RANTES-mutáns tápoldatba történő szekréciónak Coomassie késsel festett SDS-PAGE-vel mutattuk ki.

RANTES-mutánst magas szinteken (körülbelül 500-750 mg/l) termelő klónt alkalmaztunk nagy, rázatott flasksokban történő léptéknövelésre. A fermentált tápoldatot 5000 rpm-mel lecentrifugáltuk és a felülúszót tisztítottuk.

A felülúszóból a fehérjét egyetlen kromatográfiás lépésben, 0,1 M Tris-HCl-lel ekvilibrált, Heparin Sepharose oszlopon tisztítottuk. Az elúciót 20 oszloptérfogat mennyiségű, az előbbi pufferrel készült, lineáris 0-2 M NaCl-gradienssel végeztük. A fehérje azonosságát tömegspektrometriával igazoltuk és felismertük, hogy ilyen rendszerben, az így termelt RANTES-mutáns (R44A-K45A-R47A) a vad típusú molekulához képest, az N-terminálison csonkolt (azaz az első két aminosav hiányzik). Az így előállított mutánst háromszoros, 40-es RANTES (3-68) mutánsként (R44A-K45A-R47A) azonosítottuk, amelyek az aminosav-szekvenciája a szekvencialistában 3. azonosítószámon bemutatott szekvenciával azonos.

d) A heparin kötődésének vizsgálatai

Heparin Sepharose kromatográfiát végeztünk 50 µg WT vagy mutáns RANTES-fehérjék alkalmazásával, amelyeket a 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) és 50 mM NaCl tartalmú pufferrel ekvilibrált Heparin Sepharose oszlopra vittünk fel, és 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) pufferrel készült, lineáris 0-2 M NaCl-gradienssel eluáltunk.

Heparin Sepharose kromatográfiát végeztünk 50 µg WT vagy mutáns RANTES-fehérjék alkalmazásával, amelyeket 50 mM nátriumacetáttal (pH 4,5) ekvilibrált MonoS kationcserélő oszlopra vittünk fel. A fehérjét 0-2 M NaCl-gradienssel eluáltuk.

Kompetíciós kötési vizsgálatot végeztünk WT RANTES, háromszoros, 50-es RANTES-mutáns, és háromszoros, 40-es RANTES-mutáns (a szekvencialistában 2. azonosítószámon bemutatott szekvencia, másnéven R44A-K45A-R47ARANTES) alkalmazásával, amelyeket ¹²⁵I-vel (specifikus aktivitás: 2200 mCi/mól) (Amersham) radioaktív jelzéssel láttunk el. Kilencvenhat-lyukú szűrőlemezeket kötési pufferben (50 mM HEPES, pH 7,2, 1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0,15 M NaCl és 0,5% BSA) áztattunk. A kötési pufferrel a

heparinból 20 mg/ml - 1 µg/ml koncentrációtartományban hígítási sorozatot készítettünk. A vizsgálatot lyukanként 100-100 µl ösztérfogatban (25 µl hígított heparin + 25 µl [¹²⁵I]-kemokin + 25 µl heparingyöngy (0,2 µg/ml, vízben) + 25 µl kötési puffer) végeztük. A vizsgálat háromszoros ismétlésben történt. A lemezeket szobahőmérsékleten, mozgatással, 4 órán át inkubáltuk. A szűrőlemezeket 200-200 µl mosópufferrel háromszor mostuk, a nem kötött jelzett kemokin eltávolítására vákuumpumpát alkalmaztunk. Ezután az egyes lyukakhoz 50-50 µl scintillánst adtunk, és radioaktivitást mértünk (1 perc/lyuk). Az adatokat GraFit szoftverrel analizáltuk.

e) Egyensúlyi kompetíciós receptorkötési vizsgálati eljárás

A vizsgálatot CCR1-et vagy CCR5-öt expresszáló CHO-transzfektánsokból preparált membránokon, scintillációs proximitási vizsgálattal (SPA) végeztük, amelyben tracerként [¹²⁵I]-MIP-1α-t alkalmaztunk. A kompetitorok a jelöletlen kemokinekből, 10⁻⁶-10⁻¹² M koncentrációtartományban, vizsgálati pufferrel (50 mM HEPES, pH 7,2, 1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0,15 M NaCl, 0,5% BSA) készült hígítási sorozatok voltak. Wheatgerm (búzacsíra) SPA gyöngyöket (Amersham) PBS-ben, 50 mg/ml koncentrációban feloldottunk, és a kötési pufferrel 10 mg/ml-re hígítottuk (0,25 mg/lyuk végkoncentráció). A CCR1-et vagy CCR5-öt expresszáló CHO-transzfektánsokból preparált membránokat -80°C-on tároltuk és kötési pufferben 80 µg/ml koncentrációra hígítottuk. A háttér csökkentésére irányuló vizsgálat előtt, a membránokat tartalmazó törzsoldatból és gyöngyöket tartalmazó törzsoldatból egyenlő térfogatokat kevertünk össze. A membránok végkoncentrációja 2 µg/ml, az [¹²⁵I]-MIP-1α végkoncentrációja pedig 0,1 nM volt. A lemezeket szobahőmérsékleten, mozgatással, 4 órán át inkubáltuk. A radioaktivitást mérése és az adatok elemzése a heparinkötési-vizsgálatban leírtak szerint történt.

f) Kemotaxis vizsgálatok

Monocitákon a kemotaxisvizsgálatokat mikro-Boyden kamrában történő vizsgálattal végeztük. Monocitákat tisztítottunk „buffy coat” frakcióból az alábbi izolációs eljárás alkalmazásával: 100 ml „buffy coat” oldatot 100 ml PBS-sel hígítottunk, Ficoll-ra rétegeztünk és szobahőmérsékleten, 600 x g-vel, 20 percig centrifugáltuk. A köztes réteget alkotó sejteket összegyűjtöttük, PBS-ben kétszer mostuk, és 5%, újszülött borjúból származó, hővel inaktivált szérumot, 2 mM glutamint és 25 mM HEPES-t tartalmazó RPMI 1640 tápoldatban (pH 7,2) 40-100*10⁶/ml koncentrációban felszuszpendáltuk. A sejteket a limfocita-frakciótól úgy választottuk el, hogy a sejtekhez, milliliterenként 10⁶ db, birkaeredetű vörösvérsejtet tartalmazó szuszpenzió adtunk, 12 órán át, 4°C-on roztaltattuk

(„rosetted”), és egy második Ficoll gradiensen szobahőmérsékleten, 900 x g-vel, 20 percig újra lecentrifugáltuk. A monociták a Ficoll és a puffer érintkezési felületén, a T-sejtek pedig az üledékben voltak. A monocitákat PBS-ben mostuk és $2,5 \cdot 10^6$ /ml koncentrációban RPMI 1640 tápoldatban felfuszpendáltuk. A sejtszuszpenzió tisztaságát előre és oldal-
 5 irányban szóródással FACS-analízissel mértük, és úgy találtuk, hogy a donortól függően a tisztaság 40-80%-os. RPMI tápoldatban, 30 μ l végtérfogatra hígított kemokint (10^{-6} - 10^{-12} M koncentrációtartományban) mértünk be az alsó lyukakba. Az alsó lyukakra, légbuborékmentesen, monociták esetében 5 μ m, T-sejtek esetében pedig 8 μ m pórusméretű filtert (Neuroprobe) helyeztünk, és a rendszert légmentesen lezártuk. A felső lyukakba RPMI
 10 tápoldatban $2,5 \cdot 10^6$ sejt/ml koncentrációjú sejtszuszpenzióból 50-50 μ l-t mértünk be. A kamrát monociták esetében 30 percig, T-sejtek esetében pedig 1,5 óráig inkubáltuk 37°C-on, CO₂-atmoszférában. Ezután a sejteket kiöntöttük, a membrán felső felszínét a sejtektől tisztára kapartuk, és a membránt PBS-sel mostuk. A membránt MeOH-ba történt 1 perces merítéssel fixáltuk, levegővel megszáritottuk és Fields A és B oldatokkal festettük. Az el-
 15 vándorolt sejteket az egyes lyukak esetében véletlenszerűen kiválasztott mezőkön 20x objektívvel felszerelt, IBAS leképezés-analizáló szoftverhez illesztett standard mikroszkópban számoltuk meg. Az adatok illesztését GraFit szoftver alkalmazásával végeztük.

g) Peritoneális sejtek toborzását vizsgáló eljárások

Az első vizsgálatban, 8-12 hetes korú nőstény BALB/c egerekben sejtek toborzást indukáltuk 0,2 ml steril sóoldatban (LPS-től mentes NaCl) oldott 10 μ g kemokin intraperitoneális injektálásával. A kemokinmutánst (0,2 ml steril sóoldatban oldott 10 μ g kemokin) az agonista beadása előtt 30 perccel adtuk be. Hatvan órával később, az egereket aeroszolozott CO₂-vel előltük. A hasüreget háromszor 5 ml PBS-sel kiöblítettük, és az öblítőfolyadékokat összeöntöttük. A lecentrifugált (600 x g, 10 perc) sejteket 1 ml végtérfogatban felfuszpendáltuk és az összes leukocitát hemocitóméterben megszámtuk.
 20
 25

A második vizsgálatban, az 1. napon, 8-12 hetes korú nőstény BALB/c egerekben sejtek toborzását indukáltuk 200 μ l, desztillált vízzel készült 3%-os tioglikolát oldat intraperitoneális injektálásával. A kemokinmutánst (0,2 ml steril sóoldatban oldott 10 μ g kemokin) a tioglikolát beadása előtt 30 perccel adtuk be. Ezután 3 napon át a kemokinmutánst naponta beadtuk (2., 3., és 4. nap). Az 5. napon az egereket aeroszolozott CO₂-vel előltük. A hasüreget háromszor 5 ml PBS-sel kiöblítettük, és az öblítőfolyadékokat összeöntöttük. A lecentrifugált (600 x g, 10 perc) sejteket 1 ml végtérfogatban felfuszpendáltuk és az összes leukocitát hemocitóméterben megszámtuk.
 30

h) Kísérletes autoimmun enkefalomyelitisz (EAE)

Immunizálási eljárás

5 Nyolchetas korú, 18-22 gramm tömegű, nőstény BL/6NCrIBR egereket a nyak hátsó részén, 0,1 ml, 0,25 mg komplett Freund-féle adjuvánsban (*Mycobacterium tuberculosis* tartalmazó CFA, Difco, Detroit, USA) emulgeált 200 µg MOG₃₅₋₅₅-peptiddel (Neosystem, Strasbourg, Franciaország) s.c. injektáltunk (0. nap). Az s.c. injekciót megelőzően, az egerek farokvénájába 200 µl, PBS-ben oldott 300 ng pertussis toxint (List Biological Lab., Campbell, CA, USA) adtunk be i.v. A 2. napon az állatoknak egy második, 300 ng pertussis toxint tartalmazó injekciót adtunk be i.p.

10 E folyamat eredményeként, körülbelül a 8-10. naptól kezdve az állatoknál, a farktól kiindulva a mellső láb irányába fokozatosan terjedő, progresszív paralízis jelentkezett.

Kísérleti terv

15 A kísérlethez az állatokat 10-10 állatból álló csoportokba osztottuk. Minden csoportot CFA-ban oldott MOG₃₅₋₅₅-peptiddel és pertussis toxinnal immunizáltunk, az immunizálási rend szerint.

1. csoport: pozitív kontrol, csak vivőanyaggal (PBS) oltva i.p.
2. csoport: pozitív kontrol, csak vivőanyaggal (PBS) oltva s.c.
3. csoport: háromszoros, 40-es RANTES mutáns, 10 µg/egér, i.p.
- 20 4. csoport: háromszoros, 40-es RANTES mutáns, 1 µg/egér, i.p.
5. csoport: háromszoros, 40-es Met-RANTES mutáns, 10 µg/egér, i.p.
6. csoport: háromszoros, 40-es Met-RANTES mutáns, 1 µg/egér, i.p.
7. csoport: egéredetű rekombináns β-interferon (m-IFN-β), 10000 U/egér, s.c.
8. csoport: m-IFN-β, 20000 U/egér, s.c.

25 Vivőanyag

Az összes 40-es RANTES mutánst, az összes 40-es Met-RANTES mutánst és az m-IFN-β-t PBS-sel hígítottuk a megfelelő koncentrációra.

Beadási módok

30 A 40-es RANTES mutánst, a 40-es Met-RANTES mutánst és az m-IFN-β-t naponta i.p. adtuk be. A beadási térfogat egerenként 200 µl volt. Az 1. és 2. csoportot egerenként 200 µl PBS-sel injektáltuk.

Kezelési időtartam

A kezelés minden állat esetében a kísérlet 4. napján kezdődött (a betegség szokásos jelentkezése előtt körülbelül 3-5 nappal) és 14 egymást követő napon át folytatódott (az állatokat a kísérlet 18. napján elöltük).

5 Klinikai megfigyelések

Az 5. naptól kezdve, az állatokat egyenként megvizsgáltuk a paralízis kialakulására nézve az alábbi klinikai pontrendszer szerint:

0 = a betegségnek nincs jele

0,5 = a fark részleges paralízise

10 1 = a fark paralízise

1,5 = a fark paralízise + az egyik hátsó láb részleges paralízise

2 = a fark paralízise + a hátsó láb gyengesége vagy részleges paralízise

2,5 = a fark paralízise + a hátsó láb részleges paralízise (medencesülyedés)

3 = a fark paralízise + a hátsó láb teljes paralízise

15 3,5 = a fark paralízise + a hátsó láb teljes paralízise + akaratlan váladékömlés

4 = a fark paralízise + a hátsó láb teljes paralízise + a mellső láb gyengesége vagy részleges paralízise

5 = haldoklás vagy halál

2. Eredmények

20 a) Heparinkötés vizsgálata

A tisztított, egy vagy három helyen mutált RANTES-fehérjéket analizáltuk heparinkromatográfiával és az ezek eluálásához szükséges NaCl-koncentrációt összehasonlítottuk a WT RANTES elúciós profiljával. Mivel a heparinnal létesített kölcsönhatás elektrosztatikus jellegű, a mutánsok viselkedését MonoS oszlopon is megvizsgáltuk. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy mivel a mutagenezissel bázikus aminosavakat távolítottunk el, ezért a mutánsok eluálásához szükséges NaCl-koncentráció lecsökkent. Ha a NaCl-koncentrációt tekintve a kationcserélő-kromatográfiánál tapasztalt eltérés és a heparinkromatográfiánál tapasztalt érték különbsége pozitív, akkor a heparinnal létesült kölcsönhatást specifikusnak tekintjük (1. táblázat).

30 Heparin és a háromszoros, 40-es és 50-es RANTES-mutánsok közötti közvetlen kölcsönhatást kompetíciós kötési vizsgálattal mértük. A WT RANTES-t és a mutánsokat az Amersham által megadottak szerint jódoztuk, és mindegyik ugyanazon specifikus aktivitású volt (2200 mCi/mól). Azonban, a háromszoros, 40-es mutánsoknak körülbelül a 20%-a kötődött a heparingyöngyökhöz (maximális cpm = 4000, a WT RANTES és az 50-

es mutánsok esetében pedig 22000 cpm (3. ábra)). Ez azt mutatja, hogy a 40-es hurokban lévő, mutált aminosavak alkotják a RANTES heparinkötő-kapacitásának döntő részét. Másfelől, ez azt is felveti, hogy az 50-es hurokban lévő feltételezett GAG-kötő motívum nem „igazi” GAG-kötőhely.

5 b) Egyensúlyi kompetíciós receptorkötési vizsgálati eljárások

A háromszoros, 40-es és 50-es mutánsok azon sajátosságát vizsgáltuk, hogy képesek-e a [¹²⁵I]-MIP-1 α -val versengeni a stabil CHO-transzfektánsokból preparált rekombináns CCR1-hez és CCR5-höz való kötődés terén. A két receptor tekintetében egyetlen egyszeres mutáció esetében sem tapasztaltunk jelentős különbséget (eredmények
10 nincsenek bemutatva). A háromszoros mutánsok közül egyik sem különbözött WT RANTES-től a CCR5-höz való kötődésben. Azonban, a CCR1 esetében, a háromszoros, 40-es mutáns affinitása századára csökkent, míg a háromszoros, 50-es mutáns affinitásában csak kismértékű (háromszoros) csökkenést tapasztaltunk (4. ábra).

 c) Kemotaxis-vizsgálat

15 A háromszoros, 40-es és 50-es mutánsok a WT RANTES aktivitásával összevet-
hető mértékben tudtak monocita-kemotaxist indukálni, kivéve a háromszoros, 40-es mu-
tánst, amely csak 1 μ M-os koncentrációban volt képes jelentős kemotaxis kiváltására.
Azonban, a háromszoros, 40-es és 50-es mutánsok egyenlő mértékben voltak képesek T-
sejt kemotaxist indukálni (5. ábra). A monocitákkal végzett kemotaxis-vizsgálat eredmé-
20 nyei jól egybecsengenek a receptorkötési-vizsgálatok során kapott eredményekkel.

A monocitákkal végzett kemotaxis-vizsgálat eredményei jól egybecsengenek a
receptorkötési-vizsgálatok során kapott eredményekkel. A háromszoros, 40-es RANTES-
mutánsnak a monociták kemotaxisával kapcsolatos aktivitásának hiánya összhangban van
a CCR1-re vonatkozó affinitás hiányával.

25 g) Peritoneális sejtek toborzását vizsgáló eljárások

Abban a koncentrációban (10 μ g/egér), amelyben a RANTES jelentős mértékű
toborzást váltott ki, a háromszoros, 40-es RANTES-mutáns nem volt képes indukálni a
sejtek toborzását a peritoneumban (6. ábra).

Továbbá, ha a RANTES beadása előtt 30 perccel a mutánsból beadtunk 10 μ g-t, a
30 RANTES által indukált sejtek toborzódása gátlódott. Ennek következtében, a GAG-kötés
megszüntetése *in vivo* gátló hatással volt a kemokin által indukált sejttoborzásra.

Analóg eredményeket mutatunk be a 7. ábrán a csonkolt RANTES (3-68) három-
szoros, 40-es mutánsával (Pichia pastorisban előállítva), a 8. ábrán a háromszoros, 40-es

MIP-1 β mutánssal (K45A-R46A-K48A), és a 9. ábrán a MIP-1 α háromszoros, 40-es MIP-1 α mutánssal (R18A-R46A-R48A) kapcsolatban. A tioglikoláttal indukált sejttoorzást a RANTES háromszoros, 40-es mutánsa jól gátolta (10. ábra)

h) Kísérletes autoimmun encephalomyelitisz (EAE)

5 A RANTES háromszoros, 40-es mutánsa dózistól függő hatást mutatott az egér EAE-modellen. Az 1 μ g/egér és 10 μ g/egér dózisban, a MOG-gal végzett elsődleges immunizálást követő 10. naptól naponta, i.p. beadott fehérje a rekombináns m-IFN- β -vel végzett referenciakezeléssel összevethető hatékonyságot mutatott (11. ábra). A betegség kitérésének ideje jelentős mértékben eltolódott és a betegség súlyossága (a görbe alatti terület mérete szerint) jelentősen redukálódott. Továbbá, a kísérlet során elért maximális klinikai pontszámok átlaga szintén lecsökkent. Hasonló kísérletben, a másik mutáns (Met-RANTES háromszoros, 40-es mutánsa) semmiféle jótékony hatást sem tudott kifejteni.

15 Az eredményeink szerint, a RANTES összes háromszoros, 40-es mutánsával végzett kezelés egyértelműen jótékony hatású volt. MOG-gal történt immunizálást követően egerekben csökkentette a krónikus EAE klinikai jeleit. Ezért, a RANTES háromszoros, 40-es mutánsa jótékony terápiás hatást gyakorol, és krónikus mielinpusztulással járó betegségek, például MS, kezelésére alkalmazható.

1. táblázat

20 Heparin és Mono-S (kationcserélő) oszlopokról történő elúcióhoz szükséges NaCl-koncentráció (M)

RANTES Mutáció	Heparin	MonoS	Δ NaCl ^{Hep-S}	Δ NaCl ^{Mono-s}	$\Delta \Delta$ NaCl
No (WT)	0. 80	0.91	-----	-----	-----
R44A	0. 61	0. 82	0. 19	0. 09	0. 10
K45A	0. 65	0. 97	0. 15	0. 04	0. 11
R47A	0. 65	0. 84	0. 15	0. 07	0. 08
R44A-K45A-R47A	0. 47	0. 70	0. 33	0. 21	0. 11
K55A	0. 70	0. 86	0. 10	0. 05	-0.05
K56A	0. 90	0. 94	-0.10	0. 07	-0. 17
R59A	0. 79	0. 85	0. 01	0. 06	-0.05
K55A-K56A-R59A	0. 70	0. 75	0. 10	0. 16	-0.06

Az alábbi 2. táblázat egyértelművé teszi a szekvencialistában és a szövegben említett szekvenciák azonosságát.

2. táblázat

5

Szekvencia azonosító szám	A szekvencia leírása
1	vad típusú (vt) RANTES
2	Háromszoros 40-es RANTES mutáns
3	Háromszoros 40-es RANTES (3-68) mutáns
4	Háromszoros MIP-1-alfa mutáns (R18A-R46A-R48A)
5	Háromszoros MIP-1-béta mutáns (K45A-R46A-K48A)
6	Háromszoros 50-es RANTES mutáns
7	Háromszoros 40-es Met-RANTES mutáns
8	R44A-RANTES mutáns
9	K45A-RANTES mutáns
10	R47A-RANTES mutáns
11	K55A-RANTES mutáns
12	K56A-RANTES mutáns
13	R59A-RANTES mutáns
14	P1 láncindító
15	P2 láncindító
16	P3 láncindító
17	P4 láncindító
18	P5 láncindító
19	P6 láncindító
20	P7 láncindító
21	P8 láncindító
22	P9 láncindító
23	P10 láncindító
24	P11 láncindító
25	P112 láncindító
26	P13 láncindító
27	P14 láncindító
28	P15 láncindító
29	P16 láncindító
30	vad típusú 1309
31	vad típusú MIP-1-alfa
32	vad típusú MIP-1-béta
33	vad típusú MIP-4
34	vad típusú MIP-5
35	vad típusú HCC1
36	vad típusú 136512
37	vad típusú MCP-2

Szabadalmi igénypontok

1. Az 1. ábrán bemutatottak szerint, a 40-es hurok kationos helyén legalább két mutációt hordozó, és a vad típusú molekulához képest csökkent GAG-kötési aktivitást mutató CC-kemokinmutáns alkalmazása *sclerosis multiplex* és/vagy más mielinpusztulással járó betegség kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására, ahol a CC-kemokin RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3, MIP-4, HCC1, I309, I35612 vagy MCP-2 lehet.
2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a kemokinmutáns RANTES-mutáns.
3. A 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a kemokin mutáns olyan, tripla RANTES-mutáns, amelyben a 40-es hurok kationos helyén a három bázikus aminosav más aminosavval lett szubsztituálva.
4. A 3. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a 40-es hurok kationos helyén lévő három bázikus aminosav alaninnal, szerinnel, treoninnal, prolinnal vagy glicinnel lett szubsztituálva.
5. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a kemokinmutáns a szekvencialistában 3. azonosítószámon bemutatott szekvencia szerinti RANTES-mutáns.
6. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a kemokinmutáns a szekvencialistában 2. azonosítószámon bemutatott szekvencia szerinti RANTES-mutáns.
7. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a kemokinmutáns a szekvencialistában 4. azonosítószámon bemutatott szekvencia szerinti MIP-1 α -mutáns.
8. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a kemokinmutáns a szekvencialistában 5. azonosítószámon bemutatott szekvencia szerinti MIP-1 β -mutáns.
9. Gyógyászati készítmény, amely *sclerosis multiplex* és/vagy más mielinpusztulással járó betegség kezelésére szolgáló, aktív összetevőként az 1-8. igénypontok bármelyikében meghatározott kemokinmutánst gyógyászatilag elfogadható kötőanyaggal együtt tartalmaz.
10. Csonkolt és mutált, emberi RANTES, amelynek aminosav-szekvenciája a szekvencialistában 2. azonosítószámon bemutatott szekvencia.
11. A 10. igénypont szerinti csonkolt és mutált RANTES-t kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó DNS-molekula.
12. A 10. igénypont szerinti DNS-molekulát tartalmazó expressziós vektor.
13. A 12. igénypont szerinti expressziós vektort tartalmazó gazdasejt.

14. Az 1. igénypont szerinti polipeptid előállítására szolgáló rekombináns eljárás azzal jellemezve, hogy a 13. igénypont szerinti sejteket megfelelő tápoldatban tenyésztjük.

5

A meghatalmazott:

10

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő

700

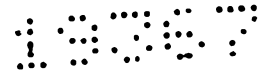
21 oldal

11 aláírás

14 referencia

46 oldal

7000



PCT/EP01/11428

1/11

1. ábra

SPYSSDT.TPCCFYAIRPLPRAHIKEFYTS GK.	CSNPVVVYTKRNRQVC	ANPEKKWREYINSLEMS
SKSMQVPPFRCCCFSPAEQELPLRALLCYRNTSSI.	CSNEGLIFKJKRGKEAC	ALDTVGNVQRHRQMLRHCPKSRK
ASLAADFTTACCFSYTSRQIPQNFADYFETSQ.	CSKPGVIFLTKRGRQVC	ADPSEWVQKIVSDLELSA
QVGTNKELCCLVYTSWQIPQKFIVDYSETSPQ.	CPKLGVILLTKRGRQIC	ADPNKKWQKIISDLKLANA
DRFHATSADCCISYTPRSIPCSLLESYFETNSE.	CSKPGVIFLTKRGRFVC	ANPSDKQVQVCHRMKLDTRIKTRKN
SFHFAADCCTSYISQSIPCSILMKSIFYETSS.	CSKPGVIFLTKRGRQVC	AKPSGPGVQDCMKKLPYSI
APMGSDPPTACCFSYTARKLPRNFVVDYETSLL.	CSQPVVVFTKRSKQVC	ADPSESWVQEVYVDLELN
TKTESSRGPYHPSECCFTYTKIPRQIMDYETNSQ.	CSKPGVIFLTKRGRSVC	INPSEKVVQDIYKDMKEN
PKVPEWVNTPSTCCLKYEKVLRRLVVGYRKALN..	CHLPALIFVTKRNREVC	INPNDWVQEYIKDPNPLPPLPFRNLSTVKIITAKNGQPQLNSQ
QFDSVSIPTCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQ	CPKEAVIFTKRGRKQVC	ADPKERWVRDSMKHLDQIFQNLKP

kationos hely

5 10 15

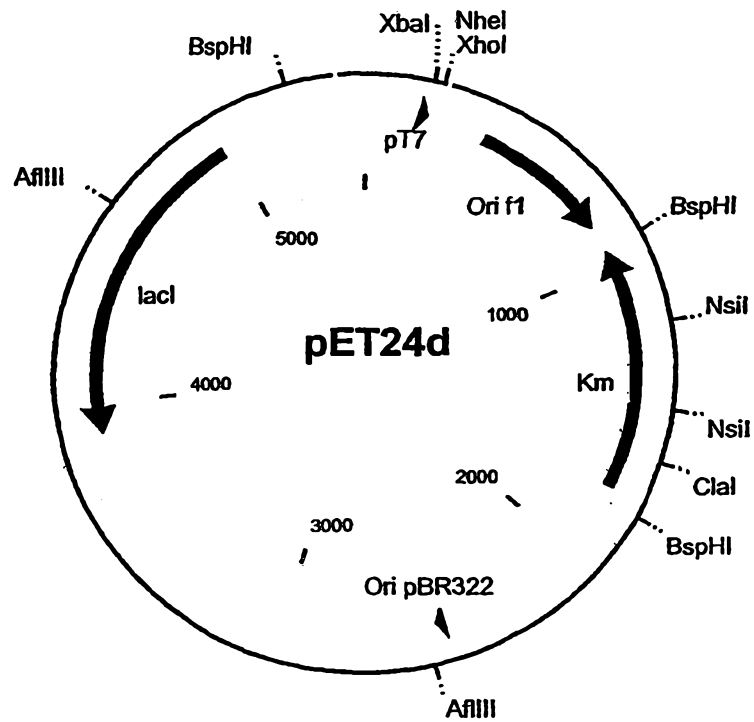
40-es hurok

RANTES
I309
MIP-1a
MIP-4/R83915/PARC
MIP-3
MIP-5/HCC2/G5
MIP-1b
HCC1.
I35612
MCP-2

PCT/EP01/11428

2/11

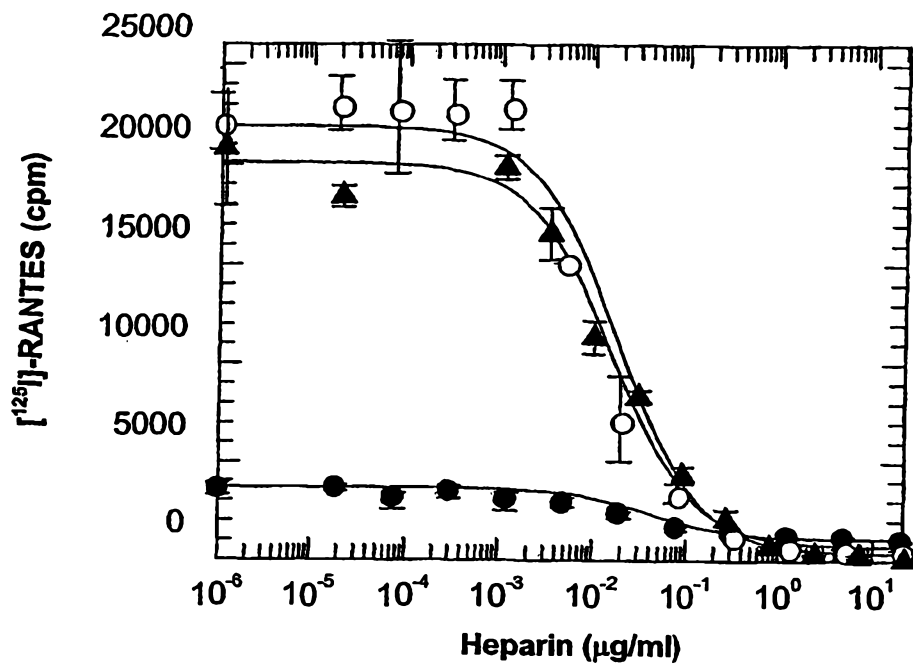
2. ábra



PCT/EP01/11428

3/11

3. ábra

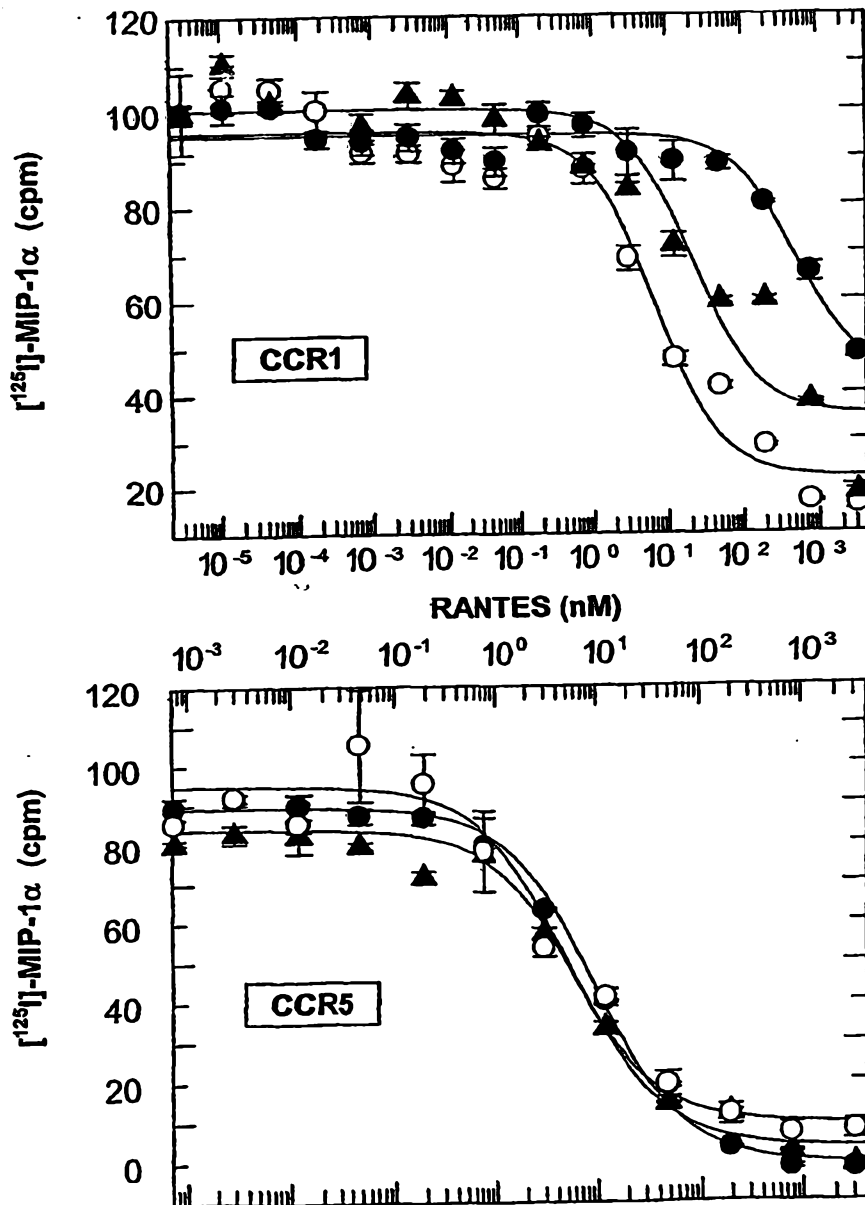


WT (O); Háromszoros 50-es mutáns (\blacktriangle), Háromszoros 40-es mutáns (\bullet)

PCT/EP01/11428

4/11

4. ábra

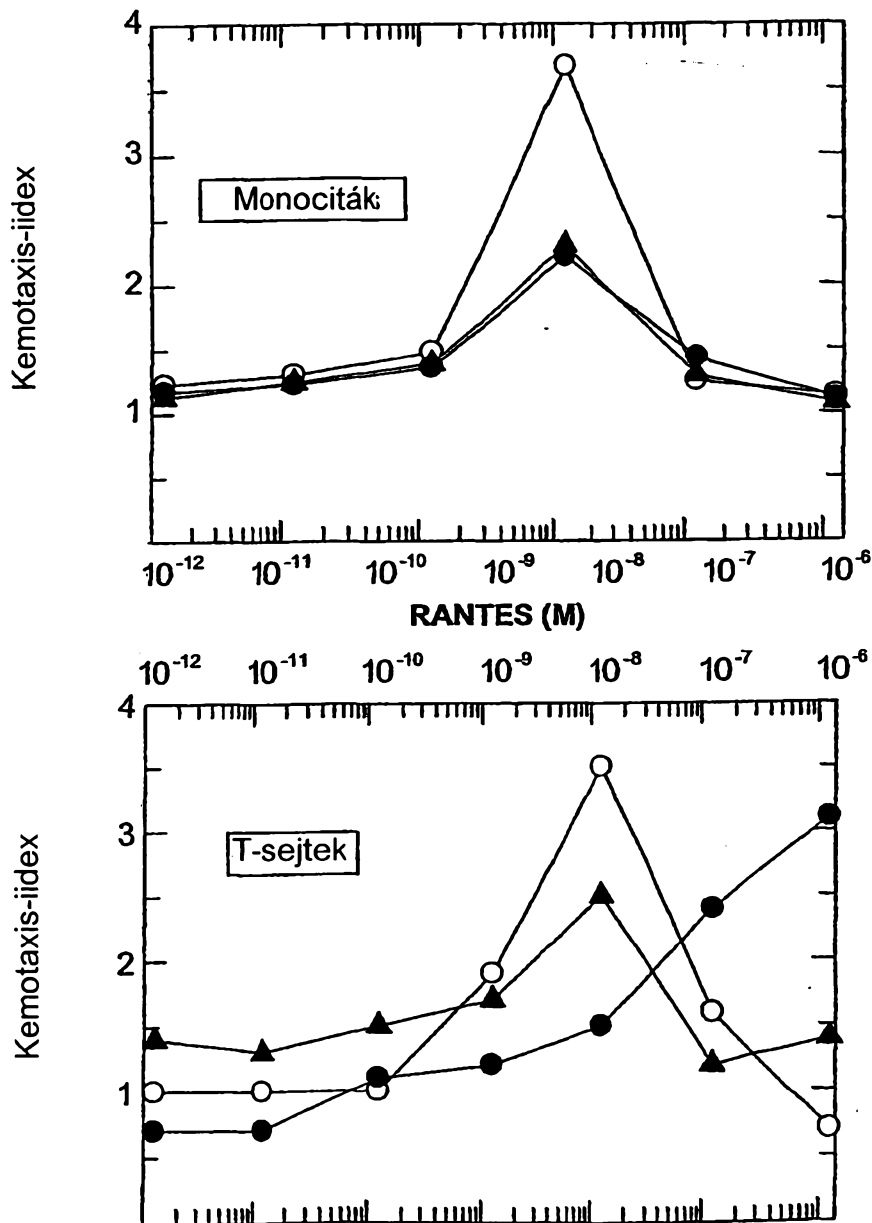


WT (O); Háromszoros 50-es mutáns (\blacktriangle), Háromszoros 40-es mutáns (\bullet)

PCT/EP01/11428

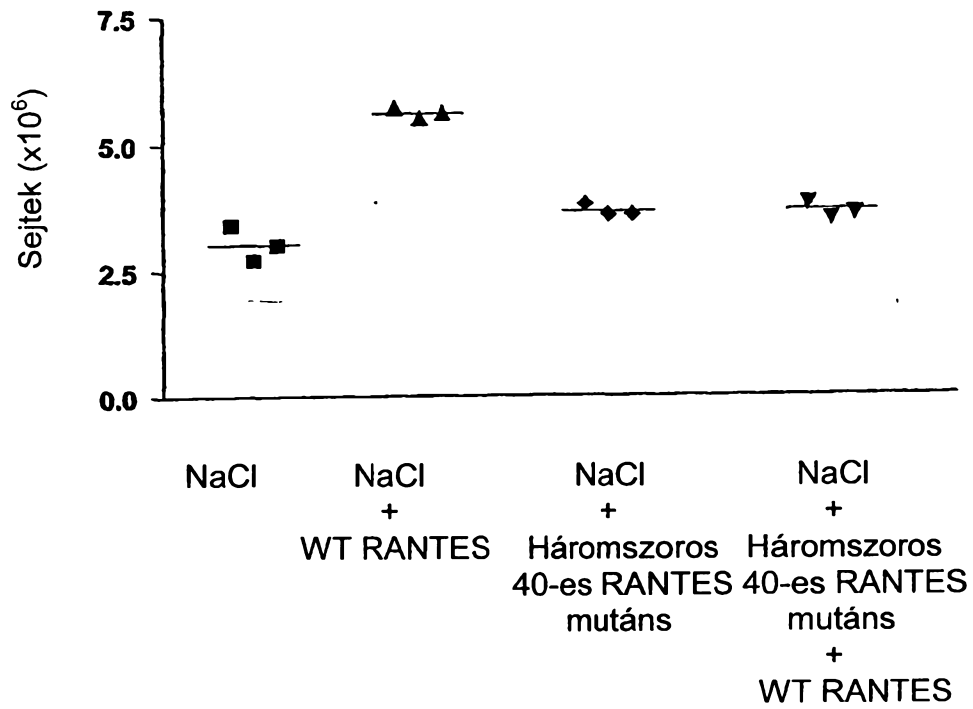
5/11

5. ábra



WT (O); Háromszoros 50-es mutáns (▲), Háromszoros 40-es mutáns (●)

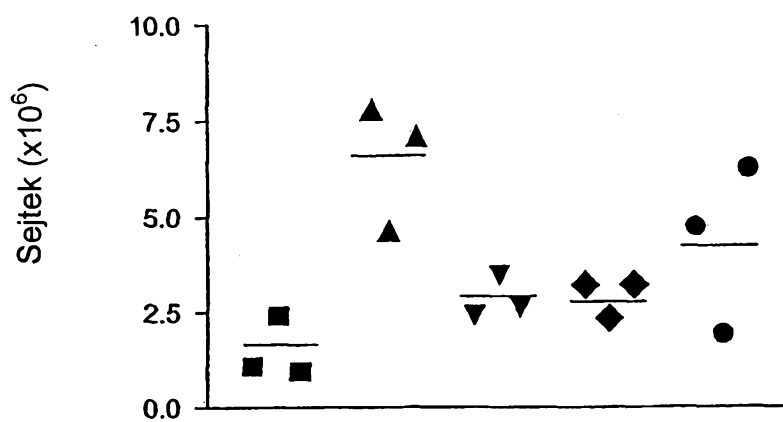
PCT/EP01/11428

6/11
6. ábra

PCT/EP01/11428

7/11

7. ábra

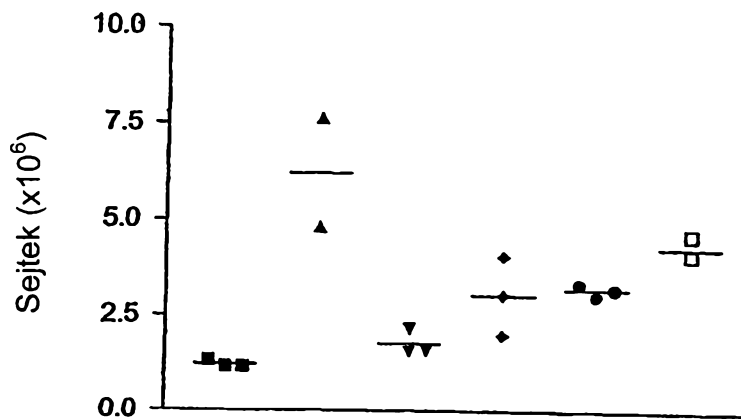


- NaCl
- ▲ NaCl + WT Rantes
- ▼ NaCl + háromszoros 40'-es RANTES (3-68) mutáns
- ◆ NaCl + 10 µg háromszoros 40-es RANTES (3-68) mutáns + WT RANTES
- NaCl + 10 0,1 µg háromszoros 40-es RANTES (3-68) mutáns + WT-RANTES

PCT/EP01/11428

8/11

8. ábra

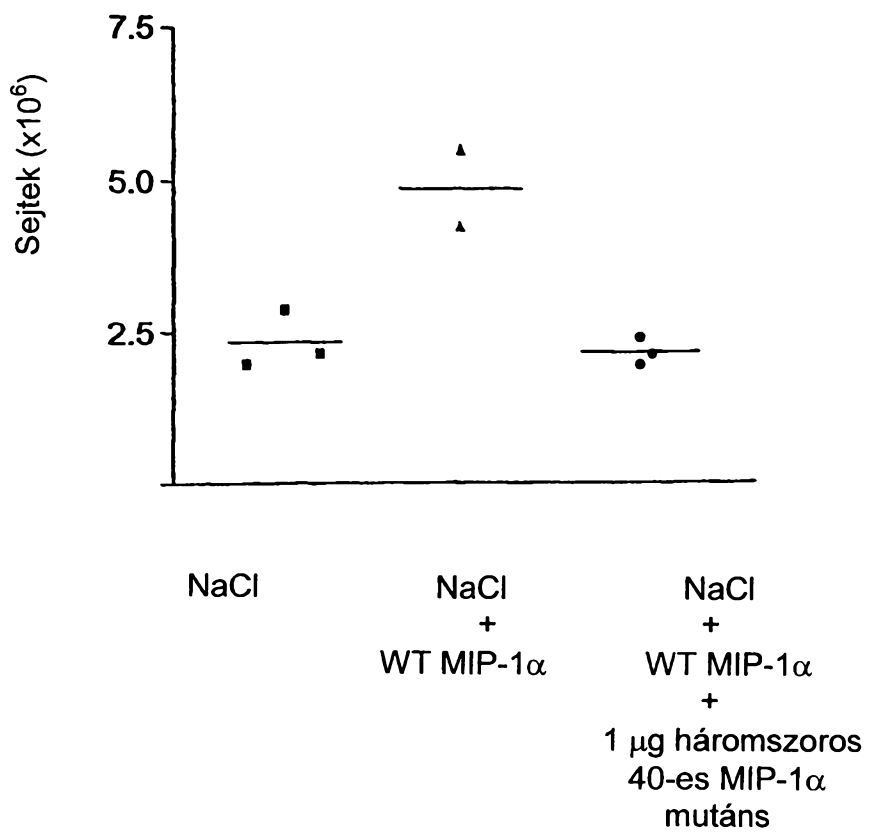


- NaCl
- ▲ NaCl + WT Rantes
- ▼ NaCl + háromszoros 40'-es RANTES (3-68) mutáns
- ◆ NaCl + 10 µg háromszoros 40-es RANTES (3-68) mutáns + WT RANTES
- NaCl + 10 0,1 µg háromszoros 40-es RANTES (3-68) mutáns + WT-RANTES
- NaCl + 0.1 µg háromszoros 40-es MIP-1β mutáns + WT MIP-1β

PCT/EP01/11428

9/11

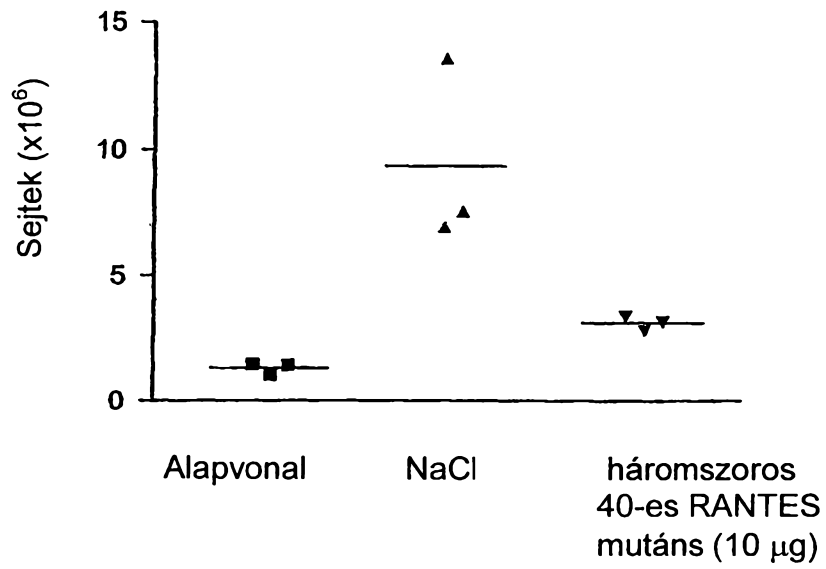
9. ábra



PCT/EP01/11428

10/11

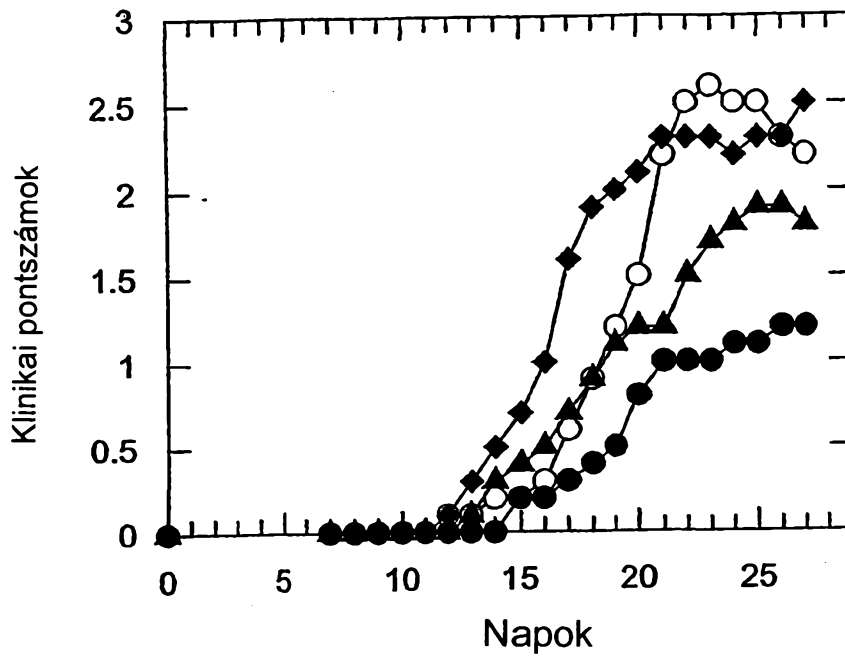
10. ábra



PCT/EP01/11428

11/11

11. ábra



- kontroll
- háromszoros 40-es RANTES mutáns
- ▲ m-IFN-β
- ◆ háromszoros 40-es Met-RANTES mutáns