

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **64679 B1**

7(51) C 12 N 15/19

C 07 K 14/52

A 61 K 38/19, 38/48

G 01 N 33/68

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

3А

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 104266

(22) Заявено на 22.03.2000

(24) Начало на действие
на патента от: 28.09.1998

Приоритетни данни

(31) 97116863	(32) 29.09.1997	(33) EP
97122471	19.12.1997	EP
98104216	10.03.1998	EP

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 11 на 30.11.2000

(45) Отпечатано на 30.11.2005

(46) Публикувано в бюлетин № 11
на 30.11.2005

(56) Информационни източници:
Baggiolini M. et al., Ann. Rev. Immunol.,
55, 97-179, 1994

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприетател(и):

APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS
HOLDING N.V., CURACAO, ANTILLES,
PIETERMAAI 15 (NL)

(72) Изобретател(и):

Paul Proost, Heverlee-Leuven

Sofie Struyf, Rumst

Jo Van Damme, Brussels (BE)

(74) Представител по индустриална
собственост:

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

(86) № и дата на РСТ заявка:

PCT/EP1998/006142, 28.09.1998

(87) № и дата на РСТ публикация:

WO1999/016876, 08.04.1999

(54) АМИНО-ТЕРМИНАЛНО СКЪСЕНИ МСР-2 КАТО АНТАГОНИСТИ НА ХЕМОКИНИ

(57) Изобретението се отнася до аминотерминално срязан МСР-2, на който липсват NH₂- крайните аминокиселини, съответстващи на аминокиселинни остатъци 1, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 от природносрещашия се МСР-2, и който притежава хемокинантагонистична активност, както и до сДНК последователността, която ги кодира, до тяхната употреба в терапията и/или диагностиката на болестни състояния, при които се изисква антагонистична активност на хемокиния ефект, и до фармацевтични препарати, които ги съдържат.

12 претенции, 4 фигури

BG 64679 B1

(54) АМИНО - ТЕРМИНАЛНО СЪКСЕНИ MCP-2 КАТО АНТАГОНИСТИ НА ХЕМОКИНИ

Област на изобретението

Настоящото изобретение се отнася до аминокиселини - терминално съксени MCP-2, при които липсват NH_2 -терминални аминокиселини, съответстващи на аминокиселинни остатъци 1, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 на естествено срещащи се MCP-2 и притежаващи антагонистична активност към хемокини, както и сДНК последователности, които ги кодират, тяхната употреба при терапия и/или диагностика на заболявания, при които антагонистичната активност на повлияване на хемокините е необходима, и включващите ги фармацевтични препарати.

Предшестващо състояние на техниката

Хемокините представляват семейство от малки провъзпалителни цитокини с левкоцитни хемотактични и активиращи свойства. В зависимост от позицията на първите цистеини, семейството на хемокините може да бъде разделено на C-C, C-X-C и C-X3-C хемокини (Baggiolini M. et al., 1994; Baggiolini M. et al., 1997; и Taub D. et al., 1996).

Много C-X-C хемокини като интерлевкин - 8 (IL-8) са хемотактични за неутрофили, докато C-C хемокините, като моноцитен хемотактичен белтък - 3 (MCP-3) са активни към различни левкоцити, включващи моноцити, лимфоцити, еозинофили, базофили, NK - клетки и дендритни клетки.

NH_2 -терминалният домен на хемокините участва в свързването с рецептор и NH_2 - терминалната обработка може както да активира хемокините, така и да ги направи напълно неактивни.

C-X-C базичният плосък белтък на хемокина се превръща в неутрофилен хемотактичен пептид (NAP-2) само след отделянето на 24 NH_2 -терминални остатъци (Walz A., et al., 1989 и Van Demme J. et al., 1990).

В резултат на деления на до 8 NH_2 -терминални остатъци от IL-8, се наблюдава увеличена хемотактична активност, но последващото отцепване на последователност глутаминова киселина - левцин - аргинин, която е разположена преди първия цистеинов остатък при всички неутрофилни хемотактични C-X-C хемокини, предизвиква пълно инактивиране (Clark - Lewis I et al., 1991).

Подобна NH_2 - терминална протеолиза (до 8 аминокиселини) на друг C-X-C хемокин - гранулоцитен хемотактичен белтък - 2 (GCP-2) не повлиява неутрофилната хемотактична активност (Proost P. et al., 1993a).

Синтетични C-C хемокини MCP-1, MCP-3 и RANTES, при които липсват 8 до 9 NH_2 -терминални аминокиселини, са неактивни към моноцити и се използват като рецепторни антагонисти (Gong J., et al., 1996 и Gong J., et al., 1995).

В резултат на удължаването на RANTES с един метионинов остатък се наблюдава пълно инактивиране на молекулата и Met-RANTES има поведение на антагонист за автентични RANTES молекули (Proudfoot A.E. et al., 1996).

Клонът на човешки MCP-2 (моноцитен хемопривличащ белтък - 2) е изолиран чрез диференциален скрининг на библиотека с сДНК проби, произлезли от стимулирани срещу почиващи периферни кръвни лимфоцити (PBL) (те първоначално бяха наречени "HC14", Chang H. C. et al., 1989). Белтъчната последователност, произлязла от сДНК, е идентична на тази на пречистен естествено срещащ се MCP-2, обаче предполагаемият алелен вариант също е изолиран, при който Gln46 замества Lys46 (Van Coillie et al., 1997).

MCP-2 освен това е синтезиран чрез твърдофазов химичен метод (Proost P. et al., 1995).

Описание на изобретението

Основна цел на настоящото изобретение е аминокиселини - терминално съксени MCP-772, при които липсват NH_2 -терминални аминокиселини, съответстващи на аминокиселинни остатъци 1, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 от естествено съществуващия MCP-2 и притежаващи антагонистична активност към хемокин.

По специално, настоящото изобретение се отнася до MCP-2 (6-76), който представлява MCP-2, при който липсват 1-5 NH_2 -терминални аминокиселини, както е показано на фигура 1 и SEQ ID N0:3 или SEQ ID N0:4.

Такива аминокиселини - терминално съксени MCP-2 съгласно изобретението могат да бъдат в гликозилирана или негликозилирана форма.

Понятието "хемокинов антагонист" означава "който действа като антагонист на зрял, с пълна дължина, естествено срещащ се хемокин".

Друга част от настоящото изобретение е свързана с ДНК молекули, включващи ДНК последователности, кодиращи аминокиселини - терминално съксени MCP-2 съгласно изобретението, включително нуклеотидни последователности, които са по същество еднакви.

"Нуклеотидни последователности, които са по същество еднакви" включват всички други последователности на нуклеинови киселини, които бла-

годарение на разпада на генетичния код също кодират дадените аминокиселини последователности.

Настоящото изобретение освен това включва експресионни вектори, включващи посочените ДНКи, клетки гостоприемници, трансформирани с такива вектори и метод на приготвяне на такива аминокиселини - терминално скъсени МСР-2 съгласно изобретението чрез култивиране на подходящи хранителни среди на посочените трансформирани клетки.

ДНК последователност, кодираща белтъци съгласно изобретението, може да бъде инсерирана и лигирана в подходящ плазмид. Веднъж формиран, експресионният вектор се въвежда в подходяща клетка гостоприемник, която след това експресира вектора(и), при което се получава желаният белтък.

Експресията на който и да е от рекомбинантните белтъци съгласно изобретението, както е споменато тук, може да бъде осъществена в еукариотни клетки (т. е. дрожди, насекоми или клетки на бозайници) или прокариотни клетки, използвайки подходящи експресионни вектори. Може да бъде използван всеки метод, известен в съществуващото ниво на техниката.

Например ДНК молекулите, кодиращи белтъци, получени от които и да е от посочените методи, са инсериращи в подходящо конструирани експресионни вектори чрез техники, добре известни в съществуващото ниво на техниката (вж. Sambrook et al., 1989). Двойно верижна сДНК е свързана с плазмидни вектори чрез хомополимерна опашка или чрез рестрикционно свързване, включващо използването на синтетични ДНК свързващи молекули или техники за лигиране с тъпи краища: използват се ДНК лигази за свързване на ДНК молекулите и нежеланото свързване се избягва чрез третиране с алкална фосфатаза.

За да е възможна експресията на желания белтък, експресионният вектор трябва да включва освен това специфични нуклеотидни последователности, съдържащи транскрипционна и транслационна регулаторна информация, свързана с ДНК, кодираща желания белтък, по такъв начин, че да позволи генната експресия и продукцията на белтъка. Първо, с цел генът да бъде транскрибиран, той трябва да бъде предшестван от промотор, различен от РНК полимеразата, към който полимеразата свързва и следователно инициира транскрипционния процес. Съществува голямо разнообразие от такива промотори, използвани понастоящем, които оперират с различна ефикасност (силни и слаби промотори).

За еукариотните гостоприемници могат да бъдат използвани различни транскрипционни и транслационни регулаторни последователности, в

зависимост от природата на гостоприемника. Те могат да произлизат от вирусни източници, като аденовируси, говежди папиломен вирус, Simian вирус и подобни, където регулаторните сигнали са асоциирани с определен ген, който притежава висока степен на експресия. Примери за това са ТК промотор на херпесния вирус, SV40 ранния промотор, дрождевия промотор за ген gal4, и др.

Регулаторните сигнали за инициране на транскрипцията могат да бъдат подбрани така, че да позволяват репресия или активиране, и по такъв начин експресията на гените може да бъде модулирана.

ДНК молекула, включваща нуклеотидна последователност, кодираща белтък съгласно изобретението, е инсерирана във вектор(и), съдържащ(и) оперативно свързани транскрипционни и транслационни регулаторни сигнали, които имат способност да интегрират желаната генна последователност в клетка гостоприемник.

Клетките, които са стабилно трансформирани с въведената ДНК, могат да бъдат освен това селектирани чрез въвеждането на един или повече маркери, които позволяват селекция на клетки гостоприемници, съдържащи експресионния вектор. Маркерът може също така да осигурява прототрофност на ауксотрофния гостоприемник, бицидна устойчивост, т.е. устойчивост на антибиотици или тежки метали като мед или подобни. Селекционираният маркерен ген може или да бъде директно свързан с ДНК генната последователност, която ще се експресира, или да бъде въведен в същата клетка чрез съвместна трансфекция. Може да са необходими допълнителни елементи за оптимална синтеза на белтъците съгласно изобретението.

Фактори от значение при селекцията на определен плазмид или вирусен вектор включват: простота, с която клетките реципиенти, които съдържат вектора, могат да бъдат разпознати и селектирани от тези реципиентни клетки, които не съдържат вектора; броят на копията на вектора, които са желани в определен гостоприемник; и дали е желателно да е възможно "прехвърляне по совалков механизъм" на вектора между клетки гостоприемници от различни видове.

Веднъж приготвени вектор(и) или ДНК последователност, съдържаща конструкция(и) за експресия, ДНК конструкцията(ите) може да бъде въведена в подходяща клетка гостоприемник, чрез който и да е от най-разнообразни и подходящи методи: трансформация, трансфекция, конюгация, протопластна фузия, електропорация, преципитация с калциев фосфат, директно микроинжектиране и други.

Клетките гостоприемници могат да бъдат както прокариотни, така и еукариотни. За предпочитане са еукариотни гостоприемници, т.е. клетки на бозайници, като хора, маймуни, мишки, и яйцеклетки на китайски хамстер (СНО), защото те осигуряват пост - транслационно модифициране на белтъчните молекули, включващо правилно нагъване или гликозилиране, на правилни места. Освен това дрождевите клетки могат да проведат пост - транслационна пептидна модификация, включващи гликозилиране. Съществуват най - разнообразни рекомбинантни ДНК стратегии, които използват силни промоторни последователности и голям брой на копията на плазмидите, които могат да бъдат използвани за продукция на желаните белтъци в дрожди. Дрождите разпознават водещата последователност на клонирани генни продукти на бозайници и отделят пептиди, носещи водещи последователности (т.е. пре-пептиди).

След въвеждането на вектора(ите), клетките гостоприемници се отглеждат на селективни среди, които селектират растежа на вектор - съдържащите клетки. Експресията на клонирания генна(и) последователности) води до продукцията на желаните белтъци.

Амино - терминално скъсените МСР-2 съгласно изобретението, могат да бъдат приготвени, по която и да е процедура, известна в съществуващото ниво на техниката, по-специално чрез добре установените химични синтезни процедури, прилагащи автоматизирани твърдофазови пептидни синтеза-тори, последвани от хроматографско пречистване.

Хемокините съгласно изобретението могат например да бъдат синтезирани чрез Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил) tBoc (t-бутоксикарбонил) или която и да е друга сравнима химическа синтезна процедура, със или без подходяща предпазна група страничната верига на различни аминокиселини. Аминокиселините със или без подходящи групи, протектиращи страничната им верига, предварително се активират - т.е. третира с HBTU/NOBT [2-(1H-бензотриазол-лил)-1,1,3,3 - тетраметил - уромиев хексафлуорофосфат /1-хидроксид-бензотриазол] и се купират с растящата пептидна верига. Преди добавянето на следващия остатък, предпазната група (например Fmoc) се отстранява от β -амино групата. След синтеза всички защитни групи се отстраняват, интактните пептиди с пълна дължина се пречистват и химично или се нагъват ензимно (включително формирането на дисулфидни мостове между цистеини) в съответния хемокин съгласно настоящото изобретение.

Пречистването на естествените, синтетичните и рекомбинантните белтъци е проведено по всеки един от известните за тази цел методи, т.е. всяка конвенционална процедура, включваща екстракция, преципитация, хроматография, електрофореза или други подобни (виж за пример Proost P. et al., 1996). Друга процедура на пречистване, която е за предпочитане да се използва за пречистване на белтъка от изобретението, е афинитетна хроматография с помощта на моноклонални антитела, или афинитет към хепарин, които свързват целевия белтък, и които са получени и имобилизирани върху гел матрица, съдържаща се в колона. Непречистени препарати, съдържащи белтъците, се пропускат през колоната. Белтъкът ще се свърже с хепарина или със специфичното антитяло в колоната, докато примесите ще преминат. След измиване белтъкът се елуира от гела чрез смяна на рН или йонната сила.

Аминотерминално скъсените МСР-2 съгласно изобретението са полезни при терапията и/или диагностиката на болестите, при които се изисква антагонистична активност на хемокините ефекти. Примери за такива болести включват: възпалителни болести, свързани с ангиогенезата и хематопоезата, тумори, инфекциозни болести, включително HIV, аутоимунни болести, атеросклероза, заболявания на белия дроб и кожни болести.

Следователно в друг аспект настоящото изобретение осигурява използването на белтъка на изобретението при производството на лекарствено средство за третиране на посочените болести.

Лекарственото средство е представено за предпочитане под формата на фармацевтичен препарат, съдържащ белтъците на изобретението, заедно с един или повече фармацевтично приемливи носители и/или ексципиенти. Такива фармацевтични препарати формират още един друг аспект от настоящото изобретение.

Друго изпълнение на изобретението е методът за третиране на посочените болести, характеризира се с това, че включва даване на фармакологично активно количество от аминокиселинно скъсените МСР-2 на изобретението на обекти с риск от развиване на подобни болести или на обекти, вече показващи такава патология.

Изобретението е пояснено с помощта на следните примери, които не го ограничават. Примерите се отнасят до фигурите, посочени по-долу.

Описание на приложените фигури

Фигура 1 доказва аминокиселинната после-

дователност на MCP-2 и неговия известен вариант. Сигналните последователности са посочени в курсив, докато C-остатъците са в по-черен шрифт. Стрелките посочват първите аминокиселини на аминокиселинно терминално скъсвания MCP-2(6-76) на изобретението.

Подчертана е аминокиселината, която е различна в MCP-2 варианта.

Фигура 2 SDS-PAGE на аминокиселинно скъсен MCP-2(6-76):

старт 1: естествен MCP-2 (1-76, 100 ng/старт);
старт 2: естествен MCP-2 (1-76, 30 ng/старт);
старт 3: естествен MCP-2 (6-76, 30 ng/старт); и
старт 4: синтетичен MCP-2 (1-76, 60 ng/старт).

Геловите се проявяват при редуциращи условия и белтъците се оцветяват със сребро.

Фигура 3 показва сравнение на хемотактичната потенция на модифицираните MCP-2 форми.

Интактни естествени (nat) и синтетични (syn) MCP-2(1-76), NH₂-терминално скъсен естествен MCP-2(6-76) и COOH-терминално скъсен синтетичен MCP-2(1-74) бяха анализирани за хемотактична активност спрямо THP-1 клетки. Резултатите представят средната стойност C1 ± SEM от четири или повече независими експеримента.

Фигура 4 - естественият MCP-2 е по-слаб агонист от MCP-1 при мобилизиране на калция в моноцити. Интактният MCP-2 (15, 50 и 150 ng/ml) в зависимост от дозата повишава [Ca²⁺]_i в THP-1 клетки. Показан е резултатът на един представителен експеримент от два проведени такива.

Примери за изпълнение на изобретението

Пример 1. Аминокиселинно скъсен MCP-2
Материали и методи

Хемокин и имуноанализ

MCP-2 беше синтезиран и пречистен, както е описано по-рано (Proost P. et al., 1995).

Специфични анти-човешки MCP-2 АТ бяха получени от мишки и бяха пречистени афинитетно на колона със Sepharose, към която беше прикрепен синтетичен MCP-2 при условията, дадени от производителя (CNBr активирана Sepharose 4B, Pharmacia, Упсала, Швеция).

ELISA плаки бяха покрити с афинитетно пречистени анти-човешки MCP-2 и като улавящо АТ беше използвано биотинилирано анти-MCP-2. Детектирането беше проведено с маркиран с пероксидаза стрептавидин и ТМВ. Границата на откриване за MCP-2 ELISA беше около 0.1 ng/ml.

Получаване и пречистване на MCP-2

Моноцитни хемотактични белтъци бяха пречистени от кондиционирана среда, получена от периферни кръвни мононуклеарни клетки, от 132 кръвни донори, получени от Кръвните трансфузионни центрове в Антверпен и Леувен (Proost P. et al., 1996).

Еритроцитите и гранулоцитите бяха отстранени чрез седиментация в хидрокси-етил скорбяла (Fresenius AG, Бад Хамбург, Германия) и чрез градиентно центрофугиране в разтвор на натриев метризоат (Lymphoprep; Nyegaard, Осло, Норвегия)

Мононуклеарните клетки (60 x 10⁶ клетки) бяха инкубирани (5 x 10⁶ клетки/ml) с 10 µg/ml Con A и 2 µg/ml LPS. След 48 до 120 h, кондиционираната среда беше събрана и съхранявана при -20°C до пречистването.

Естествен MCP-2 беше пречистен с четириетапна процедура на пречистване, както е описано преди това (Proost P. et al., 1996).

Накратко, кондиционираната среда беше концентрирана на стъкло с контролиран размер на порите или силициева киселина и частично пречистена чрез афинитетна хроматография на колона с хепарин-Sepharose (Pharmacia).

Фракциите, притежаващи MCP-2 имунорективност, бяха по-нататък пречистени чрез Mono S Aquipore PR-300 колона (Perkin Elmer, Norwalk CT), уравновесена с 0.1 % трифлуороцетна киселина (TFA). Белтъците бяха елуирани с градиент на ацетонитрил.

Биохимично охарактеризиране на MCP-формите чрез SDS-PAGE, секвенционен аминокиселинен анализ и мас-спектрометрия

Чистотата на фракциите от колоната беше определена чрез SDS-PAGE при редуциращи условия на Tris/tricine гелове (Proost P. et al., 1996). Белтъците бяха оцветени със сребро и бяха използвани следните маркери за относителна молекулна маса (Mr): OVA (Mr 45 000), карбоанхидраза (Mr 31 000), соев трипсинов инхибитор (Mr 21 500), β-лактоглобулин (Mr 18 400), лизозим (Mr 14 400) и апротинин (Mr 6 500).

NH₂-терминалната последователност на пречистени хемокини беше определена чрез деградация на Edman на пулсов течен 477A/120A белтъчен анализатор (Perkin Elmer) с N-метилпиперидин като свдояваща база. Блокираните белтъци бяха разцепени между Asp и Pro в 75% мравчена киселина за 50 h. Смлените с мравчена киселина части бяха секвенирани без допълнително пречистване.

Mr на MCP-2 беше определена чрез матрикс-асистирана лазерна десорбционна йонизация/време на летяща - мас спектрометрия (MALDI/TOF-

MS)(Micromass TofSpec, Манчестер, Великобритания).

Бяха използвани като матрица и съответно вътрешен стандарт α -циано-4-хидроксидинамикова киселина и цитохром C.

Откриване на хемотактична активност

MCP-2 беше тестван за неговата хемотактична способност върху прясно пречистени моноцити (2×10^6 клетки/ml) или моноцитни THP-1 клетки (0.5×10^6 клетки/ml; 2 дни след субкултивиране) в микрокамера на Boyden с помощта на третиран с поливинилпиролон поликарбонатни мембрани с размер на порите 5 μ m.

Пробите и клетките бяха разредени в HBSS (Life technologies/Gibco BRL, Paisley, Шотландия), с добавка на 1 mg/ml човешки серумен албумин (Red Cross Belgium). След инкубиране от 2 h при 37°C, клетките бяха фиксирани и оцветени с Diff-Quick оцветяващ разтвор (Harleco, Gibbstown, NJ), а клетките, които преминават през мембраните, бяха преброени микроскопски на десет полета с имерсия при 500-пъти увеличение.

Хемотактичният индекс (CI) на проба (три повторения във всяка камера) беше изчислен, като броят на клетки, които мигрират към пробата върху броя клетки, които мигрират към контролната среда (Van Damme J et al., 1992).

За десенсибилизационните експерименти бяха инкубирани клетки с биологично активни хемокин-варианти за 10 min при 37°C, преди да бъдат прибавени към горната ямка на Boyden микрокамерата. Процентът на инхибиране на CI индекса беше изчислен като се използва CI от третиран с HBSS клетки спрямо пробата като референтна стойност.

Детекция на вътреклетъчни концентрации Ca^{2+}

Вътреклетъчните концентрации на калция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) бяха измервани, както е описано преди това (Wuys A. et al., 1997). Пречистени моноцити или THP-1 клетки (10^7 клетки/ml) бяха инкубирани в минимална среда на Eagle (EMEM, Gibco) + 0.5 % FCS с флуоресцентния индикатор фура-2 (фура-2/AM 2-5 μ M; Molecular Probes Europe BV, Leiden, Холандия) и 0.01 % Pluronic F-127 (Sigma, St. Louis MO).

След 30 min при 37°C клетките бяха промити двукратно и ресуспендирани до 10^6 клетки/ml в HBSS с 1mM Ca^{2+} и 0.1 % FCS (буфериран с 10mM Hepes/NaOH при pH 7.4). Клетките бяха уравниени при 37°C за 10 min, преди да се измери фура-2 флуоресценцията на LS50B луминесцентен спектрофотометър (Perkin Elmer).

При възбуждане при 340 и 380 nm, флуорес-

ценция беше установена при 510 nm. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ беше изчислена от уравнението на Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985). За да се определи R_{max} , клетките бяха лизирани с 50 μ M дигитонин. След това pH беше доведено до 8.5 с 20 mM Tris и R_{min} беше получено чрез добавяне на 10 mM EGTA към лизирани клетки. Използваното K_d беше 224 nM.

За десенсибилизационните експерименти моноцити или THP-1 клетки бяха първо стимулирани с буфер, хемокин или антагонист на хемокин при различни концентрации. Като второ стимулиране беше използван MCP-2 в концентрация, индуцираща значително нарастване на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ след престимулиране с буфер. Второто стимулиране беше приложено 2 min след добавяне на първия стимул. Процентите инхибиране на нарастването на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в отговор на второто стимулиране бяха изчислени, сравнявайки сигнала след престимулиране с хемокин или хемокин антагонист със сигнала след добавяне на буфер.

Резултати

Изолиране на пост-транслационно модифицирани MCP-2 форми

Беше използван специфичен и чувствителен ELISA тест за откриване на различни MCP-2 форми, произведени от моноядрени клетки от периферната кръв, стимулирани с митоген и ендотоксин.

Средата беше пречистена съгласно стандартна изолационна процедура (Proost P. et al., 1996), включваща адсорбция към стъкло с определен размер на порите и хроматография с хепарин Sepharose.

След това беше проведено пречистване чрез FPLC моно S катионообменна хроматография и после беше приложено допълнително пречистване с C-8 RP HPLC. Молекулните маси бяха измерени чрез SDS-PAGE и чрез MALD/TOF-MS.

Бяха изолирани различни форми на MCP-2: в допълнение към автентичния 7.5 kDa MCP-2(1-76) аминокиселинна форма на MCP-2, на която липсват пет остатъка [MCP-2(6-76)] беше пречистен до хомогенност чрез RP-HPLC и идентифициран чрез анализ на аминокиселинната последователност (фиг. 2). MALDI/TOF-MS (Таблица I) показва молекулна маса от 8881 Da за интактен MCP-2 (теоретичното M_r е 8893 Da), докато за MCP-2(6-76) беше измерена молекулна маса от 8365 Da, потвърждавайки делецията от пет аминокиселини от NN_2 края (теоретичното M_r е 8384 Da). Функционалното сравняване на тези природни MCP-2 форми при анализа за THP-1 хемотаксис показва, че интактният MCP-2 е все още активен при 5 ng/ml, докато скъсеният MCP-2(6-76) остава лишен от хемотак-

тична активност, когато се изследва при концентрация в обхвата 0.6 до 60 ng/ml (фиг. 3). Интактният природен MCP-2 беше също така сравнен за потентност със синтетичния MCP-2(1-76) и с карбокси-терминално скъсена синтетична форма (Proost P. et al., 1995), на която липсват два остатъка [MCP-2(1-74)].

Минималната ефективна хемотактична концентрация на тези форми също така е 5 ng/ml (фиг. 3). Въпреки че в хемотактичния анализ специфичната активност на природен интактен MCP-1 и MCP-2 е сравнима (Van Damme J, et al., 1992), мобилизационният капацитет за калций на MCP-2 е все още предмет на спорове.

Обаче, в Ca^{2+} мобилизационните експерименти, минималната ефективна доза както за природния, така и за синтетичния MCP-2(1-76) беше 10 пъти по-висока в сравнение с тази на природния интактен MCP-1(1-76) (фиг. 4), докато MCP-2(6-76) остава неактивен.

Независимо от това, интактивният MCP-2(50 ng/ml) е способен да се десенсибилизира към MCP-2(15 ng/ml) и MCP-3 (10 ng/ml), давайки 52% и 45% инхибиране на хемотаксиса, респ.

Благодарение на тази ниска специфична ак-

тивност на MCP-2 в анализа с Ca^{2+} , десенсибилизирането на хемотаксиса от MCP-2(6-76) беше проведено в микрокамера на Boyden. Тъй като интактният MCP-2 осъществява кръстосано десенсибилизиране с активен MCP-1, MCP-2 и MCP-3 при хемотаксисния анализ на моноцити (Sozzani S. et al., 1994), ние изследвахме дали природният неактивен MCP-2(6-76) може също така да се десенсибилизира към MCP-1, MCP-2, MCP-3 и RANTES (Таблица II). Преинкубиране на THP-1 клетки със 100 mg/ml активен MCP-2(6-76) може значително да инхибира хемотаксиса, индуциран от 10 ng/ml; MCP-1 (63 %), 5 ng/ml от MCP-2 (75 %), 30 ng/ml от MCP-3 (62 %) и 100 ng/ml от RANTES(75 %). Нещо повече, хемотаксис в отговор на 3 пъти по-ниска концентрация на съответните MCP напълно се инхибира (91 - 100 %) от 100 ng/ml MCP-2(6-76). В допълнение, при ниска концентрация, напр. 10 ng/ml, MCP-2(6-76) все още може значително да инхибира хемотактичната активност, индуцирана от MCP-1 (3 ng/ml), MCP-2 (1.5 ng/ml) или MCP-3 (10 ng/ml) и RANTES (30 ng/ml). Обобщено, продуцираният природно MCP-2(6-76) е неактивен като хемоатрактант и антагонизира няколко C-C хемокини, като ефектът е най-силно преобладаващ при MCP-3.

Таблица 1.

Биохимична характеристика на природните форми на MCP-2. NH_2 -краен аминокиселинен анализ и сравнение на експерименталните (SDS-PAGE и MALDI/TOF-MS) и теоретични M_r на природни MCP-изомери, пречистени чрез C-8 RP-HPLC.

MCP-форма	NH_2 -крайна последователност	M_r (Da)		
		теоретично не-гликозилиран	SDS-PAGE	MALDI/TOF-MS
MCP-2 (1-76)	блокирана	8893	7500	8881
MCP-2 (2-76)	SIPITCC	8384	7000	8365

Таблица 2.

MCP-2(6-76) намалява чувствителността на моноцитния хемотактичен отговор на MCP-1, MCP-2 и RANTES в микрокамера.

Хемокин ^a	Концентрация	Антагонизиране на хемотактичния отговор ^b		% инхибиране на хемотаксиса
		буфер	100 ng/ml MCP-2(6-76)	
MCP-1	10	22.3 ± 7.9	8.3 ± 3.8	63 ± 21
	3	15.0 ± 8.0	1.3 ± 0.3	99 ± 1.0
MCP-2	5	36.0 ± 12.6	10.8 ± 6.1	75 ± 8.0
	1.5	6.7 ± 1.4	1.5 ± 0.3	91 ± 7.0
MCP-3	30	13.2 ± 0.4	6.0 ± 4.0	62 ± 31
	10	3.0 ± 1.5	<1	100 ± 0.0
RANTES	100	6.3 ± 0.8	2.6 ± 1.3	75 ± 19
	30	4.0 ± 0.8	1.5 ± 0.3	77 ± 16
		буфер	100 ng/ml MCP-2(6-76)	
MCP-1	10	12.7 ± 2.3	10.5 ± 3.8	24 ± 1.8
	3	7.5 ± 0.0	3.0 ± 0.3	69 ± 4.0
MCP-2	5	38.0 ± 5.3	27.2 ± 4.9	30 ± 6.0
	1.5	18.3 ± 4.6	9.2 ± 1.4	45 ± 23
MCP-3	30	13.2 ± 1.9	8.0 ± 1.0	37 ± 19
	10	7.7 ± 1.4	1.7 ± 0.3	90 ± 6.0
RANTES	100	5.5 ± 0.6	5.8 ± 0.9	17 ± 7.0
	30	3.2 ± 0.7	2.5 ± 0.5	39 ± 18

^a MCP-1, MCP-2, MCP-3 или RANTES са добавяни като хемоаттрактанти в по-долу разположените гнезда.

^b По-горе разположените гнезда на микрока-

мерата са запълнени с THP-1 клетки, преинкубирани с MCP-2(6-76) или с буфер

^c средна стойност на CI+SEM от 3 независими опита

СПИСЪК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ

(1) ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ:

(i) ЗАЯВИТЕЛ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ: APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.

y.

(Б) УТИЛА: 14 JOHN B. GORSTRAWEG

(B) ГРАД: CURACAO

(Г) ДЪРЖАВА: ХОЛАНДИЯ АНТИЛ

(Д) ПОЩЕНСКИ КОД (ZIP): НЯМА

(E) ΤΕΛΕΦΟΝ: 639300

(Ж) ТЕЛЕФАКС: 614129

(ii) НАИМЕНОВАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО: АМИНО ТЕРМИНАЛНО СРЯЗАН

КАТО АНТАГОНИСТ НА ХЕМОКИНИ

(iii) БРОЙ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ: 4

(iv) ЧИТАЕМА ОТ КОМПЮТЪР ФОРМА:

(A) ТИП СРЕДА: ФЛОПИ ДИСК

(Б) КОМПЮТЪР: IBM PC СЪВМЕСТИМ

(В) ОПЕРАЦИОННА СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS

(Г) СООФТУЕЪР: PatentIn Release # 1.0, Версия # 1.30 (ЕРО)

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 99 АМИНОКИСЛОТИНИ

(Б) ТИП: АМИНОКИСЛОТА

(В) БРОЙ ВЕРИГИ:

(Г) ТОПОЛОГИЯ: дискретная

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(iii) **ХИПОТЕТИЧНОСТ: НЕ**

(ix) ХАРАКТЕРНИ ЧЕРТИ:

(А) НАИМЕНОВАНИЕ/КЛЮЧ: Белгък

(Б) ЛОКАЛІЗАЦІЯ: 1 .. 76

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ: SEQ ID NO: 1:

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Met Ala Ala Thr
-20 -15 -10

Phe Ser Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile
-5 1 5

Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu
10 15 20 25

Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val
30 35 40

Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu
 45 50 55
 Arg Trp Val Arg Asp Ser Met Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn
 60 65 70
 Leu Lys Pro
 75

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 99 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(C) БРОЙ ВЕРИГИ:

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: НЕ

(ix) ХАРАКТЕРНИ ЧЕРТИ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ/КЛЮЧ: Белтък

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 1 .. 76

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ: SEQ ID NO: 2:

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 71 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(C) БРОЙ ВЕРИГИ:

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: НЕ

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ: SEQ ID NO: 2:

```

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

```

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 71 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселини

(B) БРОЙ ВЕРИГИ:

(Г) ТОПОЛОГИЯ: linear

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: НЕ

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ: SEQ ID NO: 4:

```

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

```

Патентни претенции

1. Аmino-терминално скъсен MCP-2, в който липсват аминокиселини, съответстващи на аминокиселинни остатъци 1, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 от природно срещания се MCP-2 и който проявява хемокин антагонистична активност.

2. Аmino-терминално скъсен MCP-2 съгласно претенция 1, характеризиращ с това, че му липсват аминокиселини, съответстващи на аминокиселинни остатъци 1-5 от природно срещания се MCP-2 и че проявява хемокин антагонистична активност.

3. Аmino-терминално скъсен MCP-2 съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че притежава аминокиселинна последователност SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

4. Аmino-терминално скъсен MCP-2 съгласно една или повече от предходните претенции, характеризиращ се с това, че е в гликозилирана форма.

5. ДНК молекула, съдържаща ДНК последователност, кодираща аmino-терминално скъсения MCP-2 от изобретението съгласно една или повече от предходните претенции, включваща практически същите нуклеотидни последователности.

6. Експресионен вектор, включващ ДНК молекулата от претенция 5.

7. Клетка гостоприемник, включваща експресионния вектор съгласно претенция 5.

8. Рекомбинантен метод за изготвяне на всеки от белтъците от претенциите от 1 до 4, характеризиращ се с това, че включва култивиране в подходяща хранителна среда на клетките от претенция 6.

9. Белтък съгласно всяка от претенциите от 1 до 4 за употреба като лекарство средство.

10. Употреба на белтък съгласно всяка от претенциите от 1 до 4 в производството на лекарство средство за лечение и/или диагностика на болести, при които се изисква антагонистична активност на хемокиния ефект.

11. Употреба съгласно претенция 10 в производството на лекарство средство за лечение на възпалителни заболявания, HIV инфекция, на болести, свързани с ангиогенеза и хепатогенеза и на тумори.

12. Фармацевтичен препарат, характеризиращ се с това, че включва белтък съгласно всяка от претенциите от 1 до 4, заедно с един или повече фармацевтично приемливи носители и/или пълнители.

Литература

Baggiolini M. et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 55, 97-179, 1994.

Baggiolini M. et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 15, 675-705, 1997.

Chang H. C. et al., *International Immunology*, 1(4), 388-397, 1989.

Clark-Lewis I. et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 23128-23134, 1991.

De Meester I. et al., *J. Immunol. Methods* 189, 99-10526, 1996.

Deng H. et al., *Nature.*, 381, 661-666, 1996.

Gong J. et al. *J. Exp. Med.*, 181, 631-640, 1995.

Gong J. et al., *J. Biol. Chem.* 271, 10521-10527, 1996.

Gryniewicz G. et al., *J. Biol. Chem.*, 260, 3440, 1985.

Proost P. et al., *Biochemistry*, 32, 10170-10177, 1993a.

Proost P. et al., *J. Immunol.*, 150, 1000-1010, 1993.

Proost P. et al., *Cytokine*, 7, 97-104, 1995.

Proost P. et al., *Methods: A companion to Methods in Enzymol.*, 10, 82, 1996.

Proudfoot A. E. et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 2599-2603, 1996.

Sambrook et al. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Schols D. et al., *J. Exp. Med.*, 186, 1383-1388, 1997.

Sozzani S. et al., *J. Immunol.*, 152, 3615, 1994.

Taub D. et al., *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7, 335-76, 1996.

Van Coillie E. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 231, 726-730, 1997.

Van Damme J. et al., *Eur. J. Biochem.*, 181, 337-344, 1989.

Van Damme J. et al., *Eur. J. Immunol.*, 20, 2113-8, 1990.

Van Damme J. et al., *J. Exp. Med.*, 176, 59, 1992.

Walz A. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 969-75, 1989.

Wuyts A., et al., *Biochemistry* 36, 2716-2723, 1997.

Приложение: 4 фигури

MCP-2

-23

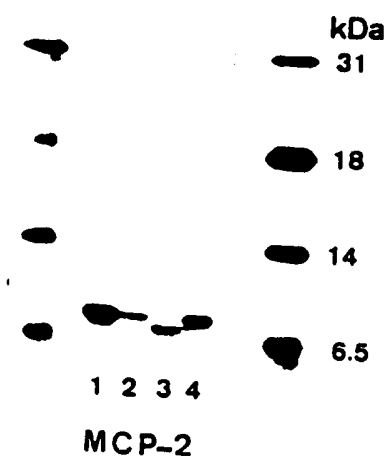
-23 1 ↓
MKVSAALLCL LLMAATFSPQ GLAQPDVSI PITCCFNVIN RKIPIQRLES YTRITNIQCP
KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWRDMSMKHL DQIFONLKP
76

MCP-2 Variant

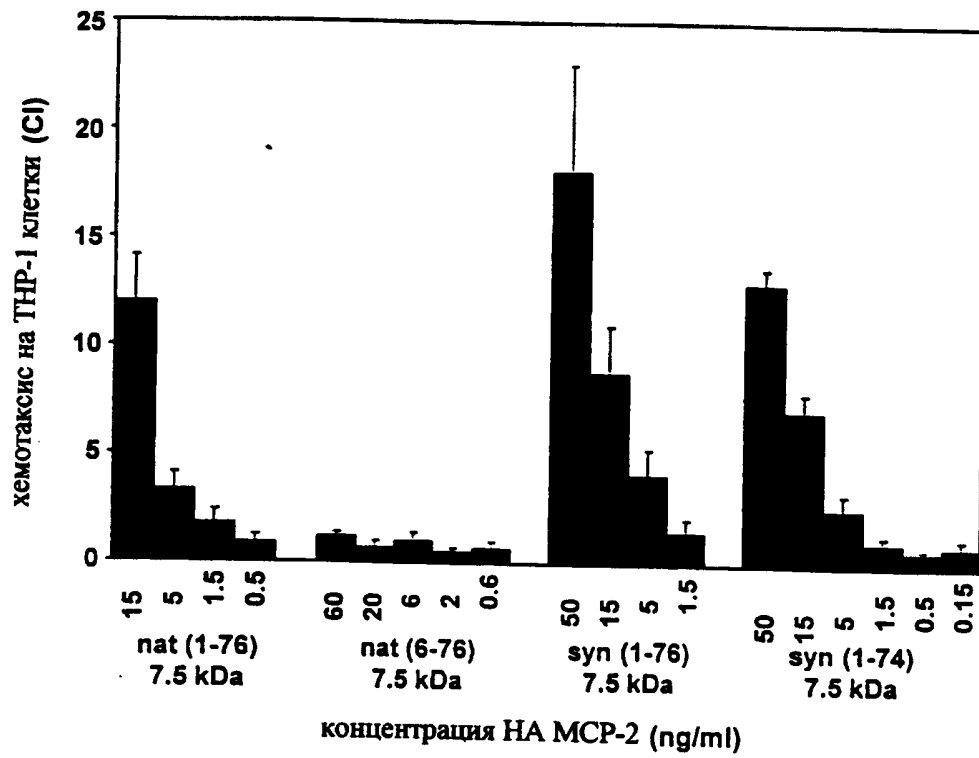
-23

-23 1 ↓
MKVSAALLCL LLMAATFSPQ GLAQPDVSI PITCCFNVIN RKIPIQRLES YTRITNIQCP
KEAVIFQTKR GKEVCADPKE RWRDMSMKHL DQIFQNLPK
76

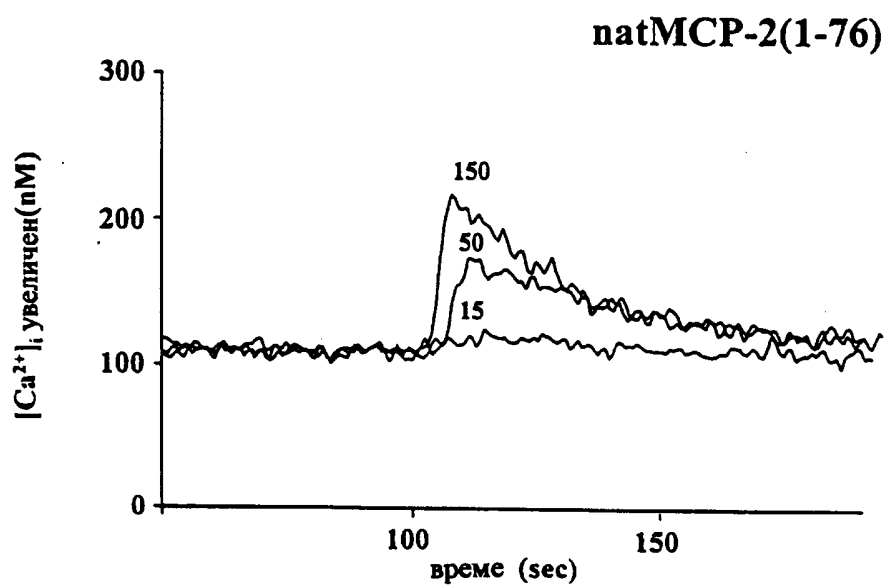
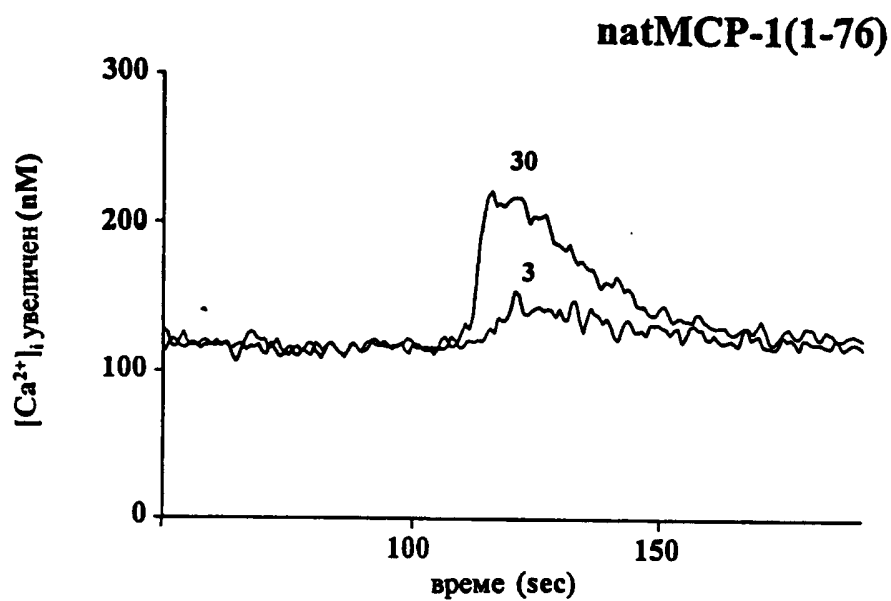
Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: А.Кацарова

Редактор: В.Алтаванова

Пор. № 42992

Тираж: 40 MB