

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-1146**
(22) Přihlášeno: **28.09.1998**
(30) Právo přednosti: **29.09.1997 EP 1997/97116863**
19.12.1997 EP 1997/97122471
10.03.1998 EP 1998/98104216
(40) Zveřejněno: **13.09.2000**
(Věstník č. 9/2000)
(47) Uděleno: **27.06.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **06.08.2008**
(Věstník č. 32/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/EP1998/006142**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/016876**

(11) Číslo dokumentu:

299 478

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 9725427.

Gong a Lewis (1995) J. Exp. Med. 181, 631-640; Gong et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 10521-10527.

(73) Majitel patentu:

Laboratoires Serono SA, Vaud, CH

(72) Původce:

Proost Paul, Heverlee-Leuven, BE

Struyf Sofie, Rumst, BE

Van Damme Jo, Brussels, BE

(74) Zástupce:

KOREJZOVÁ & SPOL., v.o.s., JUDr. Petra Korejzová,
advokátka, Korunní 810/104 E, Praha 10, 10100

(54) Název vynálezu:

**Amino-terminálně zkrácený MCP-2, molekula
DNA, expresní vektor, hostitelská buňka a
farmaceutický prostředek**

(57) Anotace:

Řešení se týká amino-terminálně zkráceného MCP-2 (chemotaktický protein-2 monocytů), kterému chybí NH₂-terminální aminokyseliny odpovídající aminokyselinovým zbytkům 1-5 přirozeného MCP-2, který má antagonistickou aktivitu k chemokin. Řešení se dále týká cDNA, kódující tento zkrácený chemokin, vektoru, obsahujícího tuto DNA, hostitelské buňky s obsahem tohoto vektoru a farmaceutického prostředku s obsahem uvedeného proteinu.

CZ 299478 B6

Amino–terminálně zkrácený MCP–2, molekula DNA, expresní vektor, hostitelská buňka a farmaceutický prostředek

5 Oblast techniky

Vynález se týká amino–terminálně zkráceného MCP–2 (chemotaktický protein–2 monocytů), kterému chybí NH₂–terminální aminokyseliny odpovídající aminokyselinovým zbytkům 1–5 přirozeného MCP–2, který má antagonistickou aktivitu k chemokinu. Vynález se dále týká
10 cDNA, kódující tento zkrácený chemokin, vektoru, obsahujícího tuto DNA, hostitelské buňky s obsahem tohoto vektoru a farmaceutického prostředku s obsahem uvedeného proteinu.

15 Dosavadní stav techniky

Chemokiny tvoří rodinu malých prozánětlivých cytokinů s chemotaktickými a aktivačními vlastnostmi pro leukocyty. Podle pozice prvních cysteinů může být rodina chemokinů dělena na C–C, C–X–C a C–X₃–C chemokiny (Baggiolini M. et al., 1994; Baggiolini M. et al., 1997; a Taub, D. et al., 1996).

20 Mnoho C–X–C chemokinů, jako je interleukin 8 (IL–8), jsou chemotaktické faktory pro neutrofile, zatímco C–C chemokiny, jako je monocytový chemotaktický protein 3 (MCP–3), jsou aktivní na různé leukocyty, včetně monocytů, lymfocytů, eosinofilů, bazofilů, NK buněk a dendritických buněk.

25 NH₂–koncová doména chemokinů se účastní vazby na receptor a zpracování NR₂ konce může buď aktivovat chemokiny, nebo může zcela inaktivovat chemokiny.

30 Z C–X–C chemokinů destičkového bazického proteinu se stává neutrofilový chemotaktický peptid (NAP–2) pouze po odstranění 24 NH₂–koncových zbytků (Walz A. et al., 1989 a Van Damme J. et al., 1990).

Delece až 8 NH₂–koncových zbytků z IL–8 vede k vyšší chemotaktické aktivitě, ale další štěpení Glu–Leu–Arg motivu, který je umístěn před prvním Cys ve všech chemotaktických C–X–C chemokinech, způsobuje kompletní inaktivaci (Clark–Lewis I. et al., 1991).

Podobně, NH₂–koncová proteolýza (až 8 aminokyselin) jiného C–X–C chemokinů, granulocytového chemotaktického proteinu 2 (GCP–2), nemá žádný vliv na chemotaktickou aktivitu neutrofilů (Proost, P. et al., 1993a).

40 Syntetické C–C chemokiny MCP–1, MCP–3 a RANTES bez 8–9 NH₂–koncových aminokyselin jsou inaktivní pro monocyty a jsou použitelné jako antagonisté receptorů (Gong J. et al., 1996; a Gong J. et al., 1995).

45 Prodloužení RANTES o jeden methionin vede ke kompletní inaktivaci molekuly a Met–RANTES se chová jako antagonistá vzhledem ke skutečnému RANTES (Proudfoot A. E. et al., 1996).

50 Klon lidského MCP–2 (monocytárního chemoatraktantního proteinu–2) byl izolován diferenciálním skrínem knihovny s cDNA sondami získanými od stimulovaných versus klidových lymfocytů periferní krve (PBL) (byl nejprve označen „HC14“, Chang H. C. et al., 1989). Proteinová sekvence získaná z cDNA byla identická se sekvencí přečištěného přirozeného MCP–2; nicméně, byla také izolována domnělá alelická varianta, ve které Gln 46 nahrazuje Lys 46 (Van Coillie et al., 1997).

55

MCP-2 byl také syntetizován technikou syntézy na pevné fázi (Proost P. et al., 1995).

Podstata vynálezu

5

Podstatu vynálezu tvoří amino-terminálně zkrácený MCP-2 (chemotaktický protein-2 monocy-tů), kterému chybí NH₂-terminální aminokyseliny odpovídající aminokyselinovým zbytkům 1-5 přirozeného MCP-2, který má antagonistickou aktivitu k chemokinu.

10

Přesněji je předmětem předkládaného vynálezu MCP-2(6-76), což je MCP-2, kterému chybí 1-5 NH₂-terminální aminokyseliny, jak je uveden na obr. 1 a v SEQ ID NO: 3 nebo v SEQ ID NO: 4.

15

Takový amino-terminálně zkrácený MCP-2 podle předkládaného vynálezu může být v glykosylované nebo v neglykosylované formě.

Termín „antagonista chemokinů“ znamená „působící antagonisticky vzhledem k přirozenému kompletnímu chemokinů“.

20

Jiným předmětem předkládaného vynálezu je molekula DNA obsahující DNA sekvenci kódující amino-koncově zkrácený MCP-2 podle předkládaného vynálezu, včetně v podstatě stejných nukleotidových sekvencí.

25

Termín „v podstatě stejná nukleotidová sekvence“ zahrnuje všechny další nukleotidové sekvence, které – z důvodů degenerace genetického kódu – také kódují danou aminokyselinovou sekvenci.

30

Vynález také obsahuje expresní vektory obsahující výše uvedené DNA, hostitelské buňky transformované takovými vektory a způsob přípravy takových amino-terminálně zkrácených MCP-2 podle předkládaného vynálezu pomocí kultivace uvedených transformovaných buněk ve vhodném kultivačním médiu.

35

DNA sekvence kódující proteiny podle předkládaného vynálezu může být insertována a ligována do vhodného plazmidu. Po přípravě je expresní vektor vložen do vhodné hostitelské buňky, která potom exprimuje vektor za zisku požadovaného proteinu.

40

Expres jakéhokoliv rekombinantního proteinu podle předkládaného vynálezu, jak je zde popsána, může být provedena v eukaryotických buňkách (například v kvasinkách, hmyzích nebo v savčích buňkách), nebo v prokaryotických buňkách, za použití vhodných expresních vektorů. Může být použita jakákoliv v oboru známá technika.

45

Například, DNA molekuly kódující proteiny získané jakýmkoliv výše uvedeným způsobem jsou insertovány do vhodně konstruovaných expresních vektorů technikami známými v oboru (viz Sambrook et al., 1989). Dvouřetězcová cDNA je navázána na plazmidové vektory homopolymerním napojením nebo restriční vazbou vyžadující použití syntetických DNA linkerů nebo technik ligace lepivých konců: DNA ligázy jsou použity pro ligaci DNA molekul a nežádoucí vazbě je zabráněno reakcí s alkalickou fosfatázou.

50

Pro umožnění exprese požadovaného proteinu by měl expresní vektor také obsahovat specifické nukleotidové sekvence obsahující transkripční a translační regulační sekvence navázané na DNA kódující požadovaný protein takovým způsobem, aby umožňovaly expresi genu a produkci proteinu. Za prvé, před genem, který má být transkribován, musí být umístěn promotor rozpoznávaný RNA polymerázou, na který se tato polymeráza naváže a tak iniciuje proces transkripce. Používá se mnoho takových promotorů, které pracují s různou účinností (silné a slabé promotory).

Pro eukaryotické hostitele mohou být použity různé transkripční a translační regulační sekvence, které jsou vybrané podle vlastností hostitele. Mohou být získány z virových zdrojů, jako jsou adenoviry, hovězí papiloma-viry, Simian virus a podobně, kde tyto regulační signály jsou asociovány s určitým genem, který má vysokou úroveň exprese. Příklady jsou TK promotor Herpes viru, SV40 časný promotor, kvasinkový gal4 promotor, atd. Transkripční iniciační regulační signály mohou být vybrány tak, že umožňují represi a aktivaci a tím modulování exprese genů.

DNA molekula obsahující nukleotidovou sekvenci pro protein podle předkládaného vynálezu je insertována do vektoru obsahujícího operativně navázané transkripční a translační regulační signály, který může integrovat vybranou genovou sekvenci do hostitelské buňky.

Buňky, které byly stabilně transformované vloženou DNA, mohou být selektovány tak, že je do nich zároveň vložen jeden nebo více markerů umožňujících selekci hostitelské buňky obsahující expresní vektor. Marker může také udělovat fototrofii auxotrofnímu hostiteli, může způsobovat bioresistenci na biocidy, například na antibiotika nebo těžké kovy jako je měď, a podobně. Vybraný markerový gen může být navázán přímo na exprimovanou DNA sekvenci, nebo může být vložen do stejné buňky současnou transfekcí. Pro optimální syntézu proteinů podle předkládaného vynálezu mohou být také nutné další elementy.

Mezi významné faktory při výběru určitého plazmidu nebo virového vektoru patří: schopnost rozpoznání a selekce hostitelských buněk obsahujících vektor od hostitelských buněk neobsahujících vektor; počet kopií vektoru, které jsou nutné v určitém hostiteli; a to, zda je požadováno, aby se jednalo o kyvadlový vektor pro hostitelské buňky různých druhů.

Po přípravě vektoru nebo DNA sekvence obsahující konstrukt pro expresi, může být DNA konstrukt vložen do vhodné hostitelské buňky jakoukoliv vhodnou technikou: transformací, transfekcí, konjugací, protoplastovou fúzí, elektroporací, srážením fosforečnanem vápenatým, přímou mikroinjekcí, atd.

Hostitelské buňky mohou být prokaryotické nebo eukaryotické. Výhodné jsou eukaryotické buňky, například savčí buňky, jako jsou lidské, myší buňky a ovariální buňky čínské křečka (CHO), protože umožňují post-translační modifikace proteinových molekul, včetně správného skládání a nebo glykosylace ve správných pozicích. Také kvasinky mohou provádět post-translační modifikace peptidu včetně glykosylace. Existuje mnoho rekombinantních DNA strategií, které využívají sekvence silných promotorů a vysokého počtu kopií plazmidu, které mohou být použity pro produkci požadovaných proteinů ve kvasinkách. Kvasinka rozpoznává vedoucí sekvenci na klonovaném savčím genovém produktu a secernuje peptidy obsahující vedoucí sekvenci (tj. prepeptidy).

Po vložení vektoru jsou hostitelské buňky kultivovány v selektivním médiu, ve kterém selektivně rostou buňky obsahující vektor. Exprese sekvence klonovaného genu vede k produkci požadovaných proteinů.

Amino-koncově zkrácený MCP-2 podle předkládaného vynálezu může být připraven jakýmkoliv jiným postupem známým v oboru, konkrétně dobře známými postupy chemické syntézy, využívajícími automatických syntezátorů na pevné fázi, po které následuje chromatografické přečištění.

Chemokiny podle předkládaného vynálezu mohou být, například, syntetizovány Fmoc (9-fluorenylmethoxykarbonyl), tBoc (t-butoxykarbonyl) nebo jinou podobnou chemickou syntézou s nebo bez vhodných chránících skupin pro vedlejší řetězce na různých aminokyselinách. Aminokyseliny s nebo bez vhodných chránících skupin pro vedlejší řetězce jsou preaktivovány – například HBTU/HOBt (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluromiumhexafluorofosfat/1-hydroxybenzotriazole) – a jsou navázány na rostoucí peptidový řetězec. Před adicí dalšího zbytku je z-amino skupiny odstraněna chránicí skupina (například Fmoc). Po syntéze jsou

všechny chránící skupiny odstraněny a intaktní kompletní peptidy jsou přečištěny a chemicky nebo enzymaticky skládány (včetně tvorby disulfidových můstků mezi cysteiny) na příslušné chemokiny podle předkládaného vynálezu.

5 Přečištění přirozených, syntetických nebo rekombinantních proteinů je provedeno jakoukoliv v oboru známou metodou, tj. konvenčními postupy obsahujícími extrakci, srážení, chromatografii, elektroforesu a podobně (viz například Proost P. et al., 1996). Dalším přečištěním, které může být použito pro přečištění proteinů podle předkládaného vynálezu, je afinitní chromatografie využívající monoklonálních protilátek nebo afinity pro heparin, které se váží na cílový protein a které jsou připraveny a imobilizovány na gelové matici obsažené v koloně. Surové přípravky obsahující proteiny jsou vneseny do kolony. Protein se naváže na kolonu prostřednictvím specifické protilátky, zatímco nečistoty procházejí kolonou. Po promytí se protein eluuje z gelu změnou pH nebo iontové síly.

15 Amino–terminálně zkrácený MCP–2 podle předkládaného vynálezu je užitečný pro terapii a/nebo diagnostiku onemocnění, při který je požadována antagonizace aktivity chemokinu. Příklady takových onemocnění jsou: zánětlivá onemocnění, onemocnění související s angiogenezí a hematopoesou, nádorová onemocnění, infekční onemocnění, včetně HIV, autoimunitní onemocnění, atherosklerosa, onemocnění plic a onemocnění kůže.

20 Proto předkládaný vynález v dalším aspektu obsahuje použití proteinu podle předkládaného vynálezu při výrobě léku pro léčbu výše uvedených onemocnění.

25 Lék je výhodně připraven ve formě farmaceutického prostředku obsahujícího protein podle předkládaného vynálezu spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči a/nebo přísadami. Takové farmaceutické prostředky jsou ještě dalším aspektem předkládaného vynálezu.

30 Dalším aspektem předkládaného vynálezu je způsob léčby výše uvedených onemocnění obsahující podání farmakologicky aktivního množství amino–terminálně zkráceného MCP–2 podle předkládaného vynálezu jedinci, u kterého existuje riziko vzniku takového onemocnění nebo jedinci, u kterého již existuje takové onemocnění.

35 Předkládaný vynález bude nyní popsán v následujících příkladech, které nijak neomezuji rozsah předkládaného vynálezu. V příkladech jsou uvedeny odkazy na obrázky uvedené dále.

Přehled obrázků na výkresech

40 Obr. 1 ukazuje aminokyselinovou sekvenci MCP–2 a jeho známých variant. Signální sekvence jsou uvedeny kurzívou, zatímco C–zbytky jsou tučným písmem. Šipky ukazují první aminokyseliny amino–terminálně zkráceného MCP–2(6–76) podle předkládaného vynálezu.

Obr. 2. SDS–PAGE amino–terminálně zkráceného MCP–2(6–76):

45 dráha 1: přirozený MCP–2 (1–76), (100 ng/dráhu);
dráha 2: přirozený MCP–2 (1–76), (30 ng/dráhu);
dráha 3: přirozený MCP–2 (6–76), (30 ng/dráhu); a
dráha 4: syntetický MCP–2 (1–76), (60 ng/dráhu).

Gely byly vyvíjeny za redukčních podmínek a proteiny byly barveny stříbrem.

50 Obr. 3 ukazuje srovnání chemotaktické účinnosti modifikovaných forem MCP–2. Intaktní přirozený (nat) a syntetický (syn) MCP–2(1–76), NH₂–terminálně zkrácený přirozený MCP–2(6–76) a COOH–terminálně zkrácený MCP–2(1–74) byly testovány na chemo-

taktickou aktivitu pro THP-1 buňky. Výsledky představují průměrný CI SEM pro čtyři nebo více nezávislé pokusy.

- 5 Obr. 4 Přírozený MCP-2 je slabší agonista než MCP-1 v mobilizaci vápníku v monocytech. Intaktní MCP-2 (15, 50 a 150 ng/ml) zvyšuje v závislosti na dávce (Ca^{2+})_i v THP-1 buňkách. Jsou uvedeny výsledky jednoho reprezentativního pokusu ze dvou provedených.

10 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Amino-terminálně zkrácený MCP-2

15 Materiál a metody

Chemokin a imunotest

MCP-2 byl syntetizován a přečištěn způsobem popsaným dříve (Proost P. et al., 1995).

20

Specifické Ab proti lidskému MCP-2 byly získány od myši a byly afinitně přečištěny na Sepharosové koloně, na kterou byl navázán syntetický MCP-2, podle návodu výrobce (CNBr activated Sepharose 4B, Pharmacia, Uppsala, Sweden).

25

ELISA plotny byly potaženy afinitně přečištěnou protilátkou proti lidskému MCP-2 a biotinylovaná anti-MCP-2 protilátka byla použita jako zachycovací protilátka. Detekce byla provedena peroxidasou značeným streptavidinem a TMB. Detekční limit pro MCP-2 ELISA byl přibližně 0,1 ng/ml.

30

Produkce a přečištění MCP-2

Monocytární chemotaktické proteiny byly přečištěny z kondicionovaného média získaného z mononukleárních buněk periferní krve ze 132 krevních odběrů získaných od Blood Transfusion Centers of Antwerp and Leuven (Proost, P. et al., 1996).

35

Erytrocyty a granulocyty byly odstraněny sedimentací v hydroxyethylovém škrobu (Fresenius AG, Bad Homburg, Germany) a gradientní centrifugací v roztoku metrizoatu sodného (Lymphoprep; Nyegaard, Oslo, Norway).

40

Mononukleární buňky (60×10^9 buněk) byly inkubovány (5×10^6 buněk/ml) s 10 g/ml ConA a 2 g/ml LPS. Po 48 až 120 hodinách bylo kondicionované médium odebráno a bylo do přečištění uchováváno při -20°C .

45

Přírozený MCP-2 byl přečištěn čtyřstupňovým přečišťovacím postupem, jak byl popsán dříve (Proost, P. et al., 1996).

Stručně, kondicionované médium bylo koncentrováno na skle s kontrolovanou velikostí pórů nebo na kyselině křemičité a bylo částečně přečištěno afinitní chromatografií na heparin-Sepharosové koloně (Pharmacia).

50

Frakce obsahující MCP-2 imunoreaktivitu byly dále přečištěny za použití Mono S (Pharmacia) kationtové iontoměničové chromatografie a byly eluovány v NaCl gradientu při pH 4,0.

Přirozený MCP-2 byl přečištěn do homogenity pomocí RP-HPLC na C-8 Aquapore RP-300 koloně (Perkin Elmer, Norwalk, CT) uvedené do rovnováhy 0,1% kyselinou trifluoroctovou (TF)). Proteiny byly eluovány v acetonitrilovém gradientu.

5 Biochemická charakterizace MCP forem pomocí SDS-PAGE, analýzy aminokyselinové sekvence a hmotnostní spektrometrie.

Čistota frakcí získaných z kolony byla testována SDS-PAGE za redukčních podmínek na Tris/glycinových gelech (Proost, P. et al., 1996). Proteiny byly barveny stříbrem a byly použity následující markery (Mr) relativní molekulové hmotnosti: OVA (Mr 45000), karboanhydráza (Mr 31000), sojový trypsinový inhibitor (Mr 21500), -laktoglobulin (Mr 18400), lysozym (Mr 14400) a aprotinin (Mr 6500).

15 NH₂-terminální sekvence přečištěných chemokinů byla stanovena Edmanovou degradací na pulzním kapalinovém 477A/120A proteinovém sekvenátoru (Perkin Elmer) s N-methylpiperidinem jako kopulační bazí. Blokované proteiny byly štěpeny mezi Asp a Pro v 75% kyselině mravenčí po dobu 50 hodin. Materiál trávený kyselinou mravenčí byl sekvenován bez dalšího přečištění.

20 Mr MCP-2 byla stanovena ionizací laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu (MALDI/TOF-MS) (Micromass ToFSpec, Manchester, UK). Kyselina -kyan-4-hydroxykyskořičová a cytochrom C byly použity jako matrice a vnitřní standard, v příslušném pořadí.

25 Detekce chemotaktické aktivity

MCP-2 byl testován na svou chemotaktickou účinnost na čerstvě přečištěných monocytech (2 x 10⁶ buněk/ml) nebo monocytárních THP-1 buňkách (0,5 x 10⁶ buněk/ml; 2 dny po subkultivaci) v Boydenově mikromůrce za použití polyvinylpyrrolidonem zpracovaných polykarbonátových membrán s velikostí porů 5 μm.

30 Vzorok a buňky byly ředěny v HBSS (Life Technologies/Gibco BRL, Paisley, Scotland) doplněným 1 mg/ml lidským sérovým albuminem (Red Cross Belgium). Po 2 hodinové inkubaci při 37 °C byly buňky fixovány a barveny Diff-Quick barvicími roztoky (Harleco, Gibbstown, NJ) a buňky, které migrovaly skrz membrány byly počítány mikroskopicky v 10 olejových imersních polích při 500-násobném zvětšení.

35 Chemotaktický index (C.I.) vzorku (trojí provedení pro každou komůrku) byl vypočítán jako počet buněk migrujících do testovaného vzorku dělený počtem buněk migrujících do kontrolního média.

40 V pokusech desensitizace byly buňky inkubovány s biologicky inaktivními variantami chemokinů po dobu 10 minut při 37 °C před tím, než byly vloženy do komůrky. Procento inhibice C.I. bylo vypočítáno za použití C.I. pro HBSS-zpracované kontrolní buňky vzhledem k vzorku jako referenční hodnotě.

45 Detekce intracelulárních koncentrací Ca²⁺

50 Intracelulární koncentrace Ca²⁺ ((Ca²⁺)_i) byla měřena způsobem popsaným dříve (Wuyts A: et al., 1997). přečištěné THP-1 buňky (10⁷ buněk/ml) byly inkubovány v Eaglově minimálním esenciálním médiu (EMEM, Gibco) + 0,5% FCS s fluorescentním indikátorem fura-2 (2,5 M fura-2/AM, Molecular Probes Europe BV, Leiden, the Netherlands) a 0,01% Pluronic F-127 (sigma, St. Louis, MO).

55 Po 30 minutách při 37 °C byly buňky dvakrát promyty, byly resuspendovány v koncentraci 10⁶ buněk/ml v HBSS s 1 mM Ca²⁺ a 0,1% FCS (pufrovaným s 10 mM Hepes/NaOOH při

pH 7,4). – Před tím, než byla změřena fura-2 fluorescence LS50B luminiscentního spektrofotometru (Perkin Elmer) byly buňky uvedeny do rovnováhy při 37 °C po dobu 10 minut.

Po excitaci při 340 a 380 nm byla fluorescence detekována při 510 nm. $(Ca^{2+})_i$ byl stanoven z gryniewiczovi rovnice (Gryniewicz G. et al., 1985). Pro stanovení R_{max} byly buňky lyzovány za použití 50 M digitoninu. Potom bylo za použití 20 mM Tris upraveno pH na 8,5 a hodnota R_{min} byla získána po adici 10 mM EGTA k lyzovaným buňkám. Použitá hodnota k byla 224 nM.

Pro desenzitizační pokusy byly monocyty nebo THP-1 buňky nejprve stimulovány pufrem, chemokinem nebo antagonistou chemokinů v různých koncentracích. Jako druhý stimul byl použit MCP-2 v koncentraci indukující významné zvýšení $(Ca^{2+})_i$, po prestimulaci pufrem. Druhý stimul byl přidán 2 minuty po adici prvního stimulu. Procento inhibice zvýšení $(Ca^{2+})_i$ v reakci na druhý stimul bylo vypočítáno srovnáním signálu po prestimulaci chemokinem nebo antagonistou chemokinů se signálem po přidání pufru.

Výsledky

Izolace post-translačně zpracovaných forem MCP-2

Specifická a sensitivní ELISA byla použita pro získání různých forem MCP-2 produkovaných mitogenem a endotoxinem.

Kondicionované medium bylo přečištěno standardními technikami izolace (Proost, P. et al., 1996), včetně adsorpce na sklo s danou velikostí pórů a chromatografie na heparin-Sepharose.

Potom bylo provedeno přečištění FPLC mono s kationtovou iontoměničovou chromatografií a potom přečištění za použití C-8 RP HPLC. Molekulové hmotnosti byly měřeny SDS-PAGE a MALDI/TOF-MS.

Byly izolovány různé formy MCP-2: kromě autentického 7,5 kDa MCP-2(1-76) byl do homogenity přečištěn za použití RP-HPLC NH_2 -terminálně zkrácený 7 kDa MCP-2, který postrádá 5 zbytků (MCP-2(6-76)) a byla provedena analýza jeho aminokyselinové sekvence (obr. 2). Za použití MALDI/TOF-MS (tabulka 1) byla stanovena molekulová hmotnost 8881 Da pro intaktní MCP-2 (teoretická M_r 8893 Da), zatímco pro MCP-2(6-76) byla stanovena molekulová hmotnost 8365 Da, což potvrzuje delecí pěti NH_2 -terminálních aminokyselin (teoretická M_r 8384 Da). Funkční srovnání těchto přirozených forem MCP-2 v testu chemotaxe THP-1 buněk ukázalo, že MCP-2 je aktivní ještě při 5 ng/ml, zatímco zkrácený MCP-2(6-76) nemá chemotaktickou aktivitu při testování v koncentracích od 0,6 do 60 ng/ml (obr. 3). Byla také srovnávána účinnost intaktního přirozeného MCP-2 s účinností syntetického MCP-2(1-76) a COOH-terminálně zkrácenou syntetickou formou (Proost P. et al., 1995) bez dvou zbytků (MCP-2(1-74)).

Bylo zjištěno, že minimální účinné chemotaktické koncentrace těchto forem jsou také 5 ng/ml (obr. 3). Ačkoliv je v testech chemotaxe specifická aktivita přirozeného intaktního MCP-1 a MCP-2 srovnatelná (Van Damme J. et al., 1992), je mobilizační kapacita MCP-2 stále ještě předmětem debaty.

Nicméně, v pokusech mobilizace Ca_{2+} byly minimální účinné koncentrace jak pro přirozený, tak pro syntetický MCP-2(1-76) 10-krát vyšší než minimální účinné koncentrace pro přirozený intaktní MCP-1(1-76) (obr. 4), zatímco MCP-2(6-76) byl inaktivní.

Nicméně, intaktní MCP-2 (50 ng/ml) byl schopen způsobit desenzitizaci pro MCP-2 (15 ng/ml) a MCP-3 (10 ng/ml) za zisku 52% a 45% inhibice chemotaxe, v příslušném pořadí.

Z důvodů nízké specifické aktivity MCP-2 v testech mobilizace Ca^{2+} byla inhibice chemotaxe MCP-2(6-76) provedena v Boydenově mikrokomůrce. Protože je popsáno, že MCP-2 zkříže-

ně inhibuje aktivní MCP-1, MCP-2 a MCP-3 v testu chemotaxe monocytů (Sozzani S. et al., 1994), provedli jsme testování toho, zda přirozený inaktivní MCP-2(6-76) může také inhibovat chemotaxi zprostředkovanou MCP-1, MCP-2, MCP-3 a RANTES (Tabulka 2). Pre-inkubace THP-1 se 100 ng/ml inaktivního MCP-2(6-76) může významně inhibovat chemotaxi indukovanou 10 ng/ml MCP-1 (63%), 5 ng/ml MCP-2 (75%), 30 ng/ml MCP-3 (62%) a 100 ng/ml RANTES (75%). Kromě toho, chemotaxe způsobená 3-násobně nižšími koncentracemi příslušných MCP byla zcela (91 až 100%) inhibována 100 ng/ml MCP-2(6-76). Dále, i koncentrace 10 ng/ml MCP-2(6-76) byla schopna významně inhibovat chemotaktickou aktivitu indukovanou MCP-1 (3 ng/ml), MCP-2(1,5 ng/ml) nebo MCP-3 (10 ng/ml) a RANTES (30 ng/ml). Závěrem, MCP-2(6-76) je produkován za přirozených podmínek, je inaktivní jako chemoatraktant a antagonizuje několik C-C chemokinů, zejména MCP-3.

Tabulka 1: Biochemická charakterizace přirozených forem MCP-2. Analýza NH₂-terminální aminokyselinové sekvence a srovnání zjištěných (SDS-PAGE a MALDI/TOF-MS) a teoretických Mr přirozených MCP-izoforem přečištěných C-8 RP-HPLC

MCP-forma	NH ₂ -terminální sekvence	Mr (Da)		
		teoretická neglykosylovaná	SDS-PAGE	MALDI/TOF-MS
MCP-2 (1-76)	blokovaná	8893	7500	8881
MCP-2 (6-76)	SIPITCC	8384	7000	8365

Tabulka 2: MCP-2(6-76) inhibuje chemotaktickou odpověď monocytů na MCP-1, MCP-2, MCP-3 a RANTES v mikrokomůrce

Chemokin	Koncentrace	Antagonizace chemotaktické reakce ^{b, c}		% Inhibice chemotaxe
		Pufr	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
		pufr	10 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

- 5 a) MCP-1, MCP-2, MCP-3 nebo RANTES byly přidány jako chemoatraktanty do spodních jamek mikrokomůrky.
 b) horní jamky mikrokomůrky byly naplněny THP-1 buňkami preinkubovanými s MCP-2(6-76) nebo s pufrém.
 c) průměrný CI SEM pro 3 nezávislé pokusy.

10

Odkazy:

- Baggiolini M. et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 55, 97-179, 1994.
 Baggiolini M. et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 15, 675-705, 1997.
 15 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, 10 521–10 527, 1996.
 Gryniewicz G. et al., *J. Biol. Chem.*, 260, 3 440, 1985.
 Proost P. et al., *Biochemistry*, 32, 1 0170–1 0177, 1993a.
 5 Proost P. et al., *J. Immunol.*, 150, 1 000–1 010, 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, 2 599–2 603, 1996.
 Sambrook et al, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor
 10 Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 Schols D. et al., *J. Exp. Med.*, 186, 1 383–1 388, 1997.
 Sozzani S. et al., *J. Immunol.*, 152, 3 615, 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.
 15 Van Damme J. et al., *Eur. J. Biochem.*, 181, 337–344, 1989.
 Van Damme J. et al., *Eur. J. Immunol.*, 20, 2 113–8, 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, 2 716–2 723,1997.

20

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace:

25

(i) přihlašovatel:

- (A) Jméno: Applied Research Systems ARS Holding N.V.
 (B) Ulice: 14 Joohn B. Gorsiraweg
 (C) Město: Curacao
 30 (E) Stát: Nizozemské Antily
 (F) Poštovní kod (ZIP): Ne
 (G) Telefon: 599–9–639300
 (H) Telefax: 599–9–614129

35

(ii) Název vynálezu: Amino–terminálně zkrácený MCP–2 jako antagonist chemokinů

(iii) Počet sekvencí: 4

(iv) počítačová čtecí forma:

40

- (A) Typ média: Floppy disk
 (B) počítač: IBM PC kompatibilní
 (C) operační systém: PC–DOS/MS–DOS
 (D) Software: Patent In Release #1.00, verze #1.30 (EPO)

45

(2) Informace pro SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

50

- (A) Délka: 99 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec:
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

55

(iii) Hypotetická: Ne

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: protein

(B) Umístění: 1..76

5

(xi) Popis sekvence: 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
    
```

10

(2) Informace pro SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 99 aminokyselin

15

(B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec:

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

20

(iii) Hypotetická: Ne

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: protein

25

(B) Umístění: 1..76

(xi) Popis sekvence: 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) Informace pro SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 71 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec:
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: protein
- iii) Hypotetická: Ne
- 15 (xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

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) Informace pro SEQ ID NO: 4

- 20 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 71 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec:
 25 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(iii) Hypotetická: Ne

5

(xi) Popis sekvence: 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

```

10

PATENTOVÉ NÁROKY

15

1. Amino-terminálně zkrácený MCP-2, chemotaktický protein-2 monocytů, kterému chybí NH₂-terminální aminokyseliny odpovídající aminokyselinovým zbytkům 1-5 přirozeného MCP-2, který má antagonistickou aktivitu k chemokinu.
2. Amino-terminálně zkrácený MCP-2 podle nároku 1, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3 nebo SEQ ID NO: 4.
3. Amino-terminálně zkrácený MCP-2 podle nároku 1 nebo 2, v glykosylované formě.
4. DNA molekula obsahující DNA sekvenci kódující amino-terminálně zkrácený MCP-2 podle jakéhokoliv z předešlých nároků, včetně nukleotidových sekvencí, které v důsledku degenerace genetického kódu rovněž kódují uvedený protein.
5. Expresní vektor obsahující DNA molekulu podle nároku 4.
6. Hostitelská buňka obsahující expresní vektor podle nároku 5.
7. Rekombinantní způsob přípravy jakéhokoliv proteinu podle nároků 1 až 3, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že se kultivují buňky podle nároku 6 ve vhodném kultivačním médiu.
8. Protein podle jakéhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako lék.
9. Použití proteinu podle jakéhokoliv z nároků 1 až 3 pro výrobu prostředku pro terapii a/nebo diagnostiku onemocnění, při kterých je žádoucí antagonistování účinků chemokinu.

40

10. Použití podle nároku 9 pro výrobu prostředku pro léčbu zánětlivých onemocnění, HIV infekce, onemocnění souvisejících s angiogenezí a hematopoesou a nádorových onemocnění.

5 11. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje protein podle jakéhokoliv z nároků 1 až 3 spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči a/nebo přísadami.

10

4 výkresy

MCP-2

-23

1 ↓

MK~~V~~SAALLCL LLMAATFSPO GLAQPD~~S~~SVI PITCCFNVIN RKIPIQRLES YTRITNIOCP
KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWVRDSMKHL DQIFQNLKP

76

Varianta MCP-2

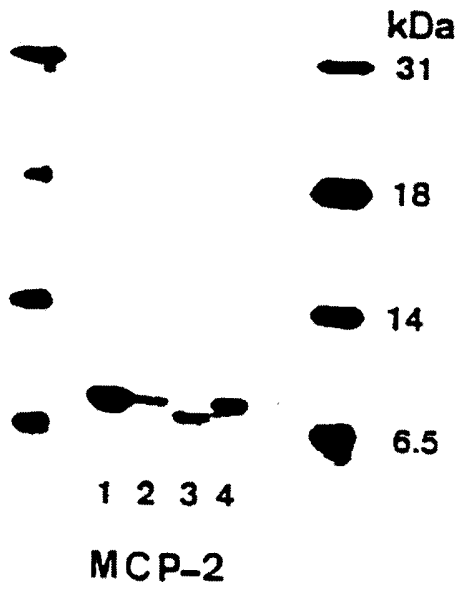
-23

1 ↓

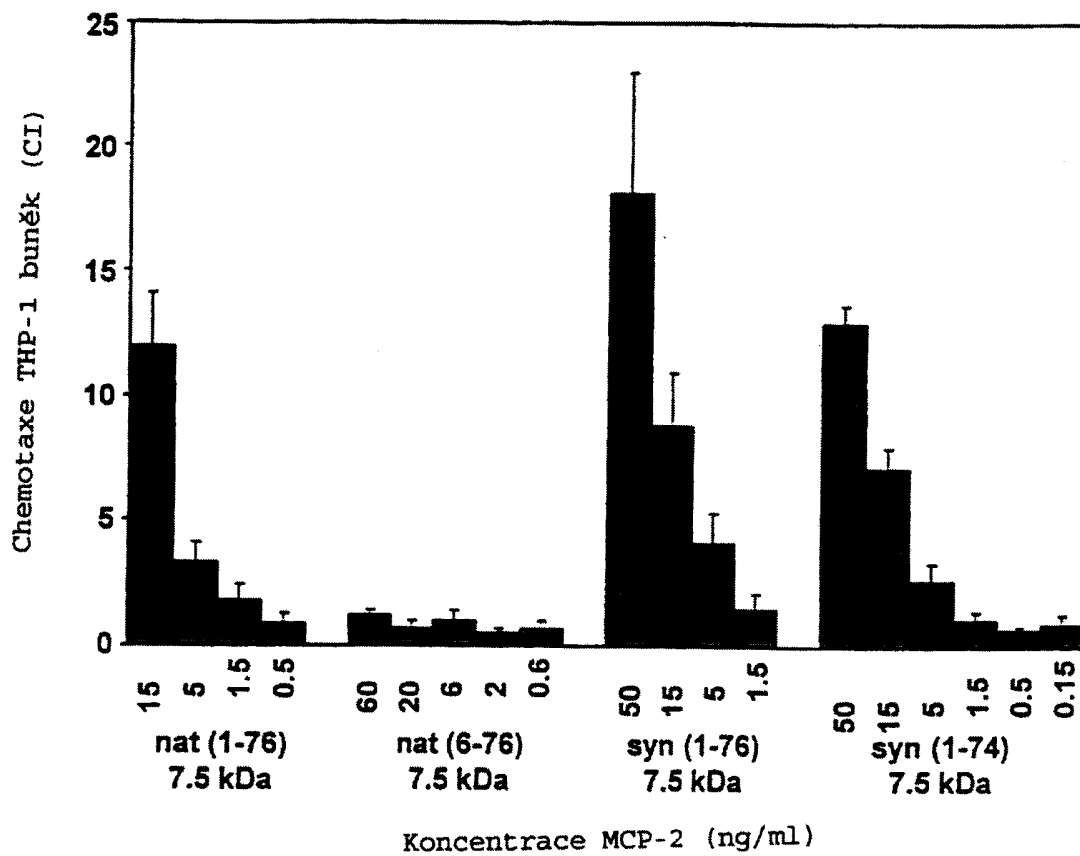
MK~~V~~SAALLCL LLMAATFSPO GLAQPD~~S~~SVI PITCCFNVIN RKIPIQRLES YTRITNIOCP
KEAVIFQTKR GKEVCADPKE RWVRDSMKHL DQIFQNLKP

76

OBR. 1

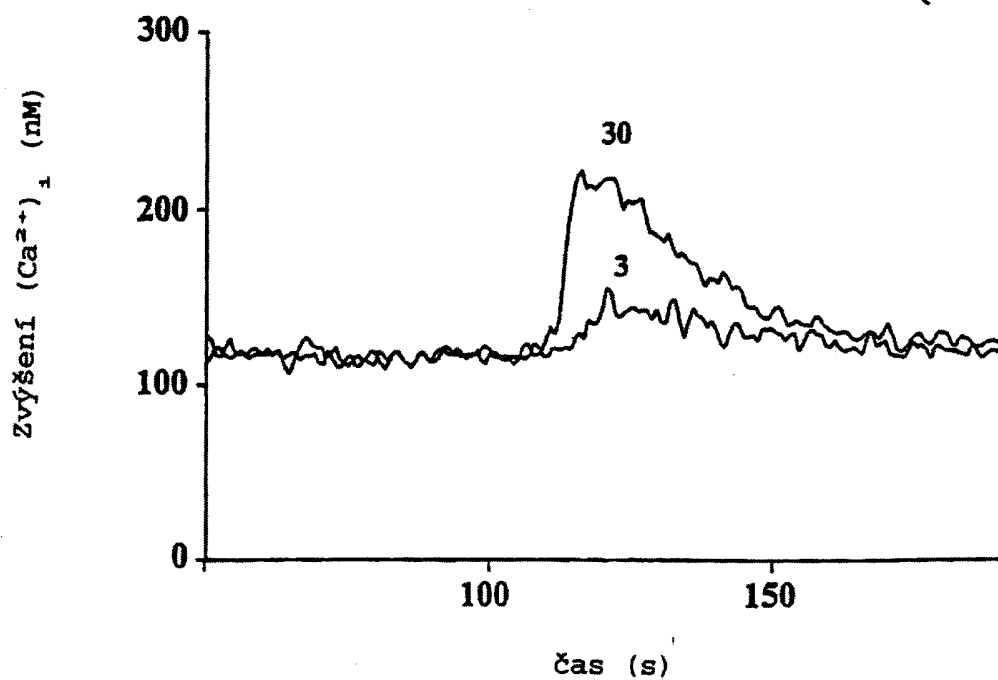


OBR. 2

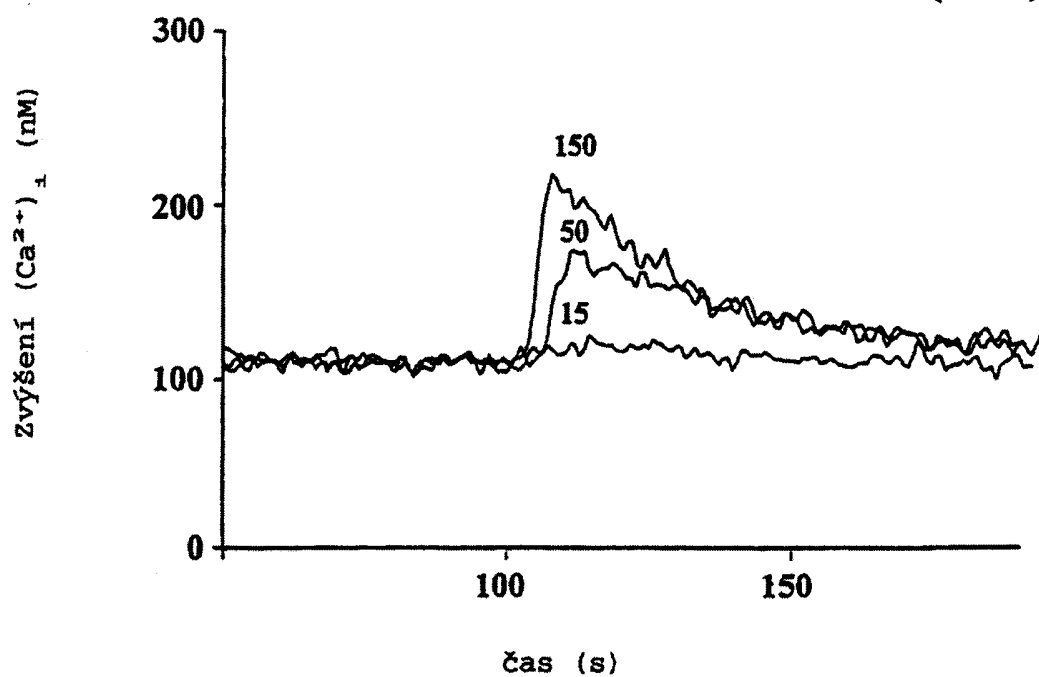


OBR. 3

natMCP-1(1-76)



natMCP-2(1-76)



OBR. 4

Konec dokumentu