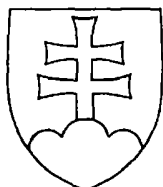


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **3. 10. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **00121665.4**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **4. 10. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **5. 8. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **8/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/EP01/11428**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO02/28419**

(11), (21) Číslo dokumentu:

406-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**A61K 38/19,
A61P 25/00,
C07K 14/52,
C12N 15/19**

(71) Prihlasovateľ: **Applied Research Systems Ars Holding N. V., Curaçao, AN;**

(72) Pôvodca: **Kosco-Vilbois Marie, Minzier, CH;
Proudfoot Amanda, Chens-sur-Léman, FR;
Wells Timothy, Preveessin Moens, FR;**

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Použitie CC chemokínového mutanta, farmaceutický prostriedok s obsahom chemokínového mutanta, skrátený a mutovaný humánný RANTES a spôsob jeho výroby**

(57) Anotácia:
Mutanty CC chemokínov, obsahujúce aspoň dve mutácie v kationovom mieste 40's slučky, ktoré majú v porovnaní so štandardným typom molekuly zníženú GAG-väzbovú aktivitu. Opísané mutované chemokíny sú účinné pri liečení sklerózy multiplex a/alebo iných demyelinačných ochorení. Trojitý RANTES mutant je zlúčeninou vykazujúcou najlepšie výsledky.

Použitie CC chemokínového mutantu, farmaceutický prostriedok s obsahom chemokínového mutantu, skrátenej a mutovaný humánny RANTES a spôsob jeho výroby

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka mutantov CC chemokínov, ktoré obsahujú aspoň dve mutácie v 40's slučke, a ktoré majú oproti štandardnému typu molekuly zníženú GAG-viažucu aktivitu. Zistilo sa, že takto mutované chemokíny sú účinné na liečenie sklerózy multiplex a/alebo iných demyelinačných ochorení.

Doterajší stav techniky

Chemokíny tvoria rodinu malých pro-zápalových cytokínov s leukocytovými chemotaktickými a aktivačnými vlastnosťami. V závislosti na polohe prvých konzervatívnych cysteínov sa chemokínová rodina môže rozdeliť na C-C, C-X-X a C-X₃-C chemokíny (Baggiolini M. a ďalší, Adv Immunol. 1994, 55: 97-179; Baggiolini M. a ďalší, Annu Rev Immunol. 1997, 15: 675-705; Taub D. a ďalší, Cytokine Growth Factor Rev. 1996, 7(4): 355-76).

Mnohé C-X-C chemokíny, ako napríklad interleukín-8 (IL-8), sú chemotaktické pre neutrofily, zatiaľ čo C-C chemokíny sú účinné voči rôznym leukocytom vrátane monocytov, lymfocytov, eozinofilov, bazofilov, NK buniek a dendritických buniek.

NH₂-terminálna doména chemokínov sa podieľa na receptorovom viazaní a NH₂-terminálna úprava môže buď aktivovať chemokíny, alebo ich môže úplne inaktivovať.

N-koncové varianty syntetických C-C chemokínov boli testované z hľadiska ich účinku ako inhibítorov a antagonistov prirodzene sa vyskytujúcich foriem. MCP-1, MCP-3 a RANTES, ktorým chýba 8 až 9 NH₂-koncových aminokyselín, sú neúčinné voči monocytom a sú užitočné ako receptorové antagonisy (Gong JH a ďalší, J Exp Med. 1995, 181(2): 631-40 a Gong JH a ďalší, J Biol Chem. 1996, 271(18):10521-7).

Predĺženie RANTES o jeden metionín vedie k takmer úplnej inaktivácii molekuly a Met-RANTES sa správa ako antagonista autentického RANTES (Proudfoot AE a ďalší, J Biol Chem. 1996 Feb 2, 271 (5): 2599-603).

WO 99/16877 sa týka RANTES skráteneých na amino-konci, ktorým chýbajú NH₂-koncové aminokyseliny zodpovedajúce aminokyselinovým zvyškom 1, 1-2, 1-3 alebo 1-4 prirodzene sa vyskytujúceho RANTES a majú chemokínovú antagonistickú aktivitu, ako aj ich cDNA kódujúcich sekvencií, ich použitia na liečenie a/alebo diagnostiku ochorení, pri ktorých je potrebná antagonistická aktivita chemokínového účinku. RANTES (3-68) je výhodným skráteneým chemokínovým antagonistom.

Aj keď bola chemoatraktívna aktivita RANTES a CC chemokínov vo všeobecnosti študovaná najmä v spojitosti so špecifickými bunkovými membránovými receptormi, RANTES môžu interagovať aj s glykozaminoglykánmi (GAGs), vysoko variabilnými rozvetvenými sacharidovými skupinami, ktoré sa k niekoľkým proteínom pridávajú post-translačne, a vo všeobecnosti sa nazývajú proteoglykány (PGs). Takéto proteíny sa nachádzajú na bunkovej membráne, v extracelulárnom matrixe a v krvnom kmeni, kde sa môžu nachádzať aj izolované GAGs.

Interakcie s GAGs je znakom, ktorý je spoločným pre mnohé bunkové signalizačné rozpustné molekuly (interleukíny, rastové faktory). PGs alebo izolované GAGs môžu tvoriť komplex s rozpustnými molekulami, pravdepodobne v rozsahu, v ktorom chránia túto molekulu pred proteolýzou v extracelulárnom prostredí. Bolo tiež navrhnuté, že GAGs môžu pomáhať opravovať prezentáciu bunkových signalizačných molekúl ich špecifickému receptoru, a eventuálne aj modulovať aktiváciu cieľových buniek.

V prípade chemokínov sa zdá, že koncentrácia do imobilizovaných gradientov v mieste zápalu a z toho vyplývajúca interakcia s bunkovými receptormi a ich aktivačný stav sú modulované rôznymi formami GAGs (Hoogewerf AJ a ďalší, Biochemistry 1997, 36(44): 13570-8). Preto bolo navrhnuté, že modulácia takýchto interakcií môže predstavovať terapeutický prístup pri zápalovom ochorení (Schwarz MK a Wells TN, Curr Opin Chem Biol. 1999, 96(25): 14499-504).

Štrukturálne požiadavky a funkčné účinky GAG-RANTES interakcie boli študované na rôznych modeloch. RANTES viaže GAGs na endoteliálnych bunkách humánnej pupočníkovej žily (HUVECs) v mikromolárnych koncentráciách s afinitou a špecificitou, ktoré sú vyššie ako pri iných chemokínoch, ako MCP-1, IL-8 alebo MIP-1alfa. Takéto interakcie sa javia ako nie jednoducho elektrostatické, ale ako závisiace na iných parametroch, ako je dĺžka a N- a O-sulfácia GAGs (Kuschert GS a ďalší, *Biochemistry* 1999, 38(39): 12959-68). GAG-defektné bunkové línie ešte môžu viazať chemokíny, ale prítomnosť bunkových povrchových GAGs značne zvyšuje ich účinok na receptory, keď sú v nízkych koncentráciách (Ali S. a ďalší, *J. Biol Chem* 2000, 275(16): 11721-7). Iné experimenty ukázali, že GAGs, najmä heparín sulfát, uľahčujú interakciu RANTES s bunkovým povrchom makrofágov a z toho vyplývajúcu inhibíciu HIV infekcie, čo je výsledok, ktoré je v súlade s dobre známou odolnosťou týchto buniek, ktoré slabo exprimujú heparín sulfát, voči protívírusovým účinkom RANTES (Oravecz T, a ďalší, *J Immunol.* 1997, 159(9): 4587-92).

Rozpustné GAGs konkurujú bunkovým membránovým GAGs a môžu slúžiť ako špecifické inhibítory RANTES-indukovanej aktivácie povrchu (Appay V a ďalší, *Int Immunol* 2000, 12(8): 1173-82) alebo ako supresor HIV infekcie (Burns JM a ďalší, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(25): 14499-504).

Niektoré štúdie štruktúry a funkcie sa pokúšali identifikovať RANTES doménu zodpovednú za interakcie s GAGs, keďže tradičná konsenzus sekvencia (BBXB, kde B je zásaditý zvyšok a X môže byť akýkoľvek zvyšok) je príliš všeobecná. Uskutočnila sa epitop mapovacia štúdia použitím monoklonálnej protilátky vyvolanej proti rekombinantnému humánnemu RANTES, ktorá bola schopná blokovať tak antivírusové účinky, ako aj mobilizáciu vnútrobunkového vápnika, sprostredkované s RANTES (Burns JM a ďalší, *J. Exp. Med.* 1998, 188(10):1917-27). Tento prístup umožnil definovať zvyšky 55-66 ako nevyhnutné tak pre takéto aktivity, ako aj pre GAG interakciu, argumentujúc tým, že GAGs interakcia môže mať komplementárnu alebo rozličnú funkciu vo vzťahu k funkcii sprostredkovanej kanonickými receptormi, ako sa navrhlo aj v štúdii RANTES variantov so zmenenými agregáčnymi vlastnosťami (Appay V a ďalší, *J Biol Chem* 1999, 274(39): 27505-12).

Oblasť 55-66, ktorá znamená C-koncový alfa-závitnicový segment, je homologická s GAG-viažucou doménou iných chemokínov, ako IL-8 (Witt DP a Lander AD, Curr. Biol. 1994, 4(5): 394-400), a obsahuje kationové miesto obsahujúce lyzín a arginín (KKWVR). Takáto väzobná oblasť sa líši od väzobného miesta pre bunkové receptory, ktoré je lokalizované na N-konci (Pakianathan DR a ďalší, Biochemistry 1997, 36(32): 9642-8), a obsahuje niektoré zvyšky podieľajúce sa na agregácii RANTES monomérov, hoci sa zdá, že takéto disagregačné mutácie neovplyvňujú interakciu s GAGs (Czaplewski LG a ďalší, J. Biol. Chem. 1999, 274(23): 16077-84; WO 98/13495).

RANTES obsahuje iné kationové miesto (RKNR) zodpovedajúce zvyškom 44-47, ktoré je konzervatívne v GAG viažucej doméne iných chemokínov, ako MIP-1 α (Koopmann W a Krangel MS, J. Biol. Chem. 1997, 272(15): 10103-9) a MIP-1 β (Koopmann W a ďalší, J Immunol. 1999, 163(4): 2120-7).

Ľudské RANTES varianty obsahujúce jednotlivé mutácie v týchto kationových miestach boli opísané ako RANTES antagonisty majúce potenciálne terapeutické aplikácie pri liečení HIV infekcie a zápalových alebo alergických ochorení (WO 99/33989).

Bolo opísané, že len trojitý mutant RANTES, v ktorom boli tri zvyšky v polohách 44, 45 a 47 substituované alanínom, stratil GAG-väzobnú schopnosť (A, Proudfoot a ďalší, Chemokine Gordon Conference, Session I, 24. júl 2000, osobný rozhovor).

Podstata vynálezu

Teraz sa zistilo, že CC chemokíny obsahujúce aspoň dve mutácie v kationovom mieste takzvanej "40' slučky" sú účinné na liečenie sklerózy multiplex a/alebo iných demyelinačných ochorení. Toto miesto predstavuje konzervovaný GAG-viažuci motív v CC chemokínoch (ako RANTES, MIP-1 α a MIP-1 β , MIP-3, MIP-4, HCC1, I309, MCP-2). Všetky tieto chemokínové mutanty majú zníženú GAG-viažucu aktivitu, keď sa porovnávajú so zodpovedajúcimi štandardnými molekulami.

Podstatou vynálezu je teda použitie CC chemokínového mutantu, ktorý obsahuje aspoň dve mutácie v kationovom mieste 40's slučky, ako je znázornené na obrázku 1, a ktorý má v porovnaní so štandardným typom molekuly zníženú GAG-viažucu aktivitu, na prípravu farmaceutického prostriedku na liečenie sklerózy multiplex a/alebo iných demyelinačných ochorení, pričom CC chemokín je vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3, MIP-4, HCC1, I309, I35612 a MCP-2.

Na obrázku 1 je pre určitý počet CC chemokínov znázornená oblasť, v ktorej by mali byť prítomné podľa vynálezu aspoň dve mutácie, takzvaná 40's slučka. Zistilo sa, že najmä trojitý RANTES mutant, ktorý má tri zásadité zvyšky v polohách 44, 45 a 47 substituované alanínom, je výnimočne účinný na živočíšnom modeli na liečenie sklerózy multiplex. Tento trojitý mutant RANTES vykazuje na dávke závislý účinok na myšacom EAE modeli a porovnateľnú účinnosť s liečením s rekombinantným IFN- β . Analogické výsledky sa získali so skráteným RANTES trojitým mutantom, v ktorom boli tri zvyšky v polohách 44, 45 a 47 substituované alanínom, a ktorému chýbajú prvé dve N-koncové aminokyseliny. Tento skrátený RANTES mutant (majúci aminokyselinovú sekv. č. 3) je nový a predstavuje ďalší predmet predloženého vynálezu.

Podobný experimentálny dôkaz bol generovaný aj v spojitosti s trojitými mutantami MIP-1 α a MIP-1 β , ktoré sú už známe a ktoré sa tu označujú ako MIP-1 α trojitý mutant R18A-R46A-R48A (Koopmann W a Krangel MS., J Biol Chem. 1997, 272(15): 10103-9) a MIP-1 β trojitý 40's mutant K45A-R46A-K48A (Laurence JS, Biochemistry 2001, 40: 4990-4999).

Výraz "znížená GAG-väzobná aktivita" znamená, že mutanty podľa vynálezu majú nižšiu schopnosť viazať sa na GAGs, tzn., že sa na GAGs (ako napríklad heparín sulfát) viaže nižšie percento každého z týchto mutantov oproti zodpovedajúcej štandardnej molekule.

Výhodnejšie sú mutanty humánneho RANTES, v ktorom sú tri zásadité aminokyseliny v polohách 44, 45 a 47 štandardnej molekuly substituované inými aminokyselinami. Takéto zvyšky môžu byť substituované s malými, alifatickými, nepolárnymi alebo mierne polárnymi zvyškami, ako napríklad Ala, Ser, Thr, Pro a Gly. Alanín je najvýhodnejší.

RANTES mutanty, o ktorých sa zistilo, že sú výnimočne účinné pri liečení MS, sú mutanty majúce aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 2, respektíve sekv. č. 3.

Iným predmetom vynálezu je použitie chemokínových mutantov, ako sú definované vyššie, na výrobu farmaceutického prostriedku na liečenie sklerózy multiplex a/alebo iných demyelinačných ochorení.

Skleróza multiplex (MS) je pomaly postupujúcim ochorením CNS, ktoré je charakteristické roztrúsenými oblasťami demyelinácie v mozgu a v mieche, čo vedie k multiplicitným a rôznym neurologickým symptómom a prejavom, zvyčajne s remisiami a zväčšením bolesti (pozri The Merck Manual, šestnástе vydanie).

Príčina je neznáma, ale je podozrenie, že ide o imunologickú abnormalitu s niekoľkými kľúčovými príčinami, ktoré v súčasnosti indikujú špecifický mechanizmus. Postulované príčiny zahŕňajú infekciu pomalým alebo latentným vírusom a myelinolýzu prostredníctvom enzýmov. IgG je zvyčajne zvýšené v CSF a zvýšené titre boli asociované s rôznymi vírusmi, vrátane osýpok. Význam týchto zistení a publikované asociácie s HLA alotypmi a zmeneným počtom T buniek je nejasný, keďže dôkazy sú do určitej miery konfliktné. Zvýšený rodinný výskyt naznačuje genetickú náchylnosť; ženy sú o niečo častejšie postihnuté ako muži. Zdá sa, že sú zahrnuté faktory prostredia. Hoci vo všeobecnosti nastupuje vo veku 20 až 40 rokov, vyskytla sa aj geografická oblasť, kde sú pacienti s MS v rámci prvých 15 rokov. Presťahovanie po 15 roku života nemení riziko.

Plaky a ostrovy demyelinácie s deštrukciou oligodendroglia a perivaskulárnym zápalom sú roztrúsené v CNS, primárne v bielej hmote s preferenčne v laterálnych a posteriorných stĺpcoch (najmä v cervikálnej a dorzálnnej oblasti), očné nervy a periventrikulárne oblasti. Postihnuté sú aj trakty v strednom mozgu, moste a mozočku a postihnutá môže byť aj sivá hmota tak v mozočku, ako aj v mieche.

Bunkové telieska a axóny sú zvyčajne chránené, najmä v skorých léziách. Neskôr sa axóny môžu poškodiť, najmä v dlhých traktoch a v dôsledku fibróznej gliózy nadobudnú trakty svoj "sklerotický" vzhľad. Skoré aj neskoré lézie sa môžu vyskytovať naraz. V plakoch a okolo nich boli demonštrované chemické zmeny v lipidových a proteínových zložkách myelínu.

Ochorenie sa vyznačuje rôznymi ťažkosťami a zisteniami CNS dysfunkcie s remisiami a perzistentne sa opakujúcimi zväčšeniami bolesti.

Zobrazovanie prostredníctvom magnetickej rezonancie (MRI) je najcitlivejšou diagnostickou zobrazovacou technikou. Môže ukázať mnohé plaký. Lézie môžu byť viditeľné na kontrastne zosilnených CT skenoch.

Terapeutické pokroky pri skleróze multiplex (MS) sa objavujú pomaly čiastočne preto, že je neúplne pochopená patogenéza poruchy. Hlavné prekážky postupu empiricky založenej liečby zahŕňajú veľmi variabilný priebeh MS, dlhotrvajúcu povahu najdôležitejších meraných výstupov a chýbanie objektívnych markerov účinku liečby, najmä krátkodobých.

Hoci ostáva patogenéza MS neurčitá, pokračuje štúdium prirodzenej anamnézy. Boli vyvinuté objektívne záverečné merania založené na zobrazovaní prostredníctvom magnetickej rezonancie (MRI) a teraz sú známe mnohé osídla klinických testov, ktoré viedli k zlepšeným testovacím metódam a lepšej interpretácii výsledkov.

Preto je iným predmetom predloženého vynálezu spôsob liečenia MS prostredníctvom podávania účinného množstva chemokínových mutantov podľa vynálezu spolu s farmaceuticky prijateľným excipientom.

Výraz "účinné množstvo" označuje množstvo účinných zložiek, ktoré sú dostatočné na ovplyvnenie priebehu a závažnosti ochorenia, pričom vedú k redukcii alebo remisii takejto patológie. Účinné množstvo bude závisieť na spôsobe podávania a na stave pacienta.

Ďalším predmetom predloženého vynálezu sú farmaceutické prostriedky, ktoré obsahujú chemokínové mutanty podľa vynálezu v prítomnosti jedného alebo viacerých farmaceuticky prijateľných excipientov, na liečenie MS a/alebo iných demyelinačných ochorení.

Výraz "farmaceuticky prijateľný" zahŕňa akýkoľvek nosič, ktorý neinterferuje s účinnosťou biologickej aktivity účinnej zložky, a ktorý nie je toxický voči hostiteľovi, ktorému sa podáva. Napríklad na parenterálne podanie môžu byť vyššie uvedené účinné zložky formulované v jednotkovej dávkovej forme pre injekcie vo vehikulu, akým je napríklad fyziologický roztok, dextrózový roztok, sérový albumín a Ringerov roztok.

Okrem farmaceuticky prijateľného nosiča môžu prostriedky podľa vynálezu obsahovať aj minoritné množstvá aditív, ako napríklad stabilizátorov, excipientov, tlmivých roztokov a konzervačných látok.

Podávanie takejto aktívnej zložky môže byť intravenózne, intramuskulárne alebo subkutánne. Predložený vynález zahŕňa aj iné spôsoby podávania, ktoré zabezpečia požadovanú hladinu príslušných zložiek v krvi.

Optimálnu dávku účinnej zložky je možné vhodne vybrať v súlade so spôsobom podávania, stavom a vlastnosťami pacientov (pohlavie, vek, telesná hmotnosť, zdravotný stav, výška), rozsahom symptómov, súčasnými terapiami, frekvenciou liečby a požadovaným účinkom. Nastavenie a manipulácia stanovených dávkových rozsahov spadá do schopností priemerného odborníka.

Zvyčajná denná dávka účinnej zložky môže byť približne 0,01 až 100 mg na kg telesnej hmotnosti. Obyčajne 1 až 40 mg na kg na deň podávaných v rozdelených dávkach alebo vo forme s nepretržitým uvoľňovaním je účinné na získanie požadovaných výsledkov. Druhé alebo následné podávania sa môžu uskutočniť v dávke, ktorá je rovnaká alebo nižšia alebo vyššia ako počiatočná alebo predchádzajúca dávka podávaná jedincovi.

Predložený vynález bol opísaný s odvolaním sa na konkrétne uskutočnenia, ale obsah opisu zahŕňa všetky modifikácie a substitúcie, ktoré môžu prichádzať do úvahy pre priemerného odborníka v oblasti bez toho, aby prekročil význam a účel nárokov.

Vynález bude teraz opísaný prostredníctvom nasledujúcich príkladov, ktoré žiadnym spôsobom neobmedzujú predložený vynález. Príklady sa budú odvolávať na nižšie špecifikované 5ázky.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 znázorňuje zoradenie niektorých príkladných CC chemokínov, ktoré sú usporiadané v oblasti 40's slučky. Tento proteínový segment a kationové miesto, ktoré zodpovedá GAG-viažucemu motívu, sú v rámčekoch.

Obrázok 2 znázorňuje mapu plazmidu použitého na klonovanie štandardného RANTES a jeho mutantov podľa príkladov.

Obrázok 3 znázorňuje výsledky kompetičného väzobného testu [¹²⁵I]-RANTES a mutantov prostredníctvom heparínu v heparínovom guľčikovom teste.

Obrázok 4 znázorňuje kompetičné rovnovážne väzobné testy RANTES a trojitého 40's RANTES mutantu.

Obrázok 5 znázorňuje indukciu monocytovej a T bunkovej chemotaxie prostredníctvom RANTES a trojitých 40's a 50's RANTES mutantov.

Obrázok 6 znázorňuje inhibíciu zhromažďovania buniek v peritoneu prostredníctvom trojitého 40's RANTES mutantu.

Obrázok 7 znázorňuje inhibíciu RANTES indukovaného zhromažďovania buniek v peritoneu prostredníctvom skráteného trojitého 40's RANTES (3-68) mutantu produkovaného v *Pichia pastoris*.

Obrázok 8 znázorňuje inhibíciu MIP-1 β indukovaného zhromažďovania buniek v peritoneu prostredníctvom MIP-1 β trojitého 40's mutantu (K45AR46AK48A).

Obrázok 9 znázorňuje inhibíciu MIP-1 α indukovaného zhromažďovania buniek v peritoneu prostredníctvom MIP-1 α trojitého mutantu (R18A-R46A-R48A).

Obrázok 10 znázorňuje inhibíciu tioglykolátom indukovaného zhromažďovania buniek prostredníctvom trojitého 40's RANTES mutantu.

Obrázok 11 znázorňuje inhibíciu nástupu experimentálnej autoimunitnej encefalomyelitídy prostredníctvom všetkých 40's RANTES trojitých mutantov podľa vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

1. Materiály a metódy

a) Generovanie neheparínových väzobných RANTES mutantov

Mutagenéza RANTES sa dosiahla technikou inverznej polymerázovej reťazovej reakcie. Bodové mutácie sa zaviedli do jedného z dvoch primerov používaných na hybridizáciu so sekvenciou kódujúcou humánnu RANTES (GenBank príst. č. NM_002985) v opačnej orientácii. Na zlepšenie účinnosti anelovania primeru (najmä, keď sa do primerov zavádzali multiplicitné mutácie) sa

DNA alkalicky denaturovala. Denaturovaná DNA sa nariesila približne na koncentraciu 10 pg/reakciu, aby sa zabránilo začleneniu nemutovanej DNA do transformačnej reakcie.

Číslované aminokyselín uvedené v príkladoch a v opise berie do úvahy zrelý proteín, tzn. proteín začínajúci so Ser, čo je aminokyselina v polohe 24 podľa zoznamu sekvencií. Preto, aby bol perfektný súlad medzi číslami aminokyselín v zozname sekvencií a číslami v príklade, treba pripočítať 23 k číslam uvádzaným v príkladoch alebo v opise.

Nižšie sú uvedené sekvencie použitých primerov a mutované bázy sú podčiarknuté.

R44A (sense)

5'-TTTGTCACCGCAAGAACCGCCAAG-3' P1

R44A (antisense)

5'-GACGACTGCTGGGTTGGAGCACTTG-3' P2

K45A (sense)

5'-TTTGTCACCCGAGCGAACCGCCAAG-3' P3

K45A (antisense)

5'-GACGACTGCTGGGTTGGAGCACTTG-3' P4

R47A (sense)

5'-CGAAAGAACCGCCCAAGTGTGTGCCA-3' P5

R47A (antisense)

5'-CGAAAGAACCGCCCAAGTGTGTGCCA-3' P6

R44A-K45A-R47A (trojitý 40' mutant, sense)

5'-TTTGTCACCGCAGCGAACGCCCAAGTGTGTGCCAAC-3' P7

R44A-K45A-R47A (trojitý 40' mutant, antisense)

5'-GACGACTGCTGGGTTGGAGCACTTGCC-3' P8

K55A (sense)

5'-GCCAACCCAGAGGCGAAATGGGTTTCGG-3' P9

K55A (antisense)

5'-ACACACTTGGCGGTTCTTTCGGGTGAC-3' P10

K56A (sense)

5'-AACCCAGAGAAGGCATGGGTTTCGGGAG-3' P11

K56A (antisense)

5'-GGCACACACTTGGCGGTTCTTTCGGGT-3' P12

R59A (sense)

5'-AAGAAATGGGTTGCGGAGTACATCAAC-3' P13

R59A (antisense)

5'-CTCTGGGTTGGCACACACTTGGCG-3' P14

K55A-K56A-R59A (trojitý 50's mutant, sense)

5'-GCCAACCCAGAGGCGGCATGGGTTGCGGAGTACATC-3' P15

K55A-K56A-R59A (trojitý 50's mutant, antisense)

5'-ACACACTTGGCGGTTCTTTCGGGTGACAAAGAC-3' P16

Amplifikácia sa uskutočňovala v DNA termálnom cykleri (Perkin-Elmer-Cetus 480) v 35 cykloch použitím *pfuturbo*[®] DNA polymerázy (Stratagene). DNA sa ligovala a transformovala sa do Top 10 F' kompetených *E. coli* buniek (Invitrogen). Sekvencia mutantov sa overila DNA sekvenovaním.

b) Expresia a purifikácia štandardného (WT) RANTES a RANTES mutantov v *E. coli*

DNA fragmenty sa získali prostredníctvom PCR, ako bolo vysvetlené vyššie, a klonovali sa do plazmidu pET24d (obrázok 2), pričom sa generovala séria vektorov. Sekvencia kódujúca WT alebo mutovaný RANTES sa klonovala na 3' koniec pT7 promótoru, medzi *Xba*I a *Nhe*II/*Xho*I miesta. Plazmid obsahuje dva markerové gény (Km a lacI) a aktívny počiatok replikácie (Ori fl).

Výsledné vektory sa použili na retransformáciu BL21(DE3) kmeňa *E. coli*, ktorý umožňuje silnú proteínovú expresiu použitím pT7/LacI systému. Proteínová expresia sa indukovala pridaním 1mM izopropyl- β -D-tiogalaktopyranozidu (IPTG) do kultúry. Bunky sa zozbierali a resuspendovali v lyzačnom tlmivom roztoku (50mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 5 mM Benzamidín/HCl, 1mM DTT, 0,1mM fenylmetyl-sulfonylfluorid (PMSF), DNáza 20 mg/l). Bunky sa rozrušili troma pasážami cez French Pressure Cell jednotku. Suspenzia sa potom centrifugovala pri 10000 ot./min. 30 minút pri 4 °C. Pelet inklúzných teliesok obsahujúci WT RANTES alebo jeden z RANTES mutantov sa solubilizoval v 0,1M Tris/HCl, pH 8,0, obsahujúcej 6M guanidín/HCl a 1mM DTT a miešal sa 30 minút pri 60 °C. Roztok sa dialyzoval

oproti 3 výmenám 1% kyseliny octovej. Nerozpustný materiál sa odstránil centrifugáciou pri 10000 ot./min. počas 30 minút. Supernatant obsahujúci WT RANTES alebo jeden z RANTES mutantov sa lyofilizoval.

Lyofilizovaný prášok sa rozpustil v 0,1M Tris/HCl, pH 8,0 obsahujúcom 6M guanidín/HCl a 1mM DTT, aby sa získala koncentrácia približne 1 mg/ml. Proteíny sa renaturovali postupným (po kvapkách) riedením do desaťnásobného objemu guanidínového roztoku 20mM Tris/HCl, pH 8,0, obsahujúcej 0,01mM oxidovaný glutatión a 0,1mM redukovaný glutatión. Roztok sa miešal cez noc pri 4 °C. Nerozpustný materiál sa odstránil centrifugáciou pri 10000 ot./min 30 minút. pH sa nastavilo na 4,5 s kyselinou octovou a vodivosť sa nastavila na 20 ms prostredníctvom riedenia s vodou. Roztok sa naniesol na HiLoad S 26/10 kolónu predtým ekvilibrovanú v 10mM octane sodnom, pH 4,5, a proteín sa eluoval s lineárnym 0-2 M NaCl gradientom v rovnakom tlmivom roztoku. Frakcie obsahujúce WT RANTES alebo jeden z RANTES mutantných proteínov sa spojili, dialyzovali sa oproti 3 výmenám kyseliny octovej a lyofilizovali sa.

Lyofilizované proteíny sa rozpustili v 50mM Tris/HCl tlmivom roztoku, pH 8,0. MKKWPR vedúca sekvencia, ktorá bola výsledkom klonovacieho postupu, sa odštiepila od WT RANTES alebo jedného z RANTES mutantných proteínov prostredníctvom inkubovania s endoproteinázou Arg-C (1:600, enzým:substrát, hmotn.) cez noc pri 37 °C. Poštiepené proteíny sa odseparovali od nepoštiepeného proteínu kationovou výmennou chromatografiou na HiLoad S 26/10 kolóne predtým ekvilibrovanej s 20mM octanom sodným, pH 4,5, obsahujúcim 6M močovinu, a proteíny sa eluovali s lineárnym 0-2M NaCl gradientom v rovnakom tlmivom roztoku. Poštiepené frakcie sa spojili a dialyzovali oproti dvom výmenám 1% kyseliny octovej a nakoniec oproti 0,1% kyseline trifluóroctovej a potom sa lyofilizovali (Edgerton MD a ďalší, str. 33-40, a Proudfoot AE a ďalší, str. 75-87, v "Chemokine Protocols", Methods in Molecular Biology 2000, zv. 138, Humana Press).

Autenticita WT a RANTES mutantných proteínov sa overila hmotnostnou spektrometriou. Analogickým postupom sa vyrobil iný mutant, ktorý obsahuje Met ako predĺženie na NH₂-konci, ako aj jedinú alebo trojitú 40' RNATES mutáciu a jedinú alebo trojitú 50's mutáciu.

c) Expresia a purifikácia štandardného (WT) RANTES a RANTES mutantov v *Pichia pastoris*

Zrelý trojitý 40' RANTES mutant (R44A-K45A-R47A) sa vytvoril použitím megaprimerovej PCR mutagenézy (Datta AK, Nucleic Acid REsearch 1995, 23(21):4530-31). Klonoval sa do *Pichia pastoris* expresného vektora pPIC9K, v čítacom rámci so *S. cerevisiae* Mat alfa pro-pro signálnym peptidom.

Po overení sekvencie sa plazmid preniesol do *Pichia pastoris* hostiteľského kmeňa GS115(*his4*) prostredníctvom elektroporácie. His* klony sa skrínovali na expresiu RANTES mutantu. Malorozsahové štúdie expresie sa uskutočňovali použitím štandardných postupov, ako sú opísané v Pichia Expression Kit od Invitrogen (Life TEchnologies). V stručnosti, kultúra sa expandovala v obohatenom médiu použitím glycerolu ako zdroja uhlíka, a potom sa peletovala a resuspendovala v médiu obsahujúcom metanol na indukciu expresie RANTES mutantného proteínu. Vylučovanie RANTES mutantu do média sa detegovalo na SDS-PAGE farbenej s Coomassie Blue.

Klony vylučujúce vysoké hladiny RANTES mutantu (približne 500 až 750 mg/l) sa použili na zväčšenie rozsahu vo veľkých pretrepávacích fľašiach. Fermentované médium sa centrifugovalo pri 5000 ot./min a supernatant sa použil na purifikáciu.

Proteín sa purifikoval zo supernatantu v jedinom chromatografickom kroku na Heparin Sepharose kolóne ekvilibrovanej v 0,1M TRIS-HCl a eluoval sa s lineárnym gradientom 0-2M NaCl v rovnakom tlmivom roztoku použitím 20-násobného objemu kolóny. Autenticita proteínu sa overila hmotnostnou spektrometriou a zistilo sa, že takýmto systémom produkovaný RANTES mutant (R44A-K45A-R47A) je skrátенý aj na N-konci v porovnaní so štandardnou molekulou, tzn. chýbajú mu prvé dve aminokyseliny. Takto získaný mutant bol preto označený ako trojitý 40's RANTES (3-68) mutant (R44A, K45A, R47A) a jeho aminokyselinovou sekvenciou je sekv. č. 3.

d) Heparínové väzobné testy

Uskutočnila sa heparin sepharose chromatografia použitím 50 µg ET alebo mutovaných RANTES proteínov, ktoré sa naniesli na Heparin Sepharose kolónu

ekvilibrovanú v 25mM Tris/HCl, pH 8,0 a 50mM NaCl a eluovala sa s lineárnym gradientom 0-2M NaCl v 25mM Tris/HCl, pH 8,0.

Uskutočnila sa heparin sepharose chromatografia použitím 50 µg WT alebo mutovaných RANTES proteínov, ktoré sa naniesli na MonoS kationovú výmennú kolónu ekvilibrovanú v 50mM octane sodnom, pH 4,5. Proteín sa eluoval s 0-2M NaCl gradientom.

Uskutočňoval sa kompetičný väzobný test použitím WT RANTES, trojitého 50's RANTES mutantu a trojitého 40's RANTES mutantu (sekv. č. 2 - tu označovaná aj ako "R44A-R45A-R47ARANTES"), ktoré sa s Amersham rádioaktívne označili s ^{125}I na špecifickú aktivitu 2200 mCi/mol. Filtračné platne s 96 jamkami sa nasiakli s väzobným tlmivým roztokom (50mM HEPES, pH 7,2 obsahujúcim 1mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 0,15M NaCl a 0,5% BSA). Uskutočnili sa seriálne riedenia heparínu vo väzobnom tlmivom roztoku, aby sa pokryl koncentračný rozsah od 20 mg/ml do 1 µg/ml. Test sa uskutočňoval v celkovom objeme 100 µl pridaním 25 µl heparínových riedení, 25 µl 0,4nM [^{125}I]-chemokínu, 25 µl heparínových guľôčok (0,2 µg/ml vo vode) a 25 µl väzobného tlmivého roztoku do každej jamky. Test sa uskutočňoval trojmo. Platne sa inkubovali pri laboratórnej teplote s pretrepávaním 4 hodiny. Filtračné platne sa premyli trikrát s 200 µl premývacieho tlmivého roztoku použitím vákuovej pumpy na odstránenie nenaviazaného značeného chemokínu. Potom sa do každej jamky pridalo 50 µl scintilačného činidla a odčítala sa rádioaktivita (1 min./jamku). Údaje sa analyzovali použitím GraFit Softwaru.

e) Ekvilibračné kompetičné receptorové väzobné testy

Testy sa uskutočňovali na membránach z CHO transfektantov exprimujúcich CCR1 alebo CCR5 použitím scintilačného proximitného testu (SPA) použitím [^{125}I]-MIP-1 α ako stopovacieho činidla. Kompetítory sa pripravili seriálnymi riedeniami neznačených chemokínov vo väzobnom tlmivom roztoku, aby sa pokryl rozsah 10^{-6} až 10^{-12} M. Použitým väzobným tlmivým roztokom bol 50mM HEPES, pH 7,2 obsahujúci 1mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 0,15M NaCl a 0,5% BSA. Wheatgerm SPA guľôčky (Amersham) sa rozpustili v PBS na 50 mg/ml a nariedili sa vo väzobnom

roztoku na 10 mg/ml a finálna koncentrácia v teste bola 0,25 mg/jamku. Membrány pripravené z CHO buniek exprimujúcich CCR1 alebo CCR5 sa uskladňovali pri -80 °C a nariedili sa vo väzobnom tlmivom roztoku na 80 µg/ml. Na redukciu pozadia sa pred uskutočnením testu zmiešali rovnaké objemy membrány a zásob guľičiek. Finálna membránová koncentrácia bola 2 µg/ml a finálna koncentrácia [¹²⁵I]-MIP-1α bola 0,1 nM. Platne sa inkubovali pri laboratórnej teplote s pretrepávaním 4 hodiny. Rádioaktivita sa merala a údaje sa analyzovali rovnako ako je opísané pre heparínový väzobný test.

f) Chemotaktické testy

Monocytovej chemotaxia sa uskutočňovala použitím micro-Boyden komorového testu. Monocyty sa purifikovali zo zrazených leukocytov použitím nasledujúceho izolačného postupu: 100 ml roztoku zrazených leukocytov sa nariedilo so 100 ml PBS, navrstvili sa na Ficoll a centrifugovali sa pri 600 ot./min 20 minút pri laboratórnej teplote. Bunky tvoriace rozhranie sa zozbierali a dvakrát sa premyli s PBS a resuspendovali sa v koncentrácii 40 až 100 x 10⁶/ml v RPMI 1640 médiu obsahujúcom 5% inaktivované fetálne hovädzie sérum (FCS), 2mM glutamín a 25mM HEPES, pH 7,2. Ďalej sa purifikovali z lymfocytovej frakcie pridaním ovčích červených krviniek v množstve 10⁶ buniek/ml, rozetovaných cez noc pri 4 °C a separovali sa prostredníctvom druhej Ficoll gradientovej centrifugácie pri 900 ot./min počas 20 minút pri laboratórnej teplote. Monocyty sa nachádzali na rozhraní medzi Ficollom a tlmivým roztokom a T bunky boli v pelete. Monocyty sa premyli v PBS a resuspendovali sa na 2,5 x 10⁶/ml v RPMI 1640 médiu. Čistota sa merala priamym a bočným rozptylom prostredníctvom FACS analýzy a zistilo sa, že je 40 až 80% v závislosti od darcu. Chemokín sa nariedil na konečný objem 30 µl, pokrývajúci koncentračný rozsah 10⁻⁶-10⁻¹² M v RPMI médiu a preniesol sa do spodných jamiek. Na spodné jamky sa umiestnil filter s veľkosťou pórov 5 µm (Neuroprobe) pre monocyty a s veľkosťou pórov 8 µm pre T bunky, pričom sa zaistilo, by sa tam nevyskytovali vzduchové bubliny, a systém sa nepriepustne uzavrel. Do horných jamiek sa umiestnilo päťdesiat mikrolitrov bunkovej suspenzie (2,5 x 10⁶ buniek/ml) v RPMI médiu. Komôrka sa inkubovala 30 minút pri

monocytoch a 1,5 hodiny pri T bunkách, pri 37 °C pod O₂. Bunky sa potom odstránili, z hornej plochy membrány sa zoškrabali bunky a membrána sa potom premyla s PBS. Membrána sa fixovala ponorením do MeOH na jednu minútu, vysušila sa na vzduchu a farbila sa s roztokmi Field A a B. Migrované bunky sa spočítali prostredníctvom výberu náhodných polí pre každú jamu s 20x objektívom na štandardnom mikroskope, ktorý je kompatibilný s IBAS zobrazovacím analyzačným softwarom. Údaje sa skoordinovali použitím GraFit softwaru.

g) Testy zhromažďovania buniek v peritoneu

V prvom teste sa zhromažďovanie buniek indukovalo intraperitoneálnou injekciou 10 µg chemokínu nariedeného v 0,2ml sterilného fyziologického roztoku (LPS bez NaCl) samičiek BALB/c myší vo veku 8 až 12 týždňov. Chemokínové mutanty (10 µg chemokínu nariedeného v 0,2 ml sterilného fyziologického roztoku) sa podávali 30 minút pred podaním agonistu. O 16 hodín neskôr sa myši usmrtili prostredníctvom aerosólového CO₂. Peritoneálna laváž sa uskutočnila troma premývaniami s 5 ml PBS a laváže sa spojili. Bunky sa centrifugovali pri 600 ot./min 10 minút, resuspendovali sa v konečnom objeme 1 ml a s hemacytometrom sa spočítali celkové vyvolané leukocyty.

V druhom teste sa zhromažďovanie buniek indukovalo intraperitoneálnou injekciou 200 µl 3% roztoku tioglykolátu v destilovanej vode samičkám BALB/c myší vo veku 8 až 12 týždňov (na 1. deň). 30 minút pred podaním tioglykolátu sa podal chemokínový mutant (10 µg chemokínu nariedených v 0,2 ml sterilného fyziologického roztoku). Chemokínový mutant sa potom podával denne ďalšie tri dni (deň 2, 3 a 4). Myši sa usmrtili na 5. deň aerosolizovaným CO₂. Peritoneálna laváž sa uskutočnila troma premývaniami s 5 ml PBS a laváže sa spojili. Bunky sa centrifugovali pri 600 ot./min 10 minút, resuspendovali sa v konečnom objeme 1 ml a s hemacytometrom sa spočítali celkové vyvolané leukocyty.

h) Experimentálna autoimunitná encefalomyelitída (EAE)

Imunizačný postup

8-týždňové samičky C57 BL/6NCrIBR myší s hmotnosťou 18 až 22 gramov sa imunizovali (deň 0) prostredníctvom s.c. injekcie do zadnej časti krku, ktorá

obsahovala 0,1 ml emulzie obsahujúcej 200 µg MOG₃₅₋₅₅ peptidu (Neosystem, Strasbourg, Francúzsko) v kompletnom Freundovom adjuvans (CFA s *Mycobacterium butyricum*, Difco, Detroit, USA) obsahujúcom 0,25 mg *Mycobacterium tuberculosis*. Pred s.c. injekciou obdržali 200µl i.v. injekciou 300 ng pertussis toxínu (List Biological Lab., Campbell, CA, USA) rozpusteného v PBS do chvostovej žili. Na druhý deň sa zvieratám podala druhá i.p. injekcia 300 ng pertussis toxínu.

Tento postup viedol, začínajúc približne na 8 až 10 deň, k objaveniu sa progresívnej paralýzy, začínajúcej na chvoste a pokračujúcej po predné končatiny.

Návrh štúdie

Štúdia zahŕňala skupiny obsahujúce po desať zvierat. Všetky skupiny boli imunizované s MOG₃₅₋₅₅ peptidom v CFA a pertussis toxínom v súlade s imunizačným protokolom.

Skupina 1: pozitívna kontrolná skupina, ktorej sa i.p. spôsobom podávalo len samotné vehikulum (PBS).

Skupina 2: pozitívna kontrolná skupina, ktorej sa s.c. spôsobom podávalo len samotné vehikulum (PBS).

Skupina 3: i.p. spôsobom podávaný trojitý 40's RANTES mutant v množstve 10 µg/myš.

Skupina 4: i.p. spôsobom podávaný trojitý 40's RANTES mutant v množstve 1 µg/myš.

Skupina 5: i.p. spôsobom podávaný trojitý 40's Met-RANTES mutant v množstve 10 µg/myš.

Skupina 6: i.p. spôsobom podávaný trojitý 40's Met-RANTES mutant v množstve 1 µg/myš.

Skupina 7: s.c.. spôsobom podávaný myšací rekombinantný interferón beta (m-IFN-β) v množstve 10000 jednotiek/myš.

Skupina 8: s.c.. spôsobom podávaný m-IFN-β v množstve 20000 jednotiek/myš.

Vehikulum

PBS sa použilo na riedenie všetkých trojitých 40's RANTES mutantov, všetkých trojitých 40's Met-RANTES mutantov a mIFN- β na vhodnú koncentráciu.

Spôsob podávania

Trojitý 40's RANTES mutant, trojitý 40's Met-RANTES mutant a m-IFN- β sa podávali denne i.p. spôsobom v objeme na podávanie 200 μ l/myš. Skupinám 1 a 2 sa i.p. spôsobom podávalo PBS v množstve 200 μ l/myš.

Trvanie liečenia

Liečenie začalo u každého zvieraťa na 4. experimentálny deň (približne 3 až 5 dní pred zvyčajným výskytom ochorenia) a potom pokračovalo 14 po sebe idúcich dní (zvieratá sa usmrtili na 18. experimentálny deň).

Klinické pozorovania

Od piateho dňa sa zvieratá jednotlivo vyšetrovali vyšetrovateľom na prítomnosť paralýzy prostredníctvom klinického skóre nasledovne:

0 = žiadna známka ochorenia

0,5 = čiastočná paralýza chvosta

1 = paralýza chvosta

1,5 = paralýza chvosta + čiastočná unilaterálna paralýza zadnej končatiny

2 = paralýza chvosta + slabosť zadných končatín alebo čiastočná paralýza zadných končatín

2,5 = paralýza chvosta + čiastočná paralýza zadných končatín (spustená panva)

3 = paralýza chvosta + kompletná paralýza zadných končatín

3,5 = paralýza chvosta + kompletná paralýza zadných končatín + inkontinencia

4 = paralýza chvosta + paralýza zadných končatín + slabosť alebo čiastočná paralýza predných končatín

5 = umieranie alebo smrť

Výsledky

a) Heparínové väzobné testy

Purifikované RANTES proteíny mutované v jednej alebo v troch polohách sa analyzovali heparínovou chromatografiou a porovnávala sa koncentrácia NaCl potrebná na ich eluovanie s elučným profilom WT RANTES. Keďže interakcia s heparínom je elektrostatická, mutanty sa podrobili aj kationovej výmennej chromatografii na MonoS kolóne. To vedie k poklesu NaCl koncentrácie potrebnej na ich eluovanie, keďže mutagenéza odstránila zásadité zvyšky. Rozdiel v NaCl koncentrácii získanej pri kationovej výmennej chromatografii sa odčíta od rozdielu získaného pri heparínovej chromatografii. Ak je táto hodnota pozitívna, je identifikovaná špecifická interakcia s heparínom (tabuľka 1).

Priame meranie viazania sa na heparín sa uskutočňovalo s trojitými 40's a 50's RANTES mutantami v kompetičnom väzobnom teste. WT RANTES a mutanty sa jodidovali s Amersham a všetky mali rovnakú špecifickú rádioaktivitu 2200 mCi/mol. Avšak len približne 20 % trojitého 40's mutantu sa naviazalo na heparínové guľičky, s maximálnou hodnotou cpm 4000 v porovnaní s 22000 cpm pre WT RANTES a 50's mutant (obrázok 3). To demonštruje, že tie zvyšky v 40's slučke, ktoré boli mutované, sa podieľajú na väčšine heparínovej väzobnej schopnosti RANTES. Na druhej strane to tiež demonštruje to, že pravdepodobný GAG-väzobný motív v 50's slučke nie je "pravým" GAG-väzobným miestom.

b) Rovnovážne kompetičné receptorové väzobné testy

Schopnosť trojitého 40's a trojitého 50's RANTES mutantu konkurovať [¹²⁵I]MIP-1α pri viazaní na rekombinantné CCR1 a CCR5 v membránach pripravených z CHO stabilných transfektantov. Neexistuje žiadny významný rozdiel v žiadnej z jednotlivých mutácií na žiadnom z receptorov (údaje nie sú znázornené). Žiadny z trojitých mutantov nevykazoval rozdiel vo viazaní sa na CCR5 v porovnaní s WT RANTES proteínom. Avšak pri CCR1 mal trojitý 40's mutant stonásobne zníženú afinitu, pričom trojitý 50's mutant vykazoval len malú stratu afinity (trojnásobnú) (obrázok 4).

c) Chemotaktické testy

Trojité 40's a 50's mutanty boli všetky schopné indukovať monocytovú chemotaxiu s aktivitou porovnateľnou s WT RANTES, s výnimkou trojitého 40's

mutantu, ktorý bol schopný indukovať významnú chemotaxiu v koncentrácii 1 μ M. Avšak trojité 40's a 50's mutanty mali rovnakú schopnosť indukovať chemotaxiu T buniek (obrázok 5). Výsledky získané v monocytových chemotaktických testoch dobre zodpovedajú výsledkom získaným v receptorových väzobných testoch.

Výsledky získané v monocytových chemotaktických testoch dobre korešpondujú s výsledkami získaným v receptorových väzobných testoch. Strata aktivity trojitého 40's RANTES mutantu pri monocytovej chemotaxii zodpovedá strate afinity voči CCR1.

d) Testy zhromažďovania buniek v peritoneu

Trojité 40's RANTES mutant nebol schopný indukovať zhromažďovanie buniek v peritoneu v dávke (10 μ g/myš), pri ktorej RANTES spôsobuje podstatné zhromažďovanie (obrázok 6).

Okrem toho, ak sa podá 10 μ g mutantu 30 minút pred podaním RANTES je inhibované bunkové zhromažďovanie indukované prostredníctvom RANTES. Preto zničenie GAG-viazania spôsobuje inhibíciu chemokínom indukovaného zhromažďovania buniek *in vivo*.

Analogické výsledky sú znázornené na obrázku 7 so skráteným RANTES (3-68) trojitým 40's mutantom (produkovaným v *Pichia pastoris*), na obrázku 8 prostredníctvom MIP-1 β trojitého 40's mutantu (K45A-R46A-K48A) a na obrázku 9 prostredníctvom MIP-1 α trojitého 40's mutantu (R18A-R46A-R48A). Trojitým 40's RANTES mutantom sa inhibovalo aj zhromažďovanie buniek stimulované tioglykolátom, ako je znázornené na obrázku 10.

e) Experimentálna autoimunitná encefalomyelitída (EAE)

Trojité 40's RANTES mutant vykazoval na dávke závislý účinok na myšacom EAE modeli. Proteín, tak v dávke 1 μ g, ako aj v dávke 10 μ g/myš, sa podával denne i.p. začínajúc na 10. deň po primárnej imunizácii s MOG, pričom demonštroval porovnateľnú účinnosť ako referenčná liečba s rekombinantným m-IFN- β (obrázok 11). Nástup ochorenia bol významne oddialený a závažnosť ochorenia (hodnotená prostredníctvom oblasti pod krivkou) bola tiež významne redukovaná. Okrem toho

bolo znížené aj priemerné maximálne klinické skóre dosiahnuté počas experimentu. Iný mutant (trojitý 40's Met-RANTES mutant) nevykazoval žiadny užitočný účinok v rovnakom experimente.

Naše výsledky dokazujú jasný užitočný účinok liečenia so 40's RANTES trojitým mutantom, ktorý redukuje klinické známky chronickej EAE u myší po imunizácii s MOG. Preto má trojitý 40's RANTES mutant užitočný terapeutický účinok a môže byť použitý ako terapia pri chronických demyelinačných ochoreniach, ako napríklad MS.

Tabuľka 1

Molarita NaCl na eluovanie z Heparínovej a Mono-S (kationovej výmennej) kolóny

RANTES mutácia	Heparín	MonoS	$\Delta\text{NaCl}^{\text{Hep-S}}$	$\Delta\text{NaCl}^{\text{Mono-s}}$	$\Delta\Delta \text{NaCl}$
žiadna (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

Nasledujúca tabuľka 2 vyjasní identitu sekvencií uvádzaných v zozname sekvencií a v texte.

Tabuľka 2

Sekv. č.	Opis sekvencie
1	štandardný typ (WT) RANTES
2	trojitý 40's RANTES mutant
3	trojitý 40's RANTES(3-68) mutant

4	trojitý MIP-1 α mutant (R18A-R46A-R48A)
5	trojitý MIP-1 β mutant (K45A-R46A-K48A)
6	trojitý 50's RANTES mutant
7	trojitý 40's Met-RANTES mutant
8	R44A-RANTES mutant
9	K45A-RANTES mutant
10	R47A-RANTES mutant
11	K55A-RANTES mutant
12	K56A-RANTES mutant
13	R59A-RANTES mutant
14	primer P1
15	primer P2
16	primer P3
17	primer P4
18	primer P5
19	primer P6
20	primer P7
21	primer P8
22	primer P9
23	primer P10
24	primer P11
25	primer P12
26	primer P13
27	primer P14
28	primer P15
29	primer P16
30	WT-I309
31	WT-MIP-1 α
32	WT-MIP-1 β
33	WT-MIP-4

35	WT-HCC1
36	WT-I36512
37	WT-MCP-2

Zoznam sekvencií

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> Chemokínové mutanty na liečenie sklerózy multiplex

<130> WO465

<160> 37

<170> Patentln version 3.0

<210> 1

<211> 91

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> signál

<222> (1)...(23)

<400> 1

Met	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala	
1				5					10					15		
Leu	Cys	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asp	Thr	Thr	Pro	
			20					25					30			
Cys	Cys	Phe	Ala	Tyr	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Ala	His	Ile	Lys	
		35					40					45				
Glu	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Phe	
	50					55				60						
Val	Thr	Arg	Lys	Asn	Arg	Gln	Val	Cys	Ala	Asn	Pro	Glu	Lys	Lys	Trp	
65				70					75						80	
Val	Arg	Glu	Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Met	Ser						
				85					90							

<210> 2

<211> 66

<212> PRT

<213> *Pichia pastoris*

<400> 2

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

<210> 3

<211> 91

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> signál

<222> (1)...(23)

<400> 3

```
Met Lys Val Ser Ala Ala Ala Leu Ala Val Ile Leu Ile Ala Thr Ala
1              5              10              15
Leu Cys Ala Pro Ala Ser Ala Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro
              20              25              30
Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys
              35              40              45
```

Glu	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Phe
50						55					60				
Val	Thr	Ala	Ala	Asn	Ala	Gln	Val	Cys	Ala	Asn	Pro	Glu	Lys	Lys	Trp
65					70					75					80
Val	Arg	Glu	Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Met	Ser					
				85					90						

<210> 4

<211> 70

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 4

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

<210> 5

<211> 69

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 5

Ala	Pro	Met	Gly	Ser	Asp	Pro	Pro	Thr	Ala	Cys	Cys	Phe	Ser	Tyr	Thr
1				5					10					15	
Ala	Arg	Lys	Leu	Pro	Arg	Asn	Phe	Val	Val	Asp	Tyr	Tyr	Glu	Thr	Ser
			20					25					30		

Ser Leu Cys SER Gln Pro Ala Val Phe Gln Thr Ala Ala Ser Ala
35 40 45
Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr
50 55 60
Asp Leu Glu Leu Asn
65

<210> 6

<211> 91

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> signál

<222> (1)...(23)

<400> 6

Met Lys Val Ser Ala Ala Ala Leu Ala Val Ile Leu Ile Ala Thr Ala
1 5 10 15
Leu Cys Ala Pro Ala Ser Ala Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro
20 25 30
Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys
35 40 45
Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe
50 55 60
Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln Val Cys Ala Asn Pro Glu Ala Ala Trp
65 70 75 80
Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser
85 90

<210> 7

<211> 92

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 7

Met	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala				
1				5					10					15					
Leu	Cys	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Met	Ser	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asp	Thr	Thr				
			20					25					30						
Pro	Cys	Cys	Phe	Ala	Tyr	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Ala	His	Ile				
		35					40					45							
Lys	Glu	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Pro	Ala	Val	Val				
	50					55					60								
Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Asn	Ala	Gln	Val	Cys	Ala	Asn	Pro	Glu	Lys	Lys				
65					70				75						80				
Trp	Val	Arg	Glu	Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Met	Ser								
			85					90											

<210> 8

<211> 91

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> signál

<222> (1)...(23)

<400> 8

Met	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala				
1				5					10					15					
Leu	Cys	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asp	Thr	Thr	Pro				
			20					25					30						
Cys	Cys	Phe	Ala	Tyr	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Ala	His	Ile	Lys				
		35					40					45							
Glu	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Phe				
	50					55					60								
Val	Thr	Ala	Lys	Asn	Arg	Gln	Val	Cys	Ala	Asn	Pro	Glu	Lys	Lys	Trp				
65					70				75						80				

Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser
85 90

<210> 9

<211> 91

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> signál

<222> (1)...(23)

<400> 9

Met Lys Val Ser Ala Ala Ala Leu Ala Val Ile Leu Ile Ala Thr Ala
1 5 10 15
Leu Cys Ala Pro Ala Ser Ala Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro
20 25 30
Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys
35 40 45
Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe
50 55 60
Val Thr Arg Ala Asn Arg Gln Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp
65 70 75 80
Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser
85 90

<210> 10

<211> 91

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> signál

<222> (1)...(23)

<400> 10

Met	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala
1				5					10					15	
Leu	Cys	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asp	Thr	Thr	Pro
			20					25					30		
Cys	Cys	Phe	Ala	Tyr	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Ala	His	Ile	Lys
		35					40					45			
Glu	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Phe
	50						55				60				
Val	Thr	Arg	Lys	Asn	Ala	Gln	Val	Cys	Ala	Asn	Pro	Glu	Lys	Lys	Trp
65				70						75					80
Val	Arg	Glu	Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Met	Ser					
				85					90						

<210> 11

<211> 91

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> signál

<222> (1)...(23)

<400> 11

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

```
Val Thr Arg Lys Asn Ala Gln Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp
65              70              75              80
Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser
            85              90
```

<210> 12

<211> 91

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> signál

<222> (1)...(23)

<400> 12

Met	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala
1				5					10					15	
Leu	Cys	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asp	Thr	Thr	Pro
			20					25					30		
Cys	Cys	Phe	Ala	Tyr	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Ala	His	Ile	Lys
		35					40					45			
Glu	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Phe
	50					55					60				
Val	Thr	Arg	Lys	Asn	Arg	Gln	Val	Cys	Ala	Asn	Pro	Glu	Lys	Ala	Trp
65					70					75					80
Val	Arg	Glu	Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Met	Ser					
				85					90						

<210> 13

<211> 91

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> signál

<222> (1)...(23)

<400> 13

Met	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala
1				5					10					15	
Leu	Cys	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asp	Thr	Thr	Pro
			20					25					30		
Cys	Cys	Phe	Ala	Tyr	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Ala	His	Ile	Lys
		35				40					45				
Glu	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Phe
	50					55				60					
Val	Thr	Arg	Lys	Asn	Arg	Gln	Val	Cys	Ala	Asn	Pro	Glu	Lys	Lys	Trp
65				70				75							80
Val	Arg	Glu	Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Met	Ser					
				85				90							

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 14

tttgtcaccg	caaagaaccg	ccaag	25
------------	------------	-------	----

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 15

gacgactgct	gggttgaggc	acttg	25
------------	------------	-------	----

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 16

tttgtcaccg gagcgaaccg ccaag

25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 17

gacgactgct gggttggagc acttg

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 18

cgaaagaacg cccaagtgtg tgcca

25

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 19

ggtgacaaag acgactgctg ggttg

25

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 20

tttgtcaccg cagcgaacgc ccaagtgtgt gccaac

36

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 21

gacgactgct gggttggagc acttgcc

27

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 22

gccaaaccag aggcgaaatg gggtcgg

27

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 23

acacacttgg cggttctttc gggtgac

27

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 24

aacccagaga aggcattgggt tcgggag

27

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 25

ggcacacact tggcgggttct ttcgggt

27

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 26

aagaaatggg ttgcggagta catcaac

27

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 27

ctctgggttg gcacacactt ggcg

24

<213> *Escherichia coli*

36

<213> *Escherichia coli*

33

<213> *Escherichia coli*

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

<210> 31

<211> 70

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 31

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

<210> 32

<211> 68

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 32

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

<210> 33

<211> 68

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 33

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

<210> 34

<211> 76

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 34

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

<210> 35

<211> 74

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 35

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

<210> 36

<211> 96

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 36

Pro	Lys	Val	Pro	Glu	Trp	Val	Asn	Thr	Pro	Ser	Thr	Cys	Cys	Leu	Lys
1				5					10					15	
Tyr	Tyr	Glu	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	Val	Gly	Tyr	Arg	Lys
			20					25						30	
Ala	Leu	Asn	Cys	His	Leu	Pro	Ala	Ile	Ile	Phe	Val	Thr	Lys	Arg	Asn
			35					40					45		
Arg	Glu	Val	Cys	Thr	Asn	Pro	Asn	Asp	Asp	Trp	Val	Gln	Glu	Tyr	Ile
		50				55					60				
Lys	Asp	Pro	Asn	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Thr	Arg	Asn	Leu	Ser	Thr	Val
65						70				75					80

Lys Ile Ile Thr Ala Lys Asn Gly Gln Pro Gln Leu Leu Asn Ser Gln
85 90 95

<210> 37

<211> 76

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 37

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

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie CC chemokínového mutantu, ktorý obsahuje aspoň dve mutácie v kationovom mieste 40's slučky, ako je znázornené na obrázku 1, a ktorý má v porovnaní so štandardným typom molekuly zníženú GAG-viažucu aktivitu, na prípravu farmaceutického prostriedku na liečenie sklerózy multiplex a/alebo iných demyelinačných ochorení, pričom CC chemokín je vybraný zo skupiny, ktorá zahŕňa RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3, MIP-4, HCC1, I309, I35612 a MCP-2.

2. Použitie podľa nároku 1, kde chemokínovým mutantom je RANTES mutant.

3. Použitie podľa nároku 2, kde chemokínovým mutantom je RANTES trojitý mutant, v ktorom sú tri zásadité aminokyseliny v kationovom mieste 40's slučky substituované inými aminokyselinami.

4. Použitie podľa nároku 3, kde sú tri zásadité aminokyseliny v kationovom mieste 40's slučky substituované alanínom, serínom, treonínom, prolínom alebo glycínom.

5. Použitie podľa nároku 1, kde chemokínovým mutantom je mutovaný RANTES so sekvenciou č. 3.

6. Použitie podľa nároku 1, kde chemokínovým mutantom je RANTES mutant so sekvenciou č. 2.

7. Použitie podľa nároku 1, kde chemokínovým mutantom je MIP-1 α mutant so sekvenciou č. 4.

8. Použitie podľa nároku 1, kde chemokínovým mutantom je MIP-1 β mutant so sekvenciou č. 5.

9. Farmaceutický prostriedok na použitie podľa nárokov 1 až 8, vyznačujúci sa tým, že obsahuje ako účinnú zložku CC chemokínový mutant, ktorý obsahuje aspoň dve mutácie v kationovom mieste 40's slučky, ako je znázornené na obrázku 1, a ktorý má v porovnaní so štandardným typom molekuly zníženú GAG-viažucu aktivitu, spolu s farmaceuticky prijateľným nosičom.

10. Skrátенý a mutovaný humánny RANTES, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 2.

11. DNA molekula zahŕňajúca DNA sekvencie kódujúce skrátенý a mutovaný RANTES podľa nároku 10.

12. Expresný vektor, ktorý obsahuje DNA molekulu podľa nároku 10.

13. Hostiteľská bunka obsahujúca expresný vektor podľa nároku 12.

14. Rekombinantný spôsob prípravy polypeptidu podľa nároku 10, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa kultivovanie buniek podľa nároku 13 v príslušnom kultivačnom médiu.

		kationové miesto		
RANTES	SPYSSDT.TPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTS GK.	CSNPAVVFTVRKNRQVC	ANPEKKWVREYINSLEMS	
I309	SKSMQVPSRCCFSAEQEIPLRAILCYRNTSSI.	CSNEGLIFKLKRGKEAC	ALDTVGWVQHRKMLRHCPKSRK	
MIP-1a	ASLAADTFATACCFSTSRQIPQNFIA DYFETSSQ.	CSKPGVIFLT	KRSRQVC	
MIP-4/R83915/PARC	QVGTNKELCCLVTSWQIPQKFIYDSETSPQ.	CPKLGVIILTL	KRGRIQC	
MIP-3	DRFHATSADCCISYTPRSIPCSLLESYFETNSE.	CSKPGVIFLT	KGRHFFC	
MIP-5/HCC2/G5	SFHPAADCCTSYISQIPCSLMKSYFETSSE.	CSKPGVIFLT	KGRQVC	
MIP-1β	APMGSDPTACCFSTARKLPNRFVVDYETSSL.	CSQPAVVFQT	KRSKQVC	
HCC1	TKTESSRGPYHPSECCFTYTYKIPRQIMDYETNSQ.	CSKPGVIFLT	KRGHSVC	
I35612	PKVPEWNTPTSTCCLKYKVLPRRLVVGYRKALN..	CHLPAILFVT	KRNREVC	
MCP-2	QPDVSIPITCCFNVINRKIPIQRLSSYTRITNIQ	CPKEAVIFKT	KRGKEVC	
		5	10	15

40's slučka

ADPKERWVRDMSMKHLDQITQNLKP

TNPDDNDWQBEYIKDPNLPLLPTRNLSTVXIITARNQGPQLLNSQ

TNPDKKWQDIYIKDMKEN

ANPSDKQOVCMRMKLDTRIKTRKN

ADPNKKWQKYISDLKLANA

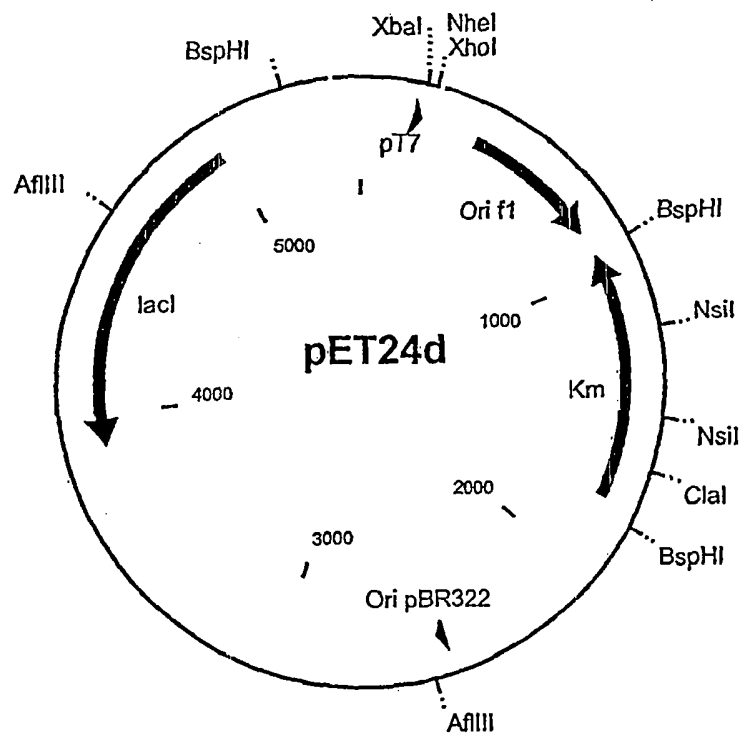
ADPSEEWQKYVSDLELSA

ADPSEEWQKYVSDLELSA

40's slúčka

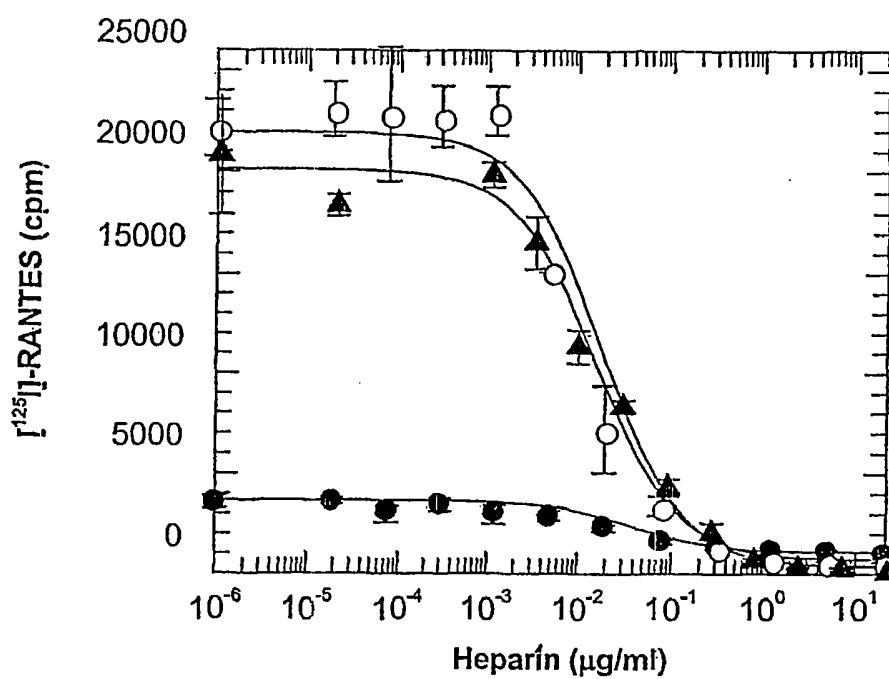
Obr. 1

2/11



Obr. 2

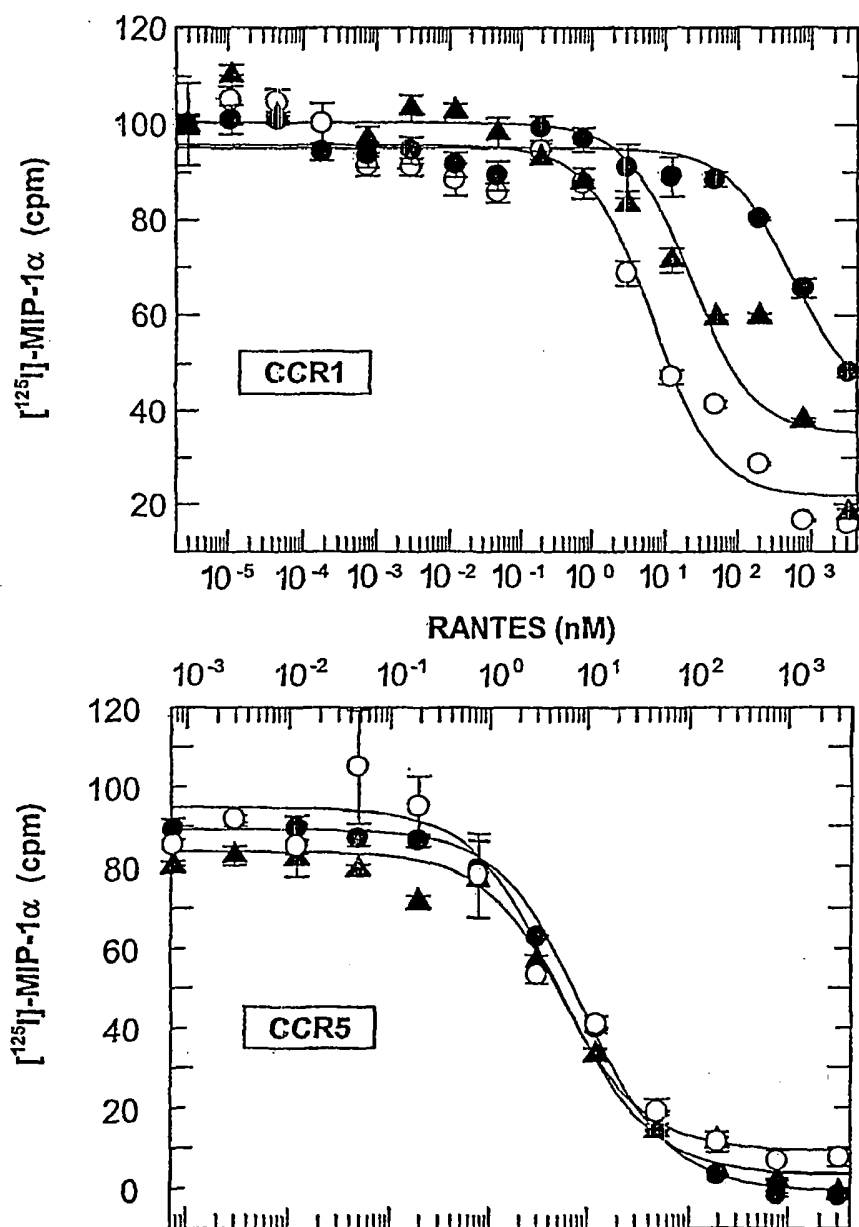
3/11



Štandardný typ (O); trojitý 50's mutant (▲); trojitý 40's mutant (●)

Obr. 3

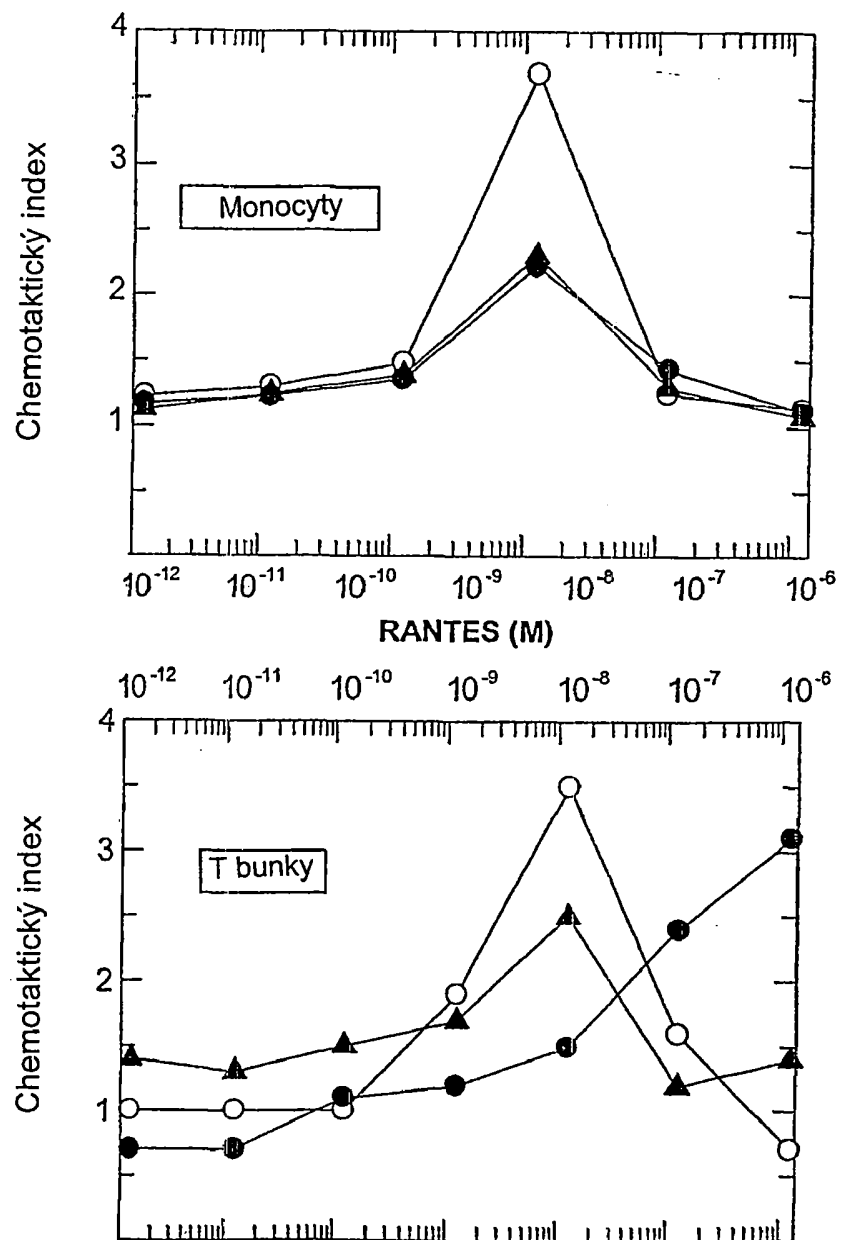
4/11



Štandardný typ (O); trojitý 50's mutant (▲); trojitý 40's mutant (●)

Obr. 4

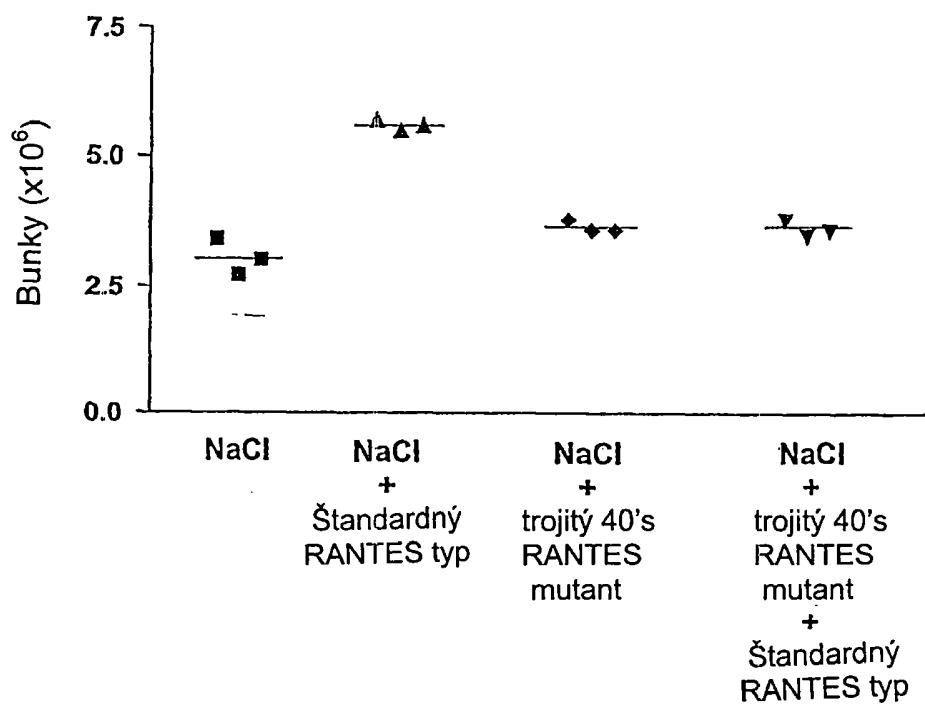
5/11



Štandardný typ (O); trojitý 50's mutant (▲); trojitý 40's mutant (●)

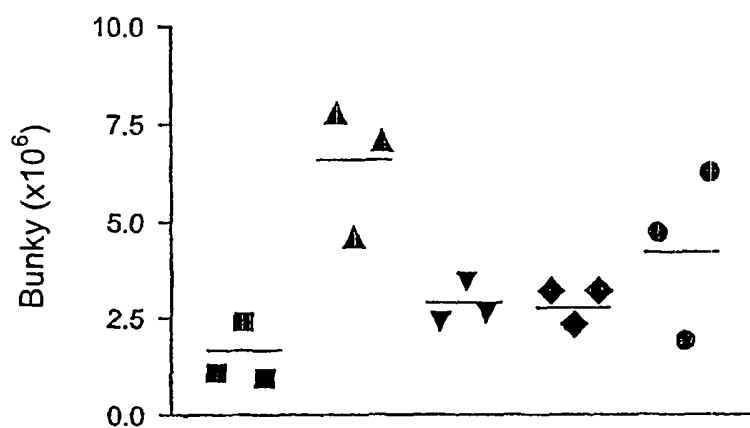
Obr. 5

6/11



Obr. 6

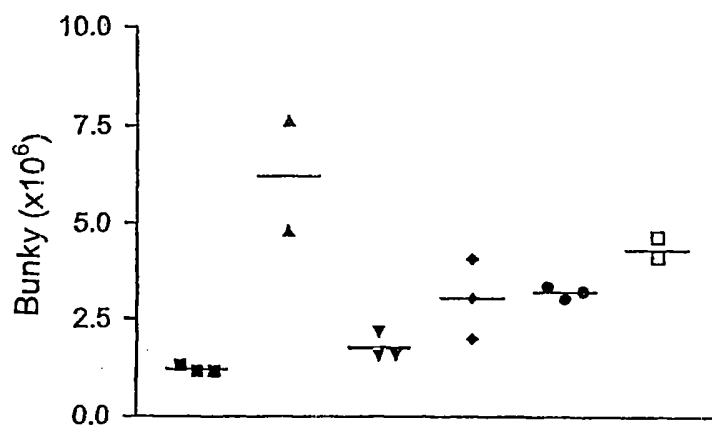
7/11



- NaCl
- ▲ NaCl + štandardný RANTES typ
- ▼ NaCl + trojitý 40's RANTES (3-68) mutant
- ◆ NaCl + 10 µg trojitý 40's RANTES (3-68) mutant + štandardný RANTES typ
- NaCl + 0,1 µg trojitý 40's RANTES (3-68) mutant + štandardný RANTES typ

Obr. 7

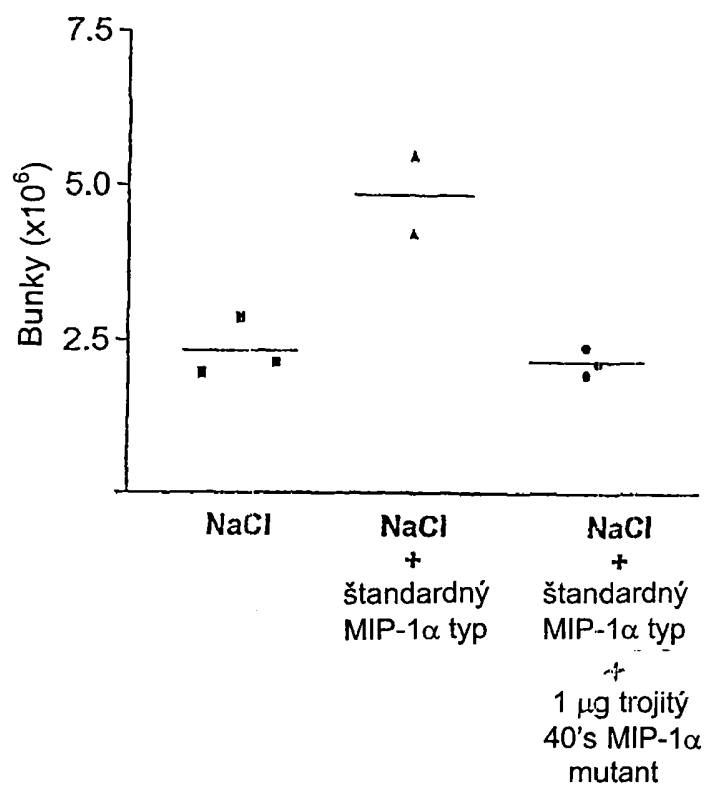
8/11



- NaCl
- ▲ NaCl + štandardný MIP-1 β typ
- ▼ NaCl + trojitý 40's MIP-1 β mutant
- ◆ NaCl + 10 μ g trojitý 40's MIP-1 β mutant + štandardný MIP-1 β typ
- NaCl + 1 μ g trojitý 40's MIP-1 β mutant + štandardný MIP-1 β typ
- NaCl + 0,1 μ g trojitý 40's MIP-1 β mutant + štandardný MIP-1 β typ

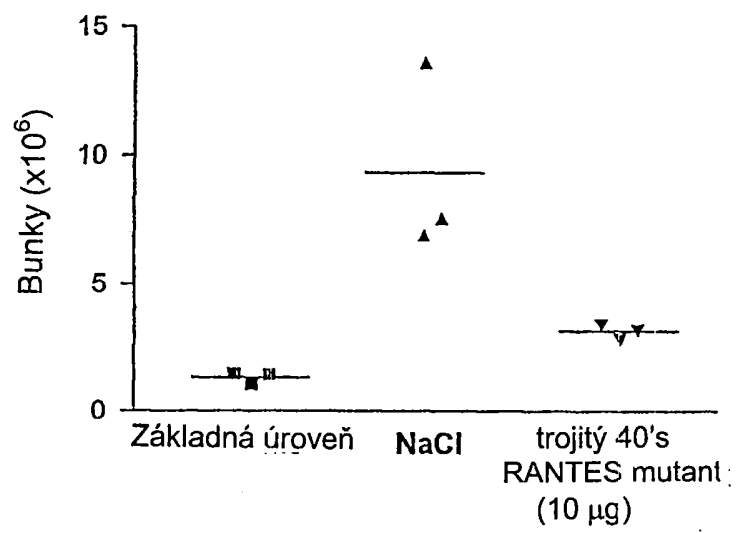
Obr. 8

9/11



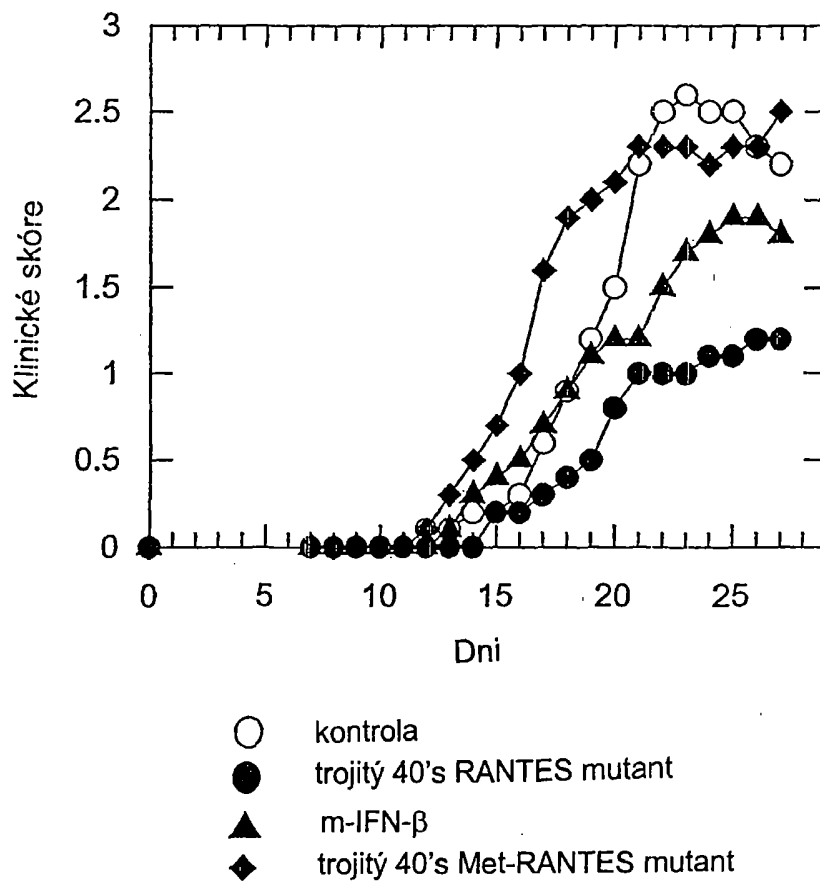
Obr. 9

10/11



Obr. 10

11/11



Obr. 11