



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 91820

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 38/19

A61P 29/00

A61P 31/00

A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ ВАРІАНТІВ ХЕМОКІНІВ

1

2

(21) a200604131

(22) 18.10.2004

(24) 10.09.2010

(86) PCT/EP2004/052572, 18.10.2004

(31) 03078308.8

(32) 16.10.2003

(33) EP

(46) 10.09.2010, Бюл.№ 17, 2010 р.

(72) ПРАУДФУТ АМАНДА, FR, ШОУ ДЖЕФФРІ,  
СН, ДЖОНСОН ЗОУІ, СН

(73) МЕРК СЕРОНО С.А., СН

(56) PAAVOLA CHAD D. ET AL: "Monomeric  
monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds  
and activates the MCP-1 receptor CCR2B" JOURNAL  
OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 50, 11  
December 1998 (1998-12-11), pages 33157-33165.HEMMERICH S. ET AL: "Identification of residues in  
the monocyte chemotactic protein-1 that contact the  
MCP-1 receptor, CCR2." BIOCHEMISTRY. 5 OCT  
1999, vol. 38, no. 40, 5 October 1999 (1999-10-05),  
pages 13013-13025.KIM KEY-SUN ET AL: "Structural characterization of  
a monomeric chemokine: Monocyte chemoattractant  
protein-3" FEBS LETTERS, vol. 395, no. 2-3, 1996,  
pages 277-282.

US 5739103 A, 14.04.98.

WO 03083059 A, 09.10.03.

(57) 1. Застосування поліпептиду, що містить  
послідовність SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 4,  
як лікарського засобу для лікування автоімун-  
них, запальних або інфекційних захворювань.2. Застосування за п.1, яке відрізняється  
тим, що згаданий поліпептид містить констан-  
тну ділянку важкого ланцюга людського імуног-  
лобуліну.3. Застосування поліпептиду, що містить пос-  
лідовність SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 4, для  
виготовлення лікарського засобу для лікування  
автоімунних, запальних або інфекційних захво-  
рювань.4. Застосування за п.3, яке відрізняється  
тим, що згаданий поліпептид містить констан-  
тну ділянку важкого ланцюга людського імуног-  
лобуліну.5. Застосування за п.1 або 3, яке відрізняється  
тим, що згадане захворювання вибрано з гру-  
пи, яку складають: артрит, ревматоїдний ар-  
трит (RA), псоріазний артрит, остеоартрит, си-  
стемний червоний вовчак (SLE), системний  
склероз, склеродермію, поліміозит, гломерулонеф-  
рит, фіброз, алергічні хвороби або стани гіпер-  
чутливості, дерматит, астму, хронічне обстру-  
ктивне захворювання легень (COPD),  
запальну хворобу кишечника (IBD), хворобу  
Крона, виразковий коліт, розсіяний склероз,  
рак, септичний шок, вірусні інфекції, ВІЛ,  
трансплантацію, запалення дихальних шля-  
хів, реакцію "трансплантат проти хазяїна"  
(GVHD) і атеросклероз.6. Застосування за п.5, яке відрізняється тим,  
що захворюванням є розсіяний склероз.7. Гібридний поліпептид, утворений послідовніс-  
тю SEQ ID NO: 2 та константною ділянкою  
важкого ланцюга людського імуноглобуліну,  
так що гібридний поліпептид має послідовність  
SEQ ID NO: 5.8. Послідовність нуклеїнової кислоти, що ко-  
дує гібридний поліпептид, який має послідов-  
ність SEQ ID NO: 5.9. Спосіб одержання гібридного поліпептиду за  
п.7, який включає:а) клонування послідовності нуклеїнової кислоти,  
що кодує зрілий CCL2-P8A у векторі експресії, зли-  
тому з послідовністю нуклеїнової кислоти, що ко-  
дує сигнальну послідовність людського CCL2, на її  
5' кінці, і послідовністю нуклеїнової кислоти, що  
кодує константну ділянку (сегмент 243-474) важко-  
го ланцюга лямбда людського імуноглобуліну  
IgG1, на її 3' кінці;b) трансформування лінії клітин CHO або HEK293  
одержаним вектором;c) відбирання клонів, що стабільно експресують і  
секретують рекомбінантний гібридний білок, що  
має CCL2-P8A на N-кінці і послідовність IgG1 на C-  
кінці;d) очищення гібридного білка з культурального  
середовища.

(13) C2

(11) 91820

(19) UA

10. Фармацевтична композиція, яка містить фармацевтично прийнятний носій та поліпептид, вибраний з групи, яку складають:

- a) CCL2-P8A (послідовність SEQ ID NO: 2);
  - b) CCL2\*-P8A (послідовність SEQ ID NO: 4);
  - c) активний мутант (a) або (b); або
  - d) поліпептид, що містить (a), (b) або (c) і амінокислотну послідовність, що належить іншій білковій послідовності, відмінній від згаданого хемокіну.
11. Фармацевтична композиція за п.10, яка **відрізняється** тим, що згаданий поліпептид має форму

активної фракції, попередників, солі, похідної, комплексу або кон'югату.

12. Застосування поліпептиду, вибраного з групи:

- a) CCL2-P8A (послідовність SEQ ID NO: 2);
- b) CCL2\*-P8A (послідовність SEQ ID NO: 4);
- c) активний мутант (a) або (b); або
- d) поліпептид, що містить (a), (b) або (c) і амінокислотну послідовність, що належить іншій білковій послідовності, відмінній від згаданого хемокіну; для виготовлення лікарського засобу для лікування автоімунних, запальних або інфекційних захворювань.

Цей винахід стосується нових способів терапевтичного застосування різновидів хемокінів і, зокрема, людського хемокіну CCL2.

Хемокіни представляють собою невеликі секретовані передзапальні білки, які опосередковують спрямовану міграцію лейкоцитів із крові до місця пошкодження. У залежності від положення консервативних цистеїнів, що характеризують це сімейство білків, сімейство хемокінів, у структурному відношенні, може бути підрозділеним на C, C-C, C-X-C і C-X<sub>3</sub>-C хемокіни, які зв'язуються з рядом мембранних рецепторів (Баджоліні М. (Baggiolini M.) та інші, 1997; Фернандес Е.Дж. (Fernandez E.J.) і Лоліс Е. (Lolis E.), 2002).

Ці мембранні рецептори, усі з яких є сполученими із семиспиральним G білком, надають можливість хемокінам чинити свою біологічну активність на клітини-мішені, які можуть представляти специфічні комбінації рецепторів, у залежності від свого статусу та/або типу. Фізіологічні ефекти хемокінів є наслідком складної та інтегрованої системи одночасних взаємодій: згадані рецептори часто мають лігандну специфічність, що взаємно перекривається, завдяки чому один рецептор може зв'язувати різні хемокіни, так само як і один хемокін може зв'язуватись із різними рецепторами.

Хемокіни, як правило, продукуються на ділянці пошкодження і викликають міграцію та активацію лейкоцитів, тобто відіграють фундаментальну роль у запальних, імунних, гомеостатичних, гемопоетичних та ангіогенних процесах. Незважаючи навіть на існування потенційних недоліків у застосуванні хемокінів у ролі терапевтичних агентів (зокрема, схильність до агрегування та безладного зв'язування), ці молекули вважаються добрими мішенями-"кандидатами" для терапевтичного втручання у захворювання, що пов'язуються з такими процесами, шляхом інгібування специфічних хемокінів та їхніх рецепторів такою мірою, щоб запобігати надмірному рекрутуванню та активації лейкоцитів (Баджоліні М. (Baggiolini M.), 2001; Летшер П. (Loetscher P.) і Кларк-Льюїс І. (Clark-Lewis I.), 2001; Годессарт Н. (Godessart N.) і Кункель С.Л. (Kunkel S.L.), 2001).

Результати досліджень взаємозв'язку між структурою і активністю вказують на те, що хемокіни мають дві головні ділянки взаємодії зі своїми рецепторами, а саме гнучку амінокінцеву ділянку і

конформаційно жорстку петлю, яка знаходиться за другим цистеїном. Вважають, що хемокіни "стикуються" з рецепторами за допомогою петльової ділянки, і цей контакт, як гадають, полегшує зв'язування амінокінцевої ділянки, наслідком чого є активація рецептора. Важливість амінокінцевої ділянки була також продемонстрована випробуванням природних і синтетичних хемокінів, згадана ділянка у яких була модифікована або скорочена. Ця обробка, після протеолітичного розщеплення, мутагенезу або хімічної модифікації амінокислот, може активізувати ці молекули або позбавити їх активності, з одержанням сполук з агоністичною та/або антагоністичною активністю. Таким чином, хемокіни зі специфічними модифікаціями амінокінцевої ділянки мають терапевтичний потенціал у відношенні запальних та автоімунних захворювань (Шварц (Schwarz) і Уеллс (Wells), 1999).

CCL2, відомий також як хемоатрактантний білок моноцитів 1 (MCP-1) або фактор хемотаксису і активації моноцитів (MCAF), був ідентифікований як такий, що відіграє центральну роль у запаленні, оскільки має здатність до стимулювання рекрутингу моноцитів і лімфоцитів у відповідь на сигнали про пошкодження та інфекцію у разі різних запальних захворювань, різних типів пухлин, серцевого алотрансплантата, СНІДу та туберкульозу (Йошімура Т. (Yoshimura T.) та інші, 1989; Гу Л. (Gu L.) та інші, 1999). Фізіологічна активність, пов'язана з CCL2, екстенсивно досліджувалась на трансгенних тваринах, що надало можливість продемонструвати, що цей хемокін контролює не лише рекрутинг моноцитів у моделях запалення, але також і експресію цитокінів, пов'язану з реакціями Т-клітин-хелперів та початковою стадією атеросклерозу (Гу Л. (Gu L.) та інші, 2000; Гослінг Дж. (Gosling J.) та інші, 1999; Лу Б. (Lu B.) та інші, 1998).

Щодо структури, CCL2 складається з N-кінцевої петлі та бета-складки, яку на C-кінці накриває альфа-спіраль, і утворює гомодимери, незважаючи на те, що за певних експериментальних умов його виявляли у формі мономеру (Хандел Т. (Handel T.) та інші, 1996; Кім К.С. (Kim K.S.) та інші, 1996; Любковські Дж. (Lubkowski J.) та інші, 1997). Як і щодо багатьох інших хемокінів, літературні джерела надають багато прикладів досліджень

залежності "структура-активність", при проведенні яких одержували мутанти CCL2 шляхом експресії різновидів зі скороченою N-кінцевою ділянкою або з моносайтовою заміною для визначення ролі видалених або замінених амінокислот у пов'язаній з CCL2 зв'язувальній активності та інших властивостях (Гонг Дж. (Gong J.) і Кларк-Льюїс І (Clark-Lewis I.), 1995; Жанг І. (Zhang Y.) та інші, 1996; Стейц С.А. (Steitz S.A.) та інші, 1998; Гу Л. (Gu L.) та інші, 1999; Хеммеріх С (Hemmerich S.) та інші, 1999; Сіт Б.Т. (Seet B.T.) та інші, 2001).

Зокрема, досліджували роль димеризації у зв'язуванні та активації рецепторів CCL2. Було показано, що різні мутації на кінцевій ділянці, які ускладнюють димеризацію, можуть змінити деякі активності CCL2, зокрема, рецепторзв'язувальну спорідненість, стимуляцію хемотаксису, інгібування аденілатциклази і стимуляцію припливу кальцію (Паавола К. (Paavola C.) та інші, 1998). У той час як один із мутантів, описаних Паавола, який у цьому описі було названо Р8А\*, не димеризується, однак зберігає вихідну активність і ефективність, було показано, що інший облігатний мономерний мутант, описаний Паавола, який у цьому описі було названо Y13A\*, має у сто разів слабкішу зв'язувальну спорідненість *in vitro*, є набагато слабшим інгібітором аденілатциклази і стимулятором припливу кальцію *in vitro*, і є неспроможним стимулювати хемотаксис у культурі клітин. Подібно Y13A\*, мутант [1+9-76] MCP-1 (різновид CCL2, якому бракує залишків 2-8), антагонізує активності CCL2 *in vitro*.

Зв'язувальні властивості мутанта CCL2, що містить заміну Р8А, досліджувались також на експериментальній моделі, основу якої становить розпізнавання вірусного хемокінзв'язувального білка МЗ, з демонстрацією ефективного зв'язування цього вірусного білка зі згаданим мутантом CCL2 (Александр Дж.М. (Alexander J.M.) та інші, 2002). Більше того, було показано, що мономерні різновиди хемокінів, наприклад, CCL2-Р8А, є позбавленими активності *in vivo*, хоча повною мірою зберігають активність і не відрізняються від димерної форми *in vitro* (Праудфут А. (Proudfoot A.) та інші, 2003).

Приклади мутантів CCL2, які містять залишки, що не впливають на димеризаційний профіль кінцевого білка, уже були описані у літературі як такі, що ведуть до одержання молекул з антагоністичними властивостями відносно CCL2 (патент США №5739103, WO 03/84993). Відомий рівень техніки, однак, не вказує на те, що мутант конкретного хемокіну, зокрема, мутант CCL2, що є облігатним мономером унаслідок моносайтової заміни (із залученням, наприклад, проліну), може діяти, як антагоніст хемокіну.

Несподівано встановили, що різновиди гомодимеротвірних хемокінів, наприклад, CCL2, що мають моноамінокислотну заміну на ділянці димеризації, яка змінює конфігурацію водневих зв'язків, наслідком чого є одержання облігатного мономеру, який зв'язується з рецептором і має агоністичні властивості *in vitro*, можуть антагонізувати природні хемокіни і і мають протизапальну активність *in vivo*.

Різновиди, опис яких наводиться, є придатними як лікарський засіб. Поліпептиди, що містять ПОСЛІДОВНІСТЬ №2, та поліпептиди, що містять ПОСЛІДОВНІСТЬ №2 з додатковою мутацією ізольцину у положенні 64 ПОСЛІДОВНОСТІ №2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ №4), є придатними як лікарські засоби.

Різновиди, опис яких наводиться, є придатними як лікарські засоби для лікування аутоімунних, запальних або інфекційних захворювань. Поліпептиди, що містять ПОСЛІДОВНІСТЬ №2, та поліпептиди, що містять ПОСЛІДОВНІСТЬ №2 з додатковою мутацією ізольцину у положенні 64 ПОСЛІДОВНОСТІ №2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ №4), є придатними як лікарські засоби для лікування аутоімунних, запальних або інфекційних захворювань. За одним із прикладів, поліпептиди, що містять ПОСЛІДОВНІСТЬ №2, та поліпептиди, що містять ПОСЛІДОВНІСТЬ №2 з додатковою мутацією ізольцину у положенні 64 ПОСЛІДОВНОСТІ №2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ №4), є придатними як лікарські засоби для лікування розсіяного склерозу.

Різновиди, опис яких наводиться, є додатково придатними у способах лікування аутоімунних, запальних та інфекційних захворювань. Такі способи включають введення ефективної кількості мономерного різновиду відповідно до цього винаходу, де згаданий різновид є наслідком щонайменше моноамінокислотної заміни, що змінює конфігурацію водневих зв'язків на ділянці димеризації згаданого хемокіну. Прикладами таких мономерних різновидів, які можуть застосовуватись у таких способах, є: а) поліпептид, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №2; b) поліпептид, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4; c) активний мутант а) або b); d) поліпептид, що містить а), b) або c) і амінокислотну послідовність, що належить іншому білку, окрім згаданого хемокіну; а також відповідні молекули у формі їх активних фракцій, попередників, солей, похідних, комплексів або кон'югатів.

Цей винахід додатково включає фармацевтичні композиції, до складу яких входить поліпептид, який містить облігатні мономерні антагоністичні різновиди хемокіну відповідно до цього винаходу.

Цей винахід додатково охоплює гібридні білки, що містять облігатний мономерний антагоністичний різновид хемокіну, опис якого наведено, злитий з нехемокінною білковою послідовністю, наприклад, амінокислотною ПОСЛІДОВНІСТЮ №2, злиною з константною ділянкою важкого ланцюга імуноглобуліну людини (ПОСЛІДОВНІСТЬ №5). Цей винахід додатково охоплює способи одержання таких гібридних білків.

Цей винахід додатково охоплює способи обслідування з метою виявлення облігатних мономерних антагоністичних різновидів хемокінів, опис яких наведено, які включають:

а) здійснення моносайтових мутацій CCL2, які блокують здатність останнього до димеризації;

б) ідентифікування згаданих різновидів, які зв'язуються з рецептором і демонструють агоністичні властивості *in vitro*;

с) ідентифікування згаданих різновидів із групи, ідентифікованої у вищенаведеному пункті (b),

що додатково характеризуються як такі, що інгібують рекрутинг клітин перитонеального ексудату.

Інші особливості та переваги цього винаходу будуть зрозумілими з наведеного нижче докладного опису.

Фіг.1: Амінокислотні послідовності людського зрілого CCL2 (залишки 24-99, номер депонування у банку даних SWISSPROT P13500; ПОСЛІДОВНІСТЬ №1), зрілого CCL2-P8A (ПОСЛІДОВНІСТЬ №2), зрілого CCL2\* (ПОСЛІДОВНІСТЬ №3), зрілого CCL2\*-P8A (ПОСЛІДОВНІСТЬ №4). Мутація ізолейцину у положенні 64 (M64I) обведена рамкою у CCL2\* і CCL2\*-P8A; відповідна мутація P8A виділена жирним шрифтом і підкреслена.

Фіг.2: Графік порівняння активності рекрутування клітин рекомбінантним людським CCL2 і CCL2-P8A з вихідним рівнем у аналізі рекрутування клітин перитонеального ексудату.

Фіг.3: Графік, який показує дозозалежну інгібувальну активність CCL2-P8A у аналізах рекрутування клітин перитонеального ексудату із застосуванням двох різних індукторів: CCL2 (A) або тіогліколяту (B); результати порівнюють із вихідним рівнем, негативним контролем (лише носій, фізіологічний розчин) і позитивним контролем, дексаметазоном (Dex; лише у B).

Фіг.4: Графік, який показує інгібувальну активність CCL2-P8A у аналізі індукованого овальбуміном запалення легень; результат порівнюють із вихідним рівнем і негативним контролем (фізіологічний розчин).

Фіг.5: Графік, який показує ефективність CCL2-P8A щодо зниження клінічної оцінки у балах у тварин, на яких моделюється розсіяний склероз, який називають EAE (експериментальний автоімунний енцефаломієліт), у разі, коли тварини мають слабкий перебіг захворювання з низькою клінічною оцінкою у балах (не більше за 2; A) або тяжкий перебіг із високою клінічною оцінкою у балах (щонайменше 3; B); наведені дані порівнюють із даними, які одержали у разі застосування лише носія (негативний контроль) або позитивного контролю для моделі EAE (мишачий бета-інтерферон); кількість зірок під кожним графіком вказує рівень статистичної значущості ефекту, що спостерігався, у разі порівняння з негативним контролем у кожній часовій точці (\* означає  $p < 0,05$ , \*\* означає  $p < 0,01$  і \*\*\* означає  $p < 0,001$ , як обчислено за допомогою дисперсійного аналізу за критерієм Фішера).

Фіг.6: Графік, який показує інгібувальну активність CCL2-P8A при введенні у різних дозах тваринам, на яких моделювали шкірне запалення (індуковане DNFB (2,4-динітрофторбензол) запалення вуха сенсibilізованих мишей); вплив CCL2-P8A на об'єм напухання вуха після обробки і порівняння його з такими контролями: тварини, які не сенсibilізувались, але яким на 5 день вводили DNFB (A); сенсibilізовані тварини, яким вводили DNFB, але обробляли лише носієм (B); і тварини, яким вводили дексаметазон (Dex; вводили таким самим чином, що і CCL2-P8A). Об'єми визначали на 6 день (день після обробки і введення).

Фіг.7: Альтернативні форми CCL2-P8A, які можна одержати шляхом додання та/або заміни однієї/багатьох амінокислот (A) або злиття із залиш-

ками 243-474 важкого ланцюга лямбда людського імуноглобуліну IgG1 (B; сигнальна послідовність CCL2 підкреслена двічі; підкреслено зрілий CCL2-P8A).

Приймаючи до уваги вищенаведені дані відомого попереднього рівня техніки, не існує свідчень того, що різновид CCL2, який одержують шляхом щонайменше моноамінокислотної заміни на ділянці димеризації, яка змінює конфігурацію водневих зв'язків, унаслідок чого з рецептором зв'язується облігатний мономер, що має агоністичні властивості *in vitro*, може антагонізувати CCL2 *in vivo* і, взагалі, може інгібувати рекрутинг клітин та/або запальні реакції.

Моноамінокислотна заміна у людського зрілого CCL2, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, відбувається у положенні 8 і полягає, зокрема, у заміні проліну у положенні 8 на аланін. Ці різновиди не містять додаткової мутації у положенні 9, 10 або 13 людського зрілого CCL2.

Прикладом вищеописаних заміни є мономерний різновид зрілої форми CCL2, який називають CCL2-P8A, що може експресуватись із включенням однієї заміни проліну у положенні 8 на аланін (ПОСЛІДОВНІСТЬ №2) або з включенням додаткової заміни (що поліпшує експресію білка) метіоніну у положенні 64 на ізолейцин (ПОСЛІДОВНІСТЬ №4). Завдяки заміні проліну 8 на аланін (амінокислота, що має іншу орієнтацію хімічної групи, яка, можливо, утворює водневі зв'язки), одержують різновид CCL2, що діє як облігатний мономер. CCL2-P8A і CCL2\*-P8A можуть вважатись молекулою, що має еквіваленту активність.

Варіанти фармацевтичного застосування, способи і композиції, які можуть у подальшому передбачатись для цих специфічних облігатних мономерних різновидів CCL2, які називають CCL2-P8A і CCL2\*-P8A, можуть також передбачатись для будь-якого іншого облігатного мономерного різновиду CCL2 або інших хемокинів, які у природній формі є активними як димери, які одержують таким самим чином. Ці мутанти повинні мати антагоністичні та інгібувальні властивості проти природного хемокину, подібні до відповідних характеристик CCL2-P8A і CCL2\*-P8A, і, завдяки цьому, вони повинні мати медичну придатність.

Одним з аспектів цього винаходу є застосування облігатного мономерного різновиду гомодимеротвірного хемокину, наприклад, CCL2, який, як відомо, є терапевтичною мішенню при різних захворюваннях, наприклад, автоімунних, запальних або інфекційних захворюваннях. Такі різновиди одержують шляхом щонайменше моноамінокислотної заміни, яка змінює конфігурацію водневих зв'язків на ділянці димеризації, наслідком чого є одержання облігатного мономеру, який зв'язується з рецептором і має агоністичні властивості *in vitro* і антагоністичні властивості *in vivo*, як активного інгредієнта фармацевтичної композиції, зокрема, для лікування або запобігання автоімунних, запальних або інфекційних захворювань. Ці *in vivo* антагоністичні властивості можуть стати очевидними у аналізах, що надають можливість визначення таких властивостей, як вплив на рекрутинг клітин у очеревині після індукції запальною молекулою

(хемокіном, наприклад, самим CCL2, тіогліколятом або овальбуміном).

Облігатний мономерний різновид можна одержати шляхом моноамінокислотної заміни на ділянці димеризації, що змінює конфігурацію водневих зв'язків. Відповідно до варіанта, якому віддається більша перевага, оскільки добре відомо, що пролін є саме тією амінокислотою, яка відіграє особливо важливу роль при утворенні стереоспецифічних водневих зв'язків, залучених до утворення білкових комплексів, наприклад, гомодимерів, моноамінокислотою заміною повинна бути заміна проліну на амінокислоту, що не є проліном. За альтернативним варіантом, моно амінокислотою заміною повинна бути заміна амінокислоти, що не є проліном, на пролін, наслідком чого буде зміна стереоспецифічності водневих зв'язків.

До альтернативних форм мономерних різновидів гомодимеротвірних хемокінів, визначених вище, які можуть застосовуватись як активні інгредієнти у фармацевтичних композиціях, належать:

a) активний мутант; або

b) поліпептид, що містить згаданий різновид або згаданий активний мутант, і амінокислотну послідовність, що належить до послідовності іншого білка, окрім згаданого хемокіну.

Термін "активний" означає, що такі альтернативні сполуки повинні зберігати функціональні особливості мутантів CCL2 цього винаходу, тобто повинні антагонізувати CCL2 *in vivo* і інгібувати рекрутинг клітин та/або запальні реакції.

Облігатний мономерний антагоніст хемокіну, як визначено у цьому описі, як активна сполука відповідно до цього винаходу, може мати форму своїх активних фракцій, попередників, солей, похідних, комплексів або кон'югатів.

Ці альтернативні сполуки включають молекули зі змінами у послідовності мономерних різновидів гомодимеротвірних хемокінів, які не впливають на основні характеристики, які розкриваються у цьому описі. Наприклад, CCL2\*-P8A одержали на основі мутанта CCL2 (CCL2-M641 або CCL2\*), який зберігає нормальну активність CCL2, але має поліпшені властивості відносно рекомбінантної експресії.

Антагоністичні властивості мономерних різновидів гомодимеротвірних хемокінів, визначених вище, як приклад яких у цьому описі наведено CCL2-P8A (антагоніст CCL2), можуть бути збережені або навіть підсилені у активних мутантах. Ця категорія молекул включає природні або синтетичні аналоги згаданої послідовності, де один або декілька амінокислотних залишків були додані, видалені або замінені, за умови, що вони демонструють таку саму біологічну активність, визначену у цьому винаході, на порівнянних або вищих рівнях, як визначається засобами, відомими у цій галузі і розкритими у наведених нижче Прикладах.

Природними аналогами вважаються білки з послідовностями, відповідними послідовностям людських хемокінів, виявлені у інших організмах, наприклад, мишачий CCL2 (депонований у SWISSPROT під №P10148). Штучними аналогами мономерних різновидів гомодимеротвірних хемокінів вважаються поліпептиди, одержані відомими методами хімічного синтезу та/або сайтспрямова-

ного мутагенезу, генно-інженерними методами на рівні кодувальних послідовностей ДНК (наприклад, перестановка ДНК, проявлення/відбір у фагах), методами комп'ютеризованого конструювання або будь-якими іншими відомими придатними методами, які забезпечують одержання кінцевого набору по суті відповідних мутованих або скорочених пептидів чи поліпептидів, які можуть бути звичайним шляхом одержані і перевірені пересічним фахівцем у цій галузі за допомогою методик, представлених відомим рівнем техніки та у наведених нижче Прикладах.

Специфічні штучні мутанти можуть, наприклад, мати одну або декілька амінокислот, які замінюються у інших положеннях CCL2 і які визнаються придатними для одержання антагоністів CCL2 (WO 03/84993).

Відповідно до цього винаходу, змінами активних мутантів, яким віддається перевага, є широко відомі "консервативні" або "безпечні" заміни, які залучають неосновні залишки. Консервативними амінокислотними замінами є заміни на амінокислоти, що мають достатньо подібні хімічні властивості, для збереження структури і біологічної функції згаданої молекули. Зрозуміло, що у вищевизначених послідовностях можуть також здійснюватись вставки та видалення амінокислот без зміни їхньої функції, зокрема, якщо згадані вставки або видалення залучають лише декілька амінокислот, наприклад, менше десяти, а відповідно до варіанта, якому віддається перевага, менше трьох, без видалення або зміщення амінокислот, які є критичними для функціональної конформації білка або пептиду.

Література надає багато моделей, за допомогою яких вибір заміни консервативних амінокислот може здійснюватись на основі статистичних та фізико-хімічних досліджень послідовностей та/або структури природного білка (Рогов С.І. (Rogov S.I.) і Некрасов А.Н. (Nekrasov A.N.), 2001). Експерименти з конструювання білків показали, що застосування специфічних піднаборів амінокислот може забезпечити одержання активних білків, що впорядковано укладаються, надаючи тим самим допомогу у класифікації "синонімічних" амінокислотних заміни, які можуть із більшою легкістю адаптуватись у структурі білка і які можуть застосовуватись для виявлення функціональних і структурних гомологів і паралогів (Мерфі Л.Р. (Murphy L.R.) та інші, 2000). Синонімічними групами амінокислот і синонімічними групами, яким віддається більша перевага, є групи, наведені у Таблиці І. Наприклад, заміна метіоніну 64 на ізолейцин, спільний для CCL2\* і CCL2\*-P8A, була вибрана із застосуванням подібних критеріїв.

Додатковою групою активних мутантів мономерних різновидів гомодимеротвірних хемокінів, визначених вище, є пептидні міметики (які також називають пептидоміметиками), у яких природа пептиду або поліпептиду була хімічно модифікована на рівні амінокислотних бічних ланцюгів, амінокислотної хіральності та/або пептидного остову. Вважають, що ці зміни нададуть можливість одержання мономерних різновидів гомодимеротвірних хемокінів, що мають подібні або по-

ліпшені властивості з точки зору одержання, активності та/або фармакокінетичних особливостей.

Наприклад, коли проблемою є сприйнятливості пептиду до розщеплення пептидазами після введення суб'єкту, заміна особливо сприйнятливо-го пептидного зв'язку на нерозщеплювальний пептидний міметик може зробити пептид більш стійким і, таким чином, більш придатним у ролі терапевтичного агента. Подібним чином, заміна L-амінокислотного залишку є стандартним способом надання пептиду меншої чутливості до протеолізу і, врешті-решт, більш подібним до інших органічних сполук, окрім пептидів. Придатними також є амінокінцеві блокувальні групи, наприклад, трет-бутоксикарбоніл, ацетил, тейл, сукциніл, метоксисукциніл, суберил, адипіл, азелаіл, дансил, бензил-локсикарбоніл, фторенілметоксикарбоніл, метоксизелаіл, метоксидипіл, метоксисуберил і 2,4-динітрофеніл. У цій галузі відомо багато інших модифікацій, що забезпечують підвищену ефективність, тривалішу активність, легкість очищення та/або підвищений період напіввиведення (WO 02/10195; Віллен М. (Villain M.) та інші, 2001).

Альтернативними "синонімічними" групами, яким віддається перевага, для амінокислот, включених до пептидних міметиків, є групи, наведені у Таблиці II. Невичерпний перелік амінокислотних похідних включає також аміноізомасляну кислоту (Aib), гідроксипролін (Hyp), 1,2,3,4-тетрагідроізохінолін-3-СООН, індолін-2-карбонову кислоту, 4-дифторпролін, L-тіазолідин-4-карбонову кислоту, L-гомопролін, 3,4-дегідропролін, 3,4-дигідроксифеніланін, циклогексилгліцин і фенілгліцин.

Термін "амінокислотна похідна" означає амінокислоту або амінокислотоподібну хімічну складову, яка не є однією з 20 генетично закодованих природних амінокислот. Зокрема, амінокислотна похідна може містити замінені або незамінні алкільні складові, які можуть бути лінійними, розгалуженими або циклічними і можуть містити один або декілька гетероатомів. Амінокислотні похідні можуть також одержуватись *de novo* або з комерційних джерел (фірма Calbiochem-Novabiochem AG, Швейцарія; фірма Bachem, США).

У цій галузі добре відомі способи синтезування і одержання як пептидних міметиків, так і непептидних міметиків (Грубі В.Дж. (Hruby V.J.) і Бале П.М. (Bale P.M.), 2000; Голєбіовські А. (Golebiowski A.) та інші, 2001). У літературі розкриваються також різні методи включення неприродних амінокислот до білків, із застосуванням як *in vitro*, так і *in vivo* трансляційних систем, для зондування та/або поліпшення структури і функції останніх (Догерті Д.А. (Dougherty D.A.) та інші, 2000).

Цей винахід розкриває застосування мономерних різновидів гомодимеротвірних хеомінів та їхніх активних мутантів, як активних складових фармацевтичних композицій, а також білків, що містять їхню амінокислотну послідовність та амінокислотну послідовність, що належить до іншої білкової послідовності, окрім згаданих хеомінів. Остання згадана гетерологічна послідовність повинна забезпечувати додаткові властивості без порушення фармацевтичної придатності. Прикла-

дами таких додаткових властивостей є полегшена процедура очищення, триваліший період напіввиведення з рідин організму або позаклітинна локалізація. Остання згадана властивість має особливе значення для розробки специфічної групи гібридних або химерних білків, включених до вищевизначеного визначення, оскільки вона допомагає цим мономерним різновидам локалізуватись у просторі, де не лише полегшується виділення і очищення цих пептидів, але і де відбувається природна взаємодія CCL2 з іншими молекулами.

У літературі широко обговорюється конструювання складових, лігандів та лінкерів, а також способів і методик конструювання, очищення, виявлення і застосування гібридних білків (Нільссон Дж. (Nilsson J.) та інші, 1997; "Applications of chimeric genes and hybrid proteins" Methods Enzymol, том 326-328, Academic Press, 2000; WO 01/77137). Додатковими білковими послідовностями, які можуть застосовуватись для одержання альтернативних форм цих облігатних мономерних різновидів гомодимеротвірних хеомінів, як визначено вище, є послідовності позаклітинних ділянок мембранного білка, константної ділянки імуноглобуліну (Fc ділянка), ділянок мультимеризації, позаклітинних білків, сигнальних пептидовмісних білків, білків, що містять сигнал екскреції. Вибір однієї або декількох із цих послідовностей для злиття з мономерним різновидом залежить від конкретного застосування згаданого агента. Коли додаткова білкова послідовність, як у разі послідовності позаклітинних білків, що містять сигнал екскреції або сигнальний пептид, забезпечує секретування мономерного різновиду до позаклітинного простору, згаданий агент може з більшою легкістю збиратись і очищатись із культивованих клітин для додаткової обробки або, за альтернативним варіантом, клітини можуть застосовуватись або вводитись безпосередньо.

Облігатні мономерні різновиди гомодимеротвірних хеомінів, визначені вище, можуть також застосовуватись у інших формах, яким віддається перевага, наприклад, як активні фракції, попередники, солі, похідні, кон'югати або комплекси.

Термін "фракція" означає будь-який фрагмент поліпептидного ланцюга самої сполуки, самостійно або у комбінації зі спорідненими молекулами або залишками, зв'язаними з нею, наприклад, залишками цукрів або фосфатів, або агрегати вихідного поліпептиду або пептиду. Такі молекули можна одержати також за допомогою інших модифікацій, які, як правило, не змінюють вихідної послідовності, наприклад, шляхом *in vivo* або *in vitro* хімічної дериватизації пептидів (ацетилювання або карбоксилування), модифікацій, які здійснюються шляхом зміни профілю фосфорилювання (введення залишків фосфотирозину, фосфосерину або фосфотreonіну) або глікозилювання (шляхом піддання пептиду дії ферментів, які впливають на глікозилювання, наприклад, глікозилювальних або деглікозилювальних ферментів ссавців) пептиду під час його синтезування або обробки чи на додаткових стадіях обробки.

"Попередниками" є сполуки, які можуть перетворюватись на сполуки цього винаходу завдяки

метаболический або ферментативний обробці перед або після введення до клітин або до організму.

Термін "солі" у цьому описі означає як солі карбоксильних груп, так і одержані доданням кислоти солі аміногруп пептидів, поліпептидів або їх аналогів відповідно до цього винаходу. Солі карбоксильної групи можна одержати за допомогою способів, відомих у цій галузі, і вони включають неорганічні солі, наприклад, солі натрію, кальцію, амонію, заліза або цинку тощо, і солі, які одержують за допомогою органічних основ, наприклад, за допомогою амінів, наприклад, триетаноламіну, аргініну або лізину, піперидину, прокаїну тощо. Солі, одержані доданням кислоти, включають, наприклад, солі, одержані за допомогою мінеральних кислот, наприклад, хлористоводневої кислоти або сірчаної кислоти, і солі, одержані за допомогою органічних кислот, наприклад, оцтової кислоти або щавлевої кислоти. Будь-яка з цих солей повинна мати активність по суті подібну до активності пептидів і поліпептидів цього винаходу або їхніх аналогів.

Термін "похідні", який застосовують у цьому описі, означає похідні, які можна одержати з функціональних груп, присутніх на бічних ланцюгах амінокислотних складових або на N- чи C-кінцевих групах, за відомими способами. До таких похідних належать, наприклад, складні ефіри або аліфатичні амідні карбоксильних груп і N-ацильні похідні вільних аміногруп або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп і утворюються з ацильними групами, наприклад, з алканойльними або ароїльними групами.

Придатні кон'югати або комплекси облігатних мономерних різновидів гомодимеротвірних хеомінів, визначених вище, можна одержати із застосуванням молекул і відомих у цій галузі способів взаємодії з рецептором або іншими білками (радіоактивні або флуоресцентні мітки, біотин), із поліпшенням терапевтичної ефективності (цитотоксичні агенти) або з поліпшенням агентів із точки зору ефективності доставки лікарського засобу, наприклад, поліетиленгліколем або іншими природними або синтетичними полімерами (Гарріс Дж.М. (Harris J.M.) і Чесе Р.Б. (Chess R.B.), 2003; Грінвалд Р.Б. (Greenwald R.B.) та інші, 2003; Піллаї О. (Pillai O.) і Панчагнупа Р. (Panchagnula R.), 2001). Залишки можуть застосовуватись для приєднання за умови, що вони мають бічні ланцюги, придатні для приєднання полімерів (тобто бічний ланцюг амінокислоти, що несе функціональну групу, наприклад, лізин, аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту, цистеїн, гістидин тощо). За альтернативним варіантом, залишок на цих ділянках може бути замінений іншою амінокислотою, що має бічний ланцюг, придатний для приєднання до полімеру. Окрім того, бічні ланцюги генетично закодованих амінокислот можуть піддаватись хімічному модифікуванню для приєднання полімерів або можуть застосовуватись штучні амінокислоти з придатними функціональними групами бічного ланцюга. Приєднання полімеру може відбуватись не лише до бічного ланцюга амінокислоти, що природно займає специфічне положення антагоніста або до бічного ланцюга природної або штучної

амінокислоти, яка замінює амінокислоту, яка природно займає специфічне положення антагоніста, але також і до вуглеводу або іншої складової, що є приєднаною до бічного ланцюга амінокислоти у цільовому положенні.

Придатні для цього полімери є біосумісними, а саме вони є нетоксичними для біологічних систем. Відомо багато таких полімерів. Такі полімери можуть бути гідрофобними або гідрофільними за своєю природою, піддаватись або не піддаватись біохімічному розкладу або характеризуватись комбінацією цих властивостей. До числа цих полімерів належать природні полімери (наприклад, колаген, желатин, целюлоза, гіалуронова кислота), а також синтетичні полімери (наприклад, поліефіри, поліортоефіри, поліангідріди). Прикладами гідрофобних полімерів, що не розкладаються, є полідиметилсилоксани, поліуретани, політетрафторетилен, поліетилен, полівінілхлориди і поліметилметакрилати. Прикладами гідрофільних полімерів, що не розкладаються, є полі(2-гідроксietилметакрилат), полівініловий спирт, полі(N-вінілпіролідон), поліалкілени, поліакриламід та їхні співполімери. Полімери, яким віддається перевага, містять, як послідовну структурну одиницю, етиленоксид, наприклад, поліетиленгліколь (PEG).

У способі приєднання, якому віддається перевага, застосовується комбінація синтезу пептидів і хімічного літування. За вигідним варіантом, приєднання водорозчинного полімеру буде здійснюватись за допомогою лінкера, що піддається біохімічному розкладу, зокрема, на амінокінцевій ділянці білка. Завдяки цій модифікації білок одержують у формі попередника (або "проліків"), який, після розкладу згаданого лінкера, виділяє білок без полімерної модифікації.

Як загальна методика, облігатні мономерні різновиди гомодимеротвірних хеомінів, визначених вище, можуть бути одержані за допомогою будь-якого відомого у цій галузі способу, у тому числі методами рекомбінантних ДНК і методами хімічного синтезу.

У багатьох книгах і оглядових статтях розкривають способи клонування і одержання рекомбінантних білків із застосуванням векторів і прокариотних (наприклад, *E. coli*) і еукаріотних клітин-хазяїв. Дивись, наприклад, деякі позиції із серії "A Practical Approach", опублікованої видавництвом Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).

Іншим варіантом здійснення цього винаходу є нуклеїновокислотна послідовність, що кодує облігатний мономерний різновид-антагоніст хеоміну, опис якої наводиться.

Послідовність ДНК, що кодує облігатні мономерні різновиди гомодимеротвірних хеомінів, може вводитись і лігуватись до відповідних епісомних або негомологічних інтеграційних векторів, які можуть вводитись до відповідних клітин-хазяїв будь-якими придатними способами (трансформація, трансфекція, кон'югація, злиття протопластів, електропорація, преципітація фосфатом кальцію,

пряма мікроін'єкція) для їх трансформації. Важливими факторами при виборі конкретного вектора на основі плазмід або вірусного геному є: легкість, з якою клітини-реципієнти, що містять згаданий вектор, можуть розпізнаватись і вибиратись із числа тих клітин-реципієнтів, які вектора не містять; кількість копій вектора, яка є бажаною у конкретного хазяїна; чи є необхідність у "переміщенні" вектора між клітинами-хазяями різних видів.

Вектори повинні уможливлювати експресію виділеного або гібридного білка, у тому числі антагоніста цього винаходу, у прокариотній або еукаріотній клітині-хазяїні під контролем регуляторних послідовностей ініціації/термінації транскрипції, які вибираються з числа таких, що є конститутивно активними або індукцибельними у згаданій клітині. Лінія клітин, суттєво збагачена такими клітинами, у подальшому може виділятися для одержання стабільної лінії клітин.

У разі хазяїв-еукаріот (наприклад, дріжджі, клітини комах або ссавців), можуть застосовуватись різні транскрипційні і трансляційні регуляторні послідовності, у залежності від природи хазяїна. Вони можуть бути одержані з вірусних джерел, наприклад, з аденовірусу, вірусу папіломи великої рогатої худоби, мавпячого вірусу тощо, де регуляторні сигнали пов'язані з конкретним геном, що має високий рівень експресії. Прикладами є ТК промотор вірусу герпесу, ранній промотор SV40, промотор gal4 гена дріжджів тощо. Можуть вибиратись такі регуляторні сигнали ініціації транскрипції, які забезпечують можливість репресії та активації, завдяки чому експресія генів може модулюватись. Клітини, які стабільно трансформувались введенням ДНК, можуть вибиратись також шляхом введення одного або декількох маркерів, які уможливають вибір клітин-хазяїв, що містять експресійний вектор. Згаданий маркер може також надавати фототрофності аутокотрофному хазяїну, резистентності до біоцидів, наприклад, антибіотиків, або важких металів, наприклад, міді тощо. Селективний маркерний ген може безпосередньо зв'язуватись з послідовностями гена ДНК, призначеними для експресії, або вводиться до тієї самої клітини шляхом котрансфекції. Для оптимального синтезу білків можуть знадобитись також додаткові елементи.

Клітини-хазяї можуть бути прокариотними або еукаріотними. Перевага віддається еукаріотним хазяям, наприклад, клітинам ссавців, наприклад, клітинам людини, мавпи, миші і клітинам яєчника китайського хом'ячка (CHO), оскільки вони забезпечують посттрансляційні модифікації білкових молекул, у тому числі правильне впорядковане укладання або глікозилювання на відповідних ділянках. Окрім того, дріжджові клітини можуть здійснювати посттрансляційні модифікації пептидів, у тому числі глікозилювання. Існує ряд методів рекомбінантних ДНК, у яких застосовують сильні промоторні послідовності і високу кількість копій плазмід, які можуть застосовуватись для продукування необхідних білків у дріжджах. Дріжджі розпізнають лідерні послідовності у клонуваних генних продуктах ссавців і секретують пептиди, що несуть лідерні послідовності (тобто передпептиди).

Для тривалого високоефективного продукування рекомбінантного поліпептиду, перевагу віддають стабільній експресії. Наприклад, лінії клітин, які стабільно експресують необхідний поліпептид, можуть бути трансформовані за допомогою експресійних векторів, які можуть містити сайт ініціювання реплікації вірусу та/або ендогенні експресійні елементи і селективний маркерний ген на тому самому або на окремому векторі. Після введення вектора, клітини можуть впродовж 1-2 днів культивуватись на збагаченому середовищі перед переключенням на селективне середовище. Ціллю селективного маркера є надання стійкості для відбору і його присутність забезпечує ріст і виділення клітин, які успішно експресують введені послідовності. Резистентні клони стабільно трансформованих клітин можуть розмножуватись за допомогою способів культивування клітин тканин, прийнятних для даного типу клітин. У подальшому лінія клітин, суттєво збагачена такими клітинами, може бути виділена для одержання стабільної лінії клітин.

У цій галузі відомі лінії клітин ссавців, доступні як хазяї для експресії. До них належить багато ліній іморталізованих клітин, доступних від Американської колекції типових культур (ATCC), у тому числі (але без обмеження) клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), HeLa, нирок хом'ячка (BHK), нирок мавпи (COS), C127, 3T3, BHK, HEK293, меланоми Боуза, злоякісної гепатоми людини (наприклад, Hep G2) і ряд інших ліній клітин. У разі бакуловірусної системи, матеріали для систем експресії бакуловірусних клітин/клітин ссавців є комерційно доступними у наборі, *inter alia*, у наборі "MaxBac" (фірма Invitrogen).

Прикладами технологій хімічного синтезу є твердофазний синтез і рідкофазний синтез. У разі твердофазного синтезу, наприклад, амінокислоту, що відповідає C-кінцю призначеного для синтезу пептиду, зв'язують із носієм, який є нерозчинним у органічних розчинниках, і пептидний ланцюг подовжують почерговим повторенням реакцій, під час проведення однієї з яких амінокислоти зі своїми аміногрупами і функціональними групами бічного ланцюга, захищеними придатними захисними групами, одна за одною конденсуються у порядку від C-кінця до N-кінця, а під час проведення другої, амінокислоти, зв'язані зі смолою або захисною групою аміногруп пептидів вивільнюються. Методи твердофазного синтезу підрозділяються, головним чином, на tBoc метод і Fmoc метод, у залежності від типу застосовуваної захисної групи. До типово застосовуваних захисних груп належать tBoc (іпрет-бутоксикарбоніл), Cl-Z (2-хлорбензилоксикарбоніл), Br-Z (2-бромбензилоксикарбоніл), Bzl (бензил), Fmoc (9-фторенілметоксикарбоніл), Mbh (4,4'-диметоксидибензилгідрил), Mtr (4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфоніл), Trt (тритил), Tos (тозил), Z (бензилоксикарбоніл) і C12-Bzl (2,6-дихлорбензил) для аміногруп; NO<sub>2</sub> (нітро) і Pmc (2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфоніл) для гуанідинових груп; і tBu (трет-бутил) для гідроксильних груп. Після синтезу необхідного пептиди, його піддають реакції відщеплення захисних груп і



відділяють від твердого носія. Згадану реакцію відділення пептиду можна здійснити за допомогою фториду водню або трифторметансульфонової кислоти у разі Вос методу і за допомогою трифтороцтової кислоти (TFA) у разі Fmoc методу. У літературі розкриваються повністю синтетичні CCL2 білки (Браун А. (Brown A.) та інші, 1996).

Очищення синтетичних або рекомбінантних мономерних різновидів гомодимеротвірних хеомокінів, визначених вище, може здійснюватись за будь-яким із відомих для цього методів, тобто за будь-якою традиційною методикою, що включає екстрагування, осадження, хроматографування, електрофорез тощо. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, додатковим методом очищення білка цього винаходу є афінна хроматографія із застосуванням моноклональних антитіл або афінних груп, які зв'язують цільовий білок і які продукуються і іммобілізуються на гелевій матриці, що знаходиться у колонці. Неочищені препарати, що містять білки, пропускають через колонку. Білок буде зв'язуватись у колонці гепарином або специфічним антитілом, у той час як домішки пройдуть через колонку. Після промивання білок вимивають із гелю шляхом зміни рН або іонної сили. За альтернативним варіантом, може застосовуватись HPLC (високоєфективна рідинна хроматографія). Елювання може здійснюватись із застосуванням розчинника на основі суміші води і ацетонітрилу, який широко застосовують для очищення білка.

Мономерний різновид гомодимеротвірного хеомокіну може застосовуватись у фармацевтичній композиції для лікування або запобігання аутоімунних, запальних або інфекційних захворювань. Зокрема, результати, наведені у прикладах, що стосуються тваринного моделювання розсіяного склерозу, показують, що ці мономерні різновиди можуть застосовуватись у фармацевтичній композиції для лікування або запобігання розсіяного склерозу.

Іншим аспектом цього винаходу є мономерний різновид гомодимеротвірного хеомокіну, де згаданий різновид є наслідком щонайменше моноамінокислотної заміни, яка змінює конфігурацію водневих зв'язків на ділянці димеризації згаданого хеомокіну, що застосовується як лікарський засіб.

Приклади таких різновидів розкриваються у цьому описі, як CCL2-P8A і CCL2\*-P8A. Однак опис цього винаходу надає можливість ідентифікації, продукування і випробування подібних молекул на основі послідовності і активності інших хеомокінів.

Зокрема, ці мономерні різновиди можуть бути вибрані з групи, яка включає:

- a) CCL2-P8A (ПОСЛІДОВНІСТЬ №2);
- b) CCL2\*-P8A (ПОСЛІДОВНІСТЬ №4);
- c) Активний мутант (a) або (b); або

d) Поліпептид, що містить (a), (b) або (c) і амінокислотну послідовність, що належить іншій білковій послідовності, окрім згаданого хеомокіну;

а також відповідні мономерні різновиди у формі їхніх активних фракцій, попередників, солей, похідних, комплексів або кон'югатів.

Іншим аспектом цього винаходу є фармацевтична композиція, що містить мономерний різно-

вид гомодимеротвірного хеомокіну, як активний інгредієнт, де згаданий різновид є наслідком щонайменше моноамінокислотної заміни, яка змінює конфігурацію водневих зв'язків на ділянці димеризації згаданого хеомокіну, наприклад, CCL2-P8A або CCL2\*-P8A, факультативно у формах, визначених вище (наприклад, активні мутанти, поліпептиди, що їх містять, або кон'югати), а також ДНК, що їх кодує або клітини, що їх експресують.

Фармацевтичні композиції відповідно до цього винаходу можуть містити придатні фармацевтично прийнятні носії, біологічно сумісні розчинники і домішки, що є придатними для введення тварині (наприклад, фізіологічний розчин) і, можливо, додаткові агенти (наприклад, наповнювачі, стабілізатори або розріджувачі), що полегшують включення активних сполук до препаратів, які можуть застосовуватись фармацевтично. Фармацевтичні композиції можуть виготовлятись будь-яким прийнятним шляхом для задоволення потреб способу введення. У літературі, наприклад, розкривають застосування біоматеріалів і інших полімерів для доставки лікарського засобу, а також різні способи і моделі оцінки конкретного способу введення (Люо Б (Luo B.) і Прествіч Г.Д. (Prestwich G.D.), 2001; Клелант Дж.Л. (Cleland J.L.), 2001).

"Ефективна кількість" означає кількість активного інгредієнта, що є достатньою для впливання на перебіг і тяжкість захворювання, наслідком чого є полегшення або ремісія такої патології. Ефективна кількість буде залежати від шляху введення і стану хворого.

"Фармацевтично прийнятний" означає будь-який носій, який не перешкоджає ефективності біологічної активності активного інгредієнта і не є токсичним для хазяїна, якому його вводять. Наприклад, для парентерального введення, вище-згаданим активним інгредієнтам може надаватись дозована лікарська форма для ін'єкцій у таких розчинниках, як фізіологічний розчин, розчин декстрози, сироватковий альбумін і розчин Рінгера-Локка. Носії можуть вибиратись з групи, яка включає крохмаль, целюлозу, тальк, глюкозу, лактозу, цукрозу, желатин, солод, рис, муку, крейду, силікагель, стеарат магнію, стеарат натрію, моностеарат гліцерину, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропіленгліколь, воду, етанол і різні масла (олії), у тому числі петролейного, тваринного, рослинного або синтетичного походження (арахісова олія, соєва олія, мінеральне масло, кунжутна олія).

Будь-який прийнятний спосіб введення може застосовуватись і визначатись фахівцями у цій галузі для встановлення бажаних рівнів активних інгредієнтів у крові. Наприклад, введення може здійснюватись різними парентеральними шляхами, наприклад, підшкірним, внутрішньовенним, внутрішньоієкційним, внутрішньом'язовим, внутрішньоочеревинним, інтраназальним, черезшкірним, пероральним або букальним шляхами. Парентеральне введення може здійснюватись ін'єкцією болюса, поступовим вливанням впродовж певного періоду часу або за допомогою пролонгованих лікарських форм, у тому числі шляхом ін'єкції речовини уповільненого всмоктування, за допомогою осмотичних насосів тощо для пролонгованого

введення поліпептиду з попередньо визначеною швидкістю, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, у дозованих лікарських формах, придатних для одноразового введення точних доз. Препарати для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини, суспензії і емульсії, що можуть містити додаткові агенти або наповнювачі, відомі у цій галузі, і можуть виготовлятися за звичайними методами. На додаток до цього, може вводитись суспензія активних сполук у вигляді відповідних масляних суспензій для ін'єкцій. Придатними ліпофільними розчинниками або носіями є жирні олії, наприклад, кунжутна олія, або синтетичні складні ефіри жирних кислот, наприклад, етилолеат або тригліцериди. Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити речовини, що підвищують в'язкість суспензії, наприклад, натрійкарбоксиметилцелюлозу, сорбіт та/або декстран. Факультативно суспензія може також містити стабілізатори. Фармацевтичні композиції включають придатні розчини для введення шляхом ін'єкції і містять від приблизно 0,01% до 99%, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, від приблизно 20% до 75% активної сполуки разом із наповнювачем. Композиції, які можуть вводитись ректальним шляхом, включають супозиторії.

Зрозуміло, що введена доза буде залежати від віку, статі, стану здоров'я та маси реципієнта, виду одночасного лікування, у разі його проведення, частоти лікування і природи необхідного ефекту. Доза буде підбиратись для індивідуального суб'єкта, як розуміється і визначається фахівцем у цій галузі. Загальна доза, необхідна для кожного лікування, може вводитись множинними дозами або разовою дозою. Фармацевтична композиція відповідно до цього винаходу може вводитись самостійно або у поєднанні з іншими лікарськими засобами, спрямованими проти цього стану або спрямованими на інші симптоми цього стану. Як правило, добова доза активного інгредієнта становить 0,01-100мг/кг маси тіла. Для досягнення бажаних результатів достатнім, як правило, є введення 1-40мг/кг на добу у вигляді невеликих доз лікарського засобу, що повторюються через певні проміжки часу, або у вигляді пролонгованої лікарської форми. Друге або подальші введення можуть здійснюватись у дозі, яка є такою самою, меншою або більшою за вихідну або попередньо введену індивіду дозу.

Іншою ціллю цього винаходу є спосіб лікування або запобігання автоімунних або запальних (наприклад, розсіяний склероз) чи інфекційних захворювань, який включає введення ефективної кількості мономерних різновидів гомодимеротвірних хемокинів, які є наслідком принаймні моноамінокислотної заміни, яка змінює конфігурацію водневих зв'язків на ділянці димеризації згаданого хемокину. Прикладами таких мономерних різновидів, які можуть застосовуватись у таких способах, є:

- a) CCL2-P8A (ПОСЛІДОВНІСТЬ №2);
- b) CCL2\*-P8A (ПОСЛІДОВНІСТЬ №4);
- c) Активний мутант (a) або (b);

d) Поліпептид, що містить (a), (b) або (c) і амінокислотну послідовність, що належить іншій білковій послідовності, окрім згаданого хемокину;

а також відповідні мономерні різновиди у формі їхніх активних фракцій, попередників, солей, похідних, комплексів або кон'югатів.

Необмежувальний перелік прикладів автоімунних, запальних або інфекційних захворювань, згаданих вище відносно застосування, варіантів і способів відповідно до цього винаходу, включає наведені нижче: артрит, ревматоїдний артрит (RA), псоріазний артрит, остеоартрит, системний червоний вовчак (SLE), системний склероз, склеродермію, поліміозит, гломерулонефрит, фіброз, алергічні хвороби або стани гіперчутливості, дерматит, астму, хронічне обструктивне захворювання легень (COPD), запальну хворобу кишечника (IBD), хворобу Крона, виразковий коліт, розсіяний склероз, рак, септичний шок, вірусні інфекції, ВІЛ, трансплантацію, запалення дихальних шляхів, реакцію "трансплантат проти хазяїна" (GVHD) і атеросклероз.

Терапевтичне застосування поліпептидів цього винаходу і споріднених реактивів може оцінюватись (з точки зору безпечності, фармакокінетики і ефективності) за допомогою аналізів *in vivo* та *in vitro* із застосуванням тваринних клітин, тканин і моделей (Коулман Р.А. (Coleman R.A.) та інші, 2001; Лі А.П. (Li A.P.), 2001; Methods Mol. Biol. том 138, "Chemokines Protocols", під редакцією Праудфут А. (Proudfoot A.) та інших, Humana Press Inc., 2000; Methods Enzymol. том 287 і 289, Academic Press, 1997).

Іншим аспектом цього винаходу є способи обстеження для виявлення облігатних мономерних антагоністичних різновидів хемокинів, опис яких наведено, які включають:

a) здійснення моносайтових мутацій CCL2, які блокують здатність останнього до димеризації;

b) ідентифікування згаданих різновидів, які зв'язуються з рецептором і демонструють агоністичні властивості *in vitro*;

c) ідентифікування згаданих різновидів із групи, ідентифікованої у вищенаведеному пункті (b), що додатково характеризуються як такі, що інгібують рекрутинг клітин перитонеального ексудату.

Оцінка цих властивостей може здійснюватись за допомогою методик, відомих у цій галузі і показаних у прикладах, із застосуванням молекули, що викликає запалення і рекрутинг клітин перитонеального ексудату, наприклад, хемокину, наприклад, самого CCL2, тіогліколату або овальбуміну.

Цей винахід було описано з посиленням на конкретні варіанти здійснення, однак обсяг опису включає усі модифікації і заміни, які можуть бути здійснені фахівцем у цій галузі без перевищення значення і цілі формули винаходу.

Далі опис винаходу буде здійснюватись за допомогою наведених нижче Прикладів, які не повинні розглядатись як такі, що будь-яким чином обмежують цей винахід.

Приклади

Приклад 1: Клонування, експресія і очищення рекомбінантних білків

Зрілі мутантні білки CCL2 (Фіг.1; ПОСЛІДОВНИСТЬ №1) і CCL2-P8A (Фіг.1; ПОСЛІДОВНИСТЬ №2) та зрілі мутантні білки CCL2\* (Фіг.1; ПОСЛІДОВНИСТЬ №3) і CCL2\*-P8A (Фіг.1; ПОСЛІДОВНИСТЬ №4) одержали і експресували як рекомбінантні білки у *E. coli* за описом, наведеним у літературі (Паавола К.Д. (Paavola C.D.) та інші, 1998), на основі послідовності зрілої форми людського CCL2/MCP-1, що відповідає сегменту 24-99 молекули-попередника. У разі CCL2\* і CCL2\*-P8A, заміна метіоніну на ізолейцин у положенні 64 підвищує ступінь чистоти і гомогенності мутантів завдяки запобіганню утворення різновидів, що містять метіонінсульфоксид у положенні 64.

Стисло, гени для CCL2 і CCL2\* конструювали за стандартною методикою синтезу генів з оптимальним застосуванням кодону для експресії у *E. coli* і кодону для метіоніну, який було додано на 5' кінці послідовності, яка кодує зрілий людський CCL2 або CCL2\*. Мутантні генно-інженерні конструкції, що включають аланін у положенні 8, одержали шляхом мутагенезу матриці CCL2 або CCL2\* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції і клонували у векторі pET3a (фірма Novagen) між сайтами Xho I і Nde I.

Плазмиди, які кодують білки на основі CCL2\*, застосовували для трансформування клітин TAP302, які являють собою клітини BL21pLys S, сконструйовані з блокуванням тіоредоксинредуктази для того, щоб зробити внутрішньоклітинний окисно-відновний потенціал більш сприятливим для утворення дисульфідних зв'язків. У разі застосування клітин цієї лінії, дисульфідні зв'язки, як видається, утворюються у клітині, що виключає необхідність у стадії повторного впорядкованого укладання.

Усі генно-інженерні конструкції одержали і перевірили за допомогою стандартних методів молекулярної біології (мутагенез і ампліфікація із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції, секвенування ДНК, рестрикційне розщеплення). Один із клонів, який містив відповідну послідовність MCP-1 (P8A), у подальшому застосовували для продукування білка у *E. coli*. Для трансформування BL21 Star™ застосовувались також плазмиди (DE3) (номер за каталогом фірми Invitrogen C6010-03) або BL21 DE3 (номер за каталогом фірми Novagen 69387-3).

CCL2, CCL2\* і CCL2\*-P8A експресують і очищують, як описано у вихідній статті, із застосуванням стадії руйнування ультразвуком, стадії лізису і стадії хроматографування (колонка SP-Sephacrose; елюювання градієнтом NaCl у 10мМ K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7,5). Пікові фракції змішували і додатково очищали шляхом високоефективного рідинного хроматографування з оберненою фазою (HPLC) (колонка C18 із частинками розміром 5мкм і 300Å порами). Білки елюювали градієнтним розчином, який містив 0,1% трифтороцтової кислоти, зі зростанням вмісту ацетонітрилу; білки, як правило, елюювали при 34±5% ацетонітрилу. Після цього білки ліофілізували, розчиняли (1мг/мл) у 35мМ розчині трис-буфера (pH8), проводили реакцію з 15мкг амінопептидази (фірма Perrotech, Rock Hffl, штат Нью-Джерсі)/1мг білка впродовж 36год. при кімнатній

температурі і повторно очищали за допомогою HPLC з оберненою фазою. Результатом обробки амінопептидазою є видалення лише N-кінцевого метіоніну з утворенням N-кінцевої глутамінової або N-кінцевої піроглутамінової кислоти (ця різниця жодним чином не відбивається на біологічній активності), що спостерігається у разі N-кінцевого секвенування рекомбінантного білка. Білок після цього ліофілізували, повторно розчиняли у воді (1-5мг/мл) і зберігали невеликими аліквотами при температурі 80°C.

Більші кількості рекомбінантних білків, зокрема, CCL2-P8A, одержали також за допомогою альтернативної методики, розробленої для очищення, розпочинаючи з дебрису, який одержали з великих ферментаційних культур штамів *E. coli*, що продукують ці білки. Ферментер містив 5л в загальній кількості продуктує приблизно 200г (сирого маса) дебрису, а 50л ферментер продуктує 1,8кг (сирого маса) дебрису. За методикою очищення, опис якої наведено, обробляють 200г (сирого маса) дебрису.

Дебріс відтаювали і на 1г (сирого маса) додавали 3мл дезінтеграційного буфера (50мМ розчин трис/HCl, pH8,0 (номер за каталогом фірми Biosolve 20092391), що містив 10мМ розчин MgCl<sub>2</sub> (номер за каталогом фірми Fluka 63065), 5мМ розчин бензамідину/HCl (номер за каталогом фірми FTuka 12073), 1мМ розчин DL дитіотреїтолу (DTT) (номер за каталогом фірми Fluka 43819), 1мМ розчин фенілметилсульфонілфториду (PMSF) (номер за каталогом фірми Fluka 78830) і 20мг/л ДНКаз (фірма Fluka) (номер за каталогом фірми Sigma DN-25). Суспензію гомогенізували на апараті Polytron з одержанням якісного гомогенату, позбавленого фрагментів або скупчень. Усі маніпуляції здійснювали при температурі 4°C. Гомогенізовану бактеріальну суспензію переносили до механічного клітинного дезінтегратора (фірма French Press) (перепад тисків). Кількість робочих циклів становила, як правило, 2-4 при 1500 бар (150МПа). Руйнування клітин відслідковували за допомогою SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію) із забарвленням кумасі синім.

Лізат вносили до центрифугальних пробірок GSA і центрифугували при 10000об/хв. на центрифугі Sorval RC5C (16300×g) впродовж 90хв. при температурі 4°C. Після центрифугування супернатант зливали з попередньою перевіркою SDS-PAGE аналізом того, що супернатант не містив необхідного розчинного білка. Дебріс із центрифугальної пробірки видаляли за допомогою лопатки і переносили до попередньо зваженої хімічної склянки для визначення маси дебрису. Дебріс промивали деіонізованою водою шляхом додавання 5мл води на грам дебрису у хімічній склянці з подальшим перемішуванням впродовж 30хв. при температурі 4°C за допомогою магнітної мішалки. Суспензію центрифугували у центрифугальних пробірках GSA при 10000об/хв. на Центрифугі Sorval RC5C (16300×g) впродовж 60хв. при температурі 4°C. Стадію промивання повторили тричі. Після кожного центрифугування супернатант зливали з попередньою перевіркою SDS-PAGE аналі-

зом того, що супернатант не містив необхідного розчинного білка.

Дебріс розчиняли у свіжоодержаному буфері для екстрагування внутрішньоклітинних тілець (100мМ розчин трис/HCl, pH8,0 (номер за каталогом фірми Biosolve 20092391), що містив 1мМ розчин DL дитіотреїтолу (DTT) (номер за каталогом фірми Fluka 43819) і 6мМ розчин гуанідіуму/HCl (номер за каталогом фірми Fluka 50950), у співвідношенні 100мл буфера на 25г дебрісу за допомогою апарата Polytron. Розчин нагрівали впродовж 30хв. при температурі 60°C і перемішували для забезпечення проходження процесу мономеризації, після чого охолоджували до кімнатної температури. Гомогенат вносили до центрифугальних пробірок Ti45 і піддавали ультрацентрифугуванню при 35000об/хв. на ультрацентрифузі Beckman L-60 (10000×g). Супернатант фільтрували за допомогою 0,8-0,2мм фільтра (SpiralCap, номер за каталогом фірми PALL 12069), аналізували за допомогою SDS-PAGE і проводили кількісне визначення за допомогою білкового аналітичного реактиву із забарвленням кумасі синім (фірма Pierce) за методикою, що надається зі згаданим набором.

Необхідний рекомбінантний білок виділяли на колонці FineLine 35 Pilot, заповненій смолою Source 30 RPC за інструкціями постачальника (фірма Amersham Pharmacia). Після застосування колонку регенерують за методикою очищення, яка надається виробником (фірма Amersham Pharmacia). Для 100г дебрісу колонку діаметром 3,5см і висотою 23см заповнюють смолою Source 30 RPC у загальній кількості 220мл (еквівалент 1 об'єму колонки). Згадану колонку монтують на систему AKTA FPLC (рідинна хроматографія з програмованим потоком) (фірма Amersham Pharmacia). Швидкість потоку становила 10мл/хв. із максимальним тиском 1МПа. Перед внесенням проби колонку промивали деіонізованою водою (2 об'єми колонки (CV), 440мл). Після промивання колонку зрівнювали 5 CV (об'ємами колонки) зрівноважувального буфера (100мМ розчин трис/HCl (номер за каталогом фірми Biosolve 20092391)) із доведенням pH до рівня 7,5 за допомогою 37% димлячої HCl (номер за каталогом фірми Fluka 84426).

Внутрішньоклітинні тілця (lbs), розчинені у суміші гуанідіуму/HCl, вносили до колонки зі швидкістю потоку 5мл/хв. Після цього колонку промивали спочатку зрівноважувальним буфером (5 об'ємів колонки), потім буфером А (5 об'ємів колонки) (0,1% TFA (трифтороцтова кислота, номер за каталогом фірми Pierce 28904) і 99,9% дистильованої води). Білок елюють за допомогою лінійного градієнту (від 0% до 100%) буфера В (0,1% TFA (трифтороцтова кислота, номер за каталогом фірми Pierce 28904), 9,9% дистильованої води, 90% ацетонітрилу (UN1648, фірма Baker) у кількості більше 10 CV зі швидкістю потоку 10мл/хв. і граничним тиском 1МПа. Збирали 10мл фракції. Усі виявлені піки аналізували за допомогою SDS-PAGE, HPLC і піддавали кількісному визначенню за допомогою УФ-спектроскопії. Фракції, які містили

необхідний білок, змішували і піддавали кількісному визначенню за допомогою УФ-спектроскопії.

Білок ренатурували шляхом десятикратного розведення у ренатураційному буфері (100мМ розчин трис/HCl, pH8,0 (номер за каталогом фірми Biosolve 20092391)), що містив 0,1мМ розчин відновленого глутатіону (номер за каталогом фірми Sigma G-4251) і 0,01мМ розчин окисненого глутатіону (номер за каталогом фірми Acros Organic 120000250), з одержанням кінцевої концентрації приблизно 0,1мг/мл. До ренатураційного буфера краплями додавали Source 30 RPC. Якщо об'єм є великим, цю операцію можна здійснювати за допомогою перистальтичного насоса. Розчин перемішували впродовж ночі при температурі 4°C. Розчин часто буває каламутним унаслідок осадження білка, який не ренатурувався. Кінцеві концентрації ренатураційного буфера у межах від 0,1мг/мл до 0,4мг/мл давали еквівалентні кількості ренатурованого білка (від 40% до 50%). Рівень pH і вміст ацетонітрилу у вихідному матеріалі на стадію ренатурації не впливають. Після ренатурації можна провести HPLC для контролювання повторного впорядкованого укладання.

Ренатураційний розчин фільтрували за допомогою перистальтичного насоса High Flow з подвійним фільтром, до складу якого входив фільтр грубої очистки (0,8мм) і 0,22мм фільтр. Просвітлений розчин, після кількісного визначення за допомогою УФ-спектроскопії, концентрували на катіонообмінній колонці Hiload SP Sepharose HP. Розмір іонообмінної колонки залежить від кількості білка. Для кількості <500мг застосовували колонку 16/10 (1 CV (об'єм колонки)=20мл); для 500-1000мг застосовували колонку 26/10 (1 CV=50мл) і для 1-2г застосовували колонку 50/5 (1 CV=100мл).

Колонку заповнювали за інструкціями постачальника (фірма Amersham Pharmacia). Колонку промивали 2 CV деіонізованої води, після чого зрівнювали 4 CV катіонообмінного буфера А (50мМ розчин оцтової кислоти (фірма Fluka) з pH, доведеним до рівня 4,5 за допомогою NaOH (номер за каталогом фірми Fluka 71690)). За допомогою оцтової кислоти pH розчину доводили до рівня 4,5, електропровідність доводили до рівня <10мСм. Після внесення розчину білка зі швидкістю потоку, рекомендованою постачальником для обраної колонки, колонку промивали 5 CV буфера А. Білок елювали лінійним градієнтом (від 0% до 100%) буфера В (буфер А, що містив 2М розчин NaCl (номер за каталогом фірми Fluka 71380)) у кількості, яка перевищувала 20 CV. Об'єм фракції визначали за розміром колонки. Усі виявлені піки аналізували за допомогою SDS-PAGE, HPLC і піддавали кількісному визначенню за допомогою УФ-спектроскопії. Після аналізу фракції, які містили AS900652, змішували, піддавали кількісному визначенню за допомогою УФ-спектроскопії і аналізували за допомогою HPLC.

Видалення N-кінцевого метіоніну здійснювали ферментативним шляхом із застосуванням метіонінамінопептидази (MAP) із подальшою стадією очищення. Стисло, пробу спочатку діалізували на мембранному колекторі зі смугою пропускання 3,5кДа у дезінтеграційному буфері (35мМ розчин

трис/HCl, pH7,5 (номер за каталогом фірми Biosolve 20092391). Буфер для діалізу змінювали тричі впродовж 24год. Метіонінамінопептидазу (MAP) додавали до розчину білка у співвідношенні 1:10000 (у масовому відношенні, фермент:білок). Гідроліз здійснювали при кімнатній температурі впродовж 48год. Розщеплений білок у подальшому очищали на катіонообмінній колонці, як описувалось вище. За даними SDS-PAGE, чистота білка перевищувала 98%.

Очисну систему АКТА (фірма Pharmacia) застосовували для додаткового очищення необхідного білка. Систему впродовж 1год. очищали 1М розчином NaOH, промивали стерильною водою і зрівнювали буфером, профільтованим через 0,22мм фільтр (0,1% TFA (трифтороцтова кислота) (номер за каталогом фірми Pierce 28904), 99,9% дистильованої води). Білок знесолювали на колонці G-25, заповненій тонкоподрібненою сефарозою XK50/30. Колонку промивали 1 CV 1М розчину NaOH, потім 4 CV стерильної води, після чого зрівнювали 5 CV 0,1% розчину TFA. Для забезпечення оптимальних умов знесолювання, 50-100мл проби знесолювали на 450мл колонці G-25, заповненій тонкоподрібненою сефарозою. У разі об'ємів, більших за 100мл, стадію знесолювання повторюють. Пробу перед внесенням до колонки фільтрують на 0,22мм фільтрі. Колонку елюють 1,5 CV 0,1% розчину TFA зі швидкістю потоку 10мл/хв. і максимальним тиском 1МПа. 10мл фракції збирають до стерильних пробірок. Після проведення аналізу фракції, що містять білок, змішують, піддають кількісному визначенню за допомогою УФ-спектроскопії за стерильних умов і аналізують за допомогою HPLC, SDS-PAGE і мас-спектрометрії.

Залишкові забруднювачі видаляють за допомогою препаративної хроматографії з оберненою фазою (RPC) на системі DeltaPrep HPLC (фірма WATERS). Пробу підкислювали 0,1% розчином TFA і вносили до колонки Vydac C8 RPC (номер за каталогом фірми Vydac 208TB101522), зрівнюваною буфером А (0,1% TFA (трифтороцтова кислота) (номер за каталогом фірми Pierce 28904) і 99,9% дистильованої води). Білок елювали за допомогою лінійного градієнту (від 0% до 100%) буфера В (0,1% розчин TFA (трифтороцтова кислота, номер за каталогом фірми Pierce 28904), 99% ацетонітрилу (UN 1648, фірма Baker) у кількості більше за 10 CV зі швидкістю потоку 25мл/хв. і граничним тиском 700 бар (70МПа). Усі виявлені піки аналізували за допомогою SDS-PAGE, HPLC і піддавали кількісному визначенню за допомогою УФ-спектроскопії. Після аналізів фракції, які містили AS900652, змішували, піддавали кількісному аналізу за допомогою УФ-спектроскопії, ділили на аліквоти за потребою і ліофілізували. Білок зберігають при температурі -20°C або -80°C.

Кількісне визначення рекомбінантного білка здійснювали за допомогою УФ-спектроскопії із застосуванням спектрофотометра UV-VIS (система Uvikon, фірма KONTRON). Еталонний буфер вносили до кварцевої кювети (QS 1000, фірма HELMA), у той час як проба знаходилась у іншій кюветі. Визначення здійснювали у діапазоні 350-

240нм; для кількісного визначення застосовували показники оптичної густини при 280нм за коефіцієнтом екстинкції, який визначили на амінокислотній композиції за допомогою програми ProtParam, фірма ExPASy Для розчину (1мг/мл) окисненого білка, що містив дисульфідні зв'язки, застосовували значення 1,1.

SDS-PAGE аналіз здійснювали із застосуванням 10% гелю NuPAGE (номер за каталогом фірми Invitrogen NP0301). Пробу піддавали двократному розведенню у буфері для проб (номер за каталогом фірми Invitrogen LC2676) і впродовж 5хв. нагрівали при температурі 95°C. Білковий набір фірми Benchmark відігравав роль стандарту молекулярної маси. 10мкл розчину стандарту молекулярної маси і 20мкл проби білка вносили до відповідних лунок. Електрофорез здійснювали у буфері MES (номер за каталогом фірми Invitrogen NP0002). Міграцію здійснювали за інструкціями постачальника при 200 В, 12мА і 25Вт впродовж 35хв. (PowerEase 500, фірма Invitrogen).

Гель NuPAGE забарвлювали 0,1% розчином барвника R250 кумасі синій у 10% оцтової кислоти, 30% метанолу у дистильованій воді впродовж 30хв. і знебарвлювали у 10% оцтової кислоти, 30% метанолу у дистильованій воді з повільним збовтуванням до знебарвлювання фонові поверхні. Після цього гель декілька разів промивали перед зануренням до сушильного розчину (фірма Invitrogen), потім на 10хв. укладали між двома аркушами целофанової плівки (фірма Invitrogen), після чого вмішували до мініатюрного преса для збереження гелю у вигляді тонкої пластинки. За альтернативним варіантом, гель забарвлювали за методикою забарвлювання SimplyBlue Safe (номер за каталогом фірми Invitrogen LC6065).

Хроматографічну систему Alliance (постачальник фірма WATERS) застосовували з аналітичною колонкою C8 Aquapore RP-300 7m (діаметр 0,2см×22см), зрівнюваною 0,1% розчином TFA. До колонки вносили 10-50мг проби, попередньо підкислені 0,1% розчином TFA. Білки елювали об'ємом градієнтного розчину (від 25% до 50%) ацетонітрилу, більшим за 20 CV.

Ідентичність рекомбінантного білка підтверджували мас-спектральним аналізом і аналізом N-кінцевої послідовності. Одержаний очищений матеріал мав відповідну N-кінцеву послідовність QPDAINAAVT.

Маса головного різновиду дорівнювала 8655 Да, що відповідало теоретичній масі білкового ланцюга з 2 дисульфідними зв'язками. Виявили другий різновид із масою, нижчою за 17Да, що відповідало модифікації N-кінцевого залишку глутаміну на піроглутамінову кислоту. Присутність цієї модифікації не впливала на активність білка.

Приклад 2: Аналіз на клітинній основі

Матеріали і методи

Аналіз індукованого хемокином рекрутингу клітин перітонеального ексудату

Мишей-самців лінії Balb/C (фірма Janvier, Франція) віком 8-12 тижнів розміщували за нормальних умов утримання тварин зі стандартним циклом чергування світла і темряви і вільним доступом до їжі і води. Групам із 3-6 мишей

внутрішньоочеревинно впорскували 200мкл фізіологічного розчину (стерильний 0,9% (у відношенні маси до об'єму) розчин NaCl без ліпополісахаридів) або такий самий розчин, що містив CCL2 або CCL2-P8A (10мкг на ін'єкцію). Для дослідження інгібувального ефекту CCL2-P8A на індукований CCL2 рекрутинг клітин перитонеального ексудату, ці молекули вводили внутрішньоочеревинно за 30хв. до внутрішньоочеревинної ін'єкції CCL2. Усі молекули вводили з вказаною вище концентрацією у вказаному вище буфері (фізіологічний розчин). Мишей умертвляли через 4год. після останньої ін'єкції CCL2 або CCL2-P8A.

Існує публікація аналізу індукованого тіогліколятом рекрутингу клітин перитонеального ексудату (Мішель Б. (Mishell B.), 1980). Стисло, тіогліколятне середовище одержали шляхом суспендування 30г дегідратованого тіогліколятного середовища (фірма Becton Dickinson) у 1л холодної дистильованої води з подальшим нагріванням до кипіння для повного розчинення порошку. Після цього середовище розподіляли аліквотами до 100мл флаконів і автоклавували. Після охолодження середовище зберігали без доступу світла при кімнатній температурі впродовж щонайменше одного місяця. Рекрутинг клітин індукували шляхом внутрішньоочеревинного впорскування мишам (групи з 3 тварин) 200мкл 3% розчину тіогліколяту у День 1, через 30хв. після введення CCL2\*-P8A. CCL2\* у подальшому вводили щоденно впродовж 3 днів (Дні 2, 3 і 4). Дексаметазон (фірма Sigma) застосовували як позитивний контроль і вводили у дозі 10мг/кг внутрішньоочеревинно. Мишей умертвляли на День 5.

Промивання очеревини для оцінки рекрутингу клітин у попередньому аналізі здійснювали таким чином. Мишей умертвляли удушенням отруйною речовиною (зростаючі концентрації CO<sub>2</sub>) у плекси-гласовому ящику. Шкіру протирали 70% етанолом. Зовнішній шар шкіри видаляли з оголенням очеревинної оболонки. Очеревинну порожнину тричі промивали 5мл PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин), що мав температуру танення льоду, і рідину змішували у 15мл полістироловій пробірці Falcon (фірма Becton Dickinson) на льоду. Кожне промивання здійснювали з легким масажем очеревинної порожнини. Промивну рідину центрифугували при 425×g, супернатант зливали, і одержаний дебрис ресуспендували обережним багаторазовим піпетуванням у 1мл PBS. 10мкл клітинної суспензії забарвлювали 90мкл трипанового синього і загальну кількість клітин визначали за допомогою гемоцитометра (фірма Neubauer) шляхом підрахунку 4 ділянок, площа кожної з яких становила 1мм<sup>2</sup>. Брали середнє значення, помножували його на коефіцієнт розведення 10 і знову помножували на 10 з одержанням кількості клітин на мкл, відповідно до інструкцій із застосування гемоцитометра. Врешті-решт, загальний об'єм множили на 1000 (що дорівнює 1мл) з одержанням загальної кількості виділених клітин.

#### Результати

Рекомбінантний зрілий людський CCL2/MCP-1, мутант CCL2\* і відповідні облігатні мономерні му-

танти CCL2-P8A і CCL2\*-P8A (Фіг.1) експресували у *E. coli*.

У літературі ясно показано, що мутація P8A у CCL2 блокує утворення димерів CCL2, не впливаючи на зв'язування з клітинами, що експресують рецептор, або з вірусним рецептороподібним білком, але також і без демонстрації активності відомого антагоніста CCL2 у відповідному аналізі (дивись (1+9-76) MCP-1 у Таблиці I у роботі Паавола К.Д. (Paavola C.D.) та інших, 1998; Александер Дж.М. (Alexander J.M.) та інші, 2002).

Облігатна мономерна форма CCL2 демонструє специфічні і неочікувані властивості у аналізах на клітинній основі. У аналізі рекрутингу клітин перитонеального ексудату, CCL2\*-P8A і CCL2-P8A є нездатними до рекрутингу клітин, порівняно з природним CCL2 (Фіг.2). Більше того, ці молекули є здатними (дозозалежним чином) до інгібування індукованого CCL2 (Фіг.3A) і індукованого тіогліколятом рекрутингу макрофагів (Фіг.3B). У останньому згаданому аналізі, CCL2-P8A демонструє таку саму ефективність, що і позитивний контроль (дексаметазон, відома протизапальна сполука).

Приклад 3: Властивості CCL2-P8A при моделюванні захворювань на тваринах

#### Матеріали і методи

Модель індукованого овальбуміном запалення легень

Модель індукованого овальбуміном запалення легень відтворювали за публікацією (Бліт Д.І. (Blyth D.I.) та інші, 1996). Групи з 6 мишей чутливі до шляхом внутрішньоочеревинного впорскування 10мкг білка курячого яйця, осадженого у 2мг 2% розчину гідроксиду алюмінію (фірма Serva) загальним об'ємом 200мкл, який одержували шляхом змішування 25мкл овальбуміну (2мг/мл) і 250мкл гідроксиду алюмінію у 725мкл 0,9% розчину NaCl (фізіологічний розчин) без ліпополісахаридів і осадження впродовж 3-4год. при температурі 4°C. Через п'ятнадцять днів після сенсibiliзації мишей обробляли і групам з 6 мишей інтраназально вводили 15мкг овальбуміну у 50мкл фізіологічного розчину із щоденним інгаляційним наркозом (ізофлуран) з 15 по 19 день. CCL2-P8A (200мкл, 10мкг/внутрішньоочеревинна ін'єкція) вводили за 30хв. перед кожним введенням овальбуміну. Промивання очеревини для визначення рекрутингу клітин і підрахунок клітин здійснювали за описом, наведеним вище у Прикладі 2.

Модель ЕАЕ (експериментальний автоімунний енцефаломієліт)

Мишей лінії C57Bl/6 (фірма Charles River, Італія) (вибрана лінія має задокументовану сприйнятливість до ЕАЕ; Сарбахер У.К. (Sahrbacher U.C.) та інші, 1998) імунізують (день=0) підшкірною ін'єкцією до лівого боку 0,2мл емульсії 200мкг пептиду MOG<sub>35-55</sub> (фірма Neosystem, Strasbourg, Франція) у повному ад'юванті Фрейнда (CFA, фірма Difco, Detroit, США), що містить 0,5мг *Mycobacterium tuberculosis*. Зараз же після цього миші одержують внутрішньоочеревинну ін'єкцію 500нг коклюшного токсину (фірма List Biological Lab., Campbell, штат Каліфорнія, США), розчиненого у 400мкл буфера (0,5М розчин NaCl, 0,017% розчин тритону X-100,

0,015M розчин трис-буфера, pH7,5). На другий день тварини одержують другу внутрішньоочеревинну ін'єкцію 500нг коклюшного токсину. На 7 день мишам підшкірно до правого боку вводять другу дозу (200мкг) пептиду MOG<sub>35-55</sub>. У повному ад'юванті Фрейнда (CFA). Розпочинаючи приблизно з 8-10 дня, ця процедура викликає поступово прогресуючий параліч, який розвивається від хвоста і підіймається до передніх лапок. Розпочинаючи з 7 дня, тварин індивідуально оглядають на присутність ознак паралічу з оцінкою клінічного стану у балах таким чином:

- 0=жодних ознак захворювання
- 0,5=частковий параліч хвоста
- 1=параліч хвоста
- 1,5=параліч хвоста+частковий однобічний параліч задніх лапок
- 2=параліч хвоста+слабкість задніх лапок або частковий параліч задніх лапок
- 2,5=параліч хвоста+частковий параліч задніх лапок (опущений таз)
- 3=параліч хвоста+повний параліч задніх лапок
- 3,5=параліч хвоста+повний параліч задніх лапок+нетримання
- 4=параліч хвоста+параліч задніх лапок+слабкість або частковий параліч передніх лапок
- 5=вмираюча або мертва тварина

Обробку кожної тварини сполуками або носієм розпочинають на 7 день після імунізації і продовжують на протязі 21 послідовного дня (10-12 оброблюваних тварин на групу). Бета-інтерферон і CCL2-P8A вводили підшкірно або внутрішньоочеревинно, відповідно, один раз на день у вигляді розчину (10мл/кг) у PBS у дозах, вказаних на фігурі.

Модель контактної гіперчутливості уповільненого типу

Тест із напуханням мишачих вух для визначення контактної гіперчутливості здійснювали, як описувалось раніше (Garrigue Дж.Л. (Garrigue J.L.) та інші, 1994). Стисло, мишей піддавали попередній місцевій сенсibilізації шляхом нанесення 25мкл 0,5% розчину 2,4-динітрофторбензолу (DNFB; фірма Sigma Chemical Co.) у ацетоні/оливковій олії (4:1) на поголений живіт. Через п'ять днів 20мкл 0,2% розчину DNFB у тому самому носії наносили на праві вуха, а сам носій на ліві вуха. На п'ятий день мишам (n=6 на групу) внутрішньоочеревинно вводили 0,05мг/кг, 0,5мг/кг або 5мг/кг (1мкг, 10мкг або 100мкг/мишу, відповідно) CCL2-PSA, дексаметазону (1мг/кг) або лише PBS у контрольній групі. Обробку здійснювали за 30хв. до введення DNFB. Товщину вуха вимірювали за допомогою циферблатного товщиноміра (фірма Mitutoyo Corp.). Напухання вуха визначали шляхом віднімання значення перед введенням DNFB від значення, яке одержали після введення і додатковим відніманням значення будь-якого напухання протилежного вуха, до якого вводили носій.

#### Результати

Потенційну терапевтичну активність CCL2-P8A як антагоніста хемокинів випробували на тваринах, на яких моделювали запальні і автоімунні захворювання.

CCL2\*-P8A випробували на моделі індукованого овальбуміном запалення легень. На цій класичній моделі алергічного запалення легень, мишей сенсibilізували овальбуміном з ад'ювантом, гідроксидом алюмінію, протягом стадії сенсibilізування для підсилення імунної реакції, після чого впродовж 5 послідовних днів інтраназально вводили овальбумін, у той час як на цій самій стадії CCL2-P8A вводили внутрішньоочеревинно. У цьому разі також CCL2-P8A продемонстрував здатність до інгібування рекрутингу клітин (Фіг.4).

CCL2-P8A перевіряли при моделюванні ЕАЕ (експериментальний автоімунний енцефаломієліт), тобто на другій, добре відомій моделі розсіяного склерозу, яка застосовувалась для визначення антагонізму хемокинів (у тому числі CCL2) для лікування цього автоімунного запального демієлінізаційного захворювання центральної нервової системи людини (Махад Д.Дж. (Mahad D.J.) і Рансохоф Р.М. (Ransohoff R.M.), 2003; Ізіксон Л. (Iziksion L.) та інші, 2002). CCL2-P8A перевіряли на тваринах, які демонстрували легкий або тяжкий рівень захворювання, за оцінкою клінічного стану у балах після введення ЕАЕ-індукуючих сполук. Кожну з двох груп тварин розділили на п'ять підгруп: три з них одержували різні кількості CCL2-P8A, а дві інші застосовувались або як негативний контроль (тварин обробляли лише носієм), або як позитивний контроль (тварин обробляли бета-інтерфероном, поширеним лікарським засобом для лікування розсіяного склерозу). Розвиток стану тварин порівнювали на основі бальної оцінки клінічного стану, яка визначалась впродовж періоду лікування (21 день). На обох моделях захворювань введення CCL2-P8A (у дозі до 0,15мг/кг) поліпшувало стан тварин статистично значущим чином. Зниження бальної оцінки клінічного стану при застосуванні CCL2-P8A, що спостерігалось, є принаймні порівнянним зі зниженням, яке спостерігалось у разі застосування бета-інтерферону як лікувального засобу (Фіг.5).

Модель іншого захворювання, контактної гіперчутливості, застосовували для визначення потенційної терапевтичної ефективності CCL2-P8A у разі шкірного запалення, яке опосередковується Т-клітинами. Контактна гіперчутливість (CHS) являє собою залежну від клітин Лангерганса (LC), опосередковану Т-клітинами шкірну імунну реакцію, яка відображає максимальний рівень активності LC in vivo (поглинання нанесених на шкіру антигенів, міграцію до лімфовузлів і презентацію антигенів "ненавченим" Т-клітинам). Згадана модель є добре розробленою для визначення характеристик сполук для дерматологічних показань, наприклад, псоріазу і алергічного контактного дерматиту (Кей Г. (Xu H.) та інші, 1996). Ця модель включає стадію сенсibilізації і подальше введення антигену, наслідком чого є запалення шкіри з утворенням набряку і клітинних інфільтратів у шкірі. Набряк може вимірюватись за допомогою кронциркуля на місці введення антигену (вуха миші). Було показано залучення хемокинів, зокрема, CCL2, до розвитку цієї надмірної реакції (Міцуй Г. (Mitsui G.) та інші, 2003; Міцумото Н. (Mizumoto N.) та інші, 2001). Наслідком внутрішньоочеревинного введення

CCL2-P8A за 30хв. до введення антигену (DNFB, у цьому разі) є зменшення напухання, порівнянне з тим, яке спостерігалось у разі застосування відомої протизапальної сполуки (дексаметазону) через день після обробки. Контрольним мишам також вводили антиген з/без попередньої сенсibilізації, унаслідок чого Т-клітиннозалежне запалення і набряк розвиваються або ні (Фіг.6).

Таким чином, мономерний різновид гомодимеротвірного СС-хемокіну, де згаданий варіант одержують унаслідок щонайменше моноамінокислотної заміни, яка змінює конфігурацію водневих зв'язків на ділянці димеризації, є інгібітором хемокінопосередкованого рекрутингу клітин у *in vivo* аналізі рекрутингу клітин та у тварин, які застосовуються для моделювання людських захворювань, що дозволяє зробити припущення про те, що це є новою стратегією розробки різновидів хемокінів, які можуть застосовуватись як для одержання фармацевтичних композицій, так і у терапевтичних методах.

#### Приклад 4: Альтернативні форми CCL2-P8A

Альтернативні форми різновидів хемокінів, розкритих вище, можна одержати шляхом введення мутацій, відомих у цій галузі як такі, що поліпшують конкретні особливості.

Одна або декілька моноамінокислотних заміни та/або домішок можуть бути введені у різних положеннях CCL2-P8A (Фіг.7А). CCL2-P8A може експресуватись як зрілий білок, якому бракує природного N-кінцевого залишку глутаміну або з доданням додаткового невеликого залишку (наприклад, аланіну або гліцину) на N-кінці перед глутаміном таким чином, щоб цей залишок не був доступним і спонтанно не перетворювався на про-глутаматну форму (Гонг Дж. (Gong J.) і Кларк-Льюїс І. (Clark-Lewis I.), 1995). CCL2-P8A може також бути мутованим таким чином, що п'ятий цистеїн стає доступним для проведення специфічної реакції поліетиленгліколізації. Ці сайти поліетиленгліколізації можуть інтегруватись на рівні внутрішньої амінокислоти (наприклад, на аспарагіні 14 або

17 і навіть у положенні 8, завдяки чому одна модифікація може забезпечити можливість проведення як мономеризації, так і поліетиленгліколізації) або на С-кінці (шляхом безпосереднього додання цистеїну після природного С-кінцевого треоніну).

Додатковий різновид CCL2-P8A можна одержати шляхом злиття цієї послідовності з доменом константної ділянки імуноглобуліну, тобто з доменом білка, який, як відомо, поліпшує стійкість і ефективність рекомбінантних білків у кровообігу. Одержаний гібридний білок може безпосередньо експресуватись клітинами ссавців (наприклад, клітинами CHO або HEK293) із застосуванням відповідних векторів експресії, завдяки чому гібридний білок секретується до культурального середовища. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, нуклеїновокислотна послідовність, що кодує зрілий CCL2-P8A, може клонуватись у векторі експресії, злитому з нуклеїновокислотною послідовністю, що кодує сигнальну послідовність людського CCL2, на її 5' кінці і з нуклеїновокислотною послідовністю, що кодує константну ділянку (сегмент 246-467) важкого ланцюга лямбда людського імуноглобуліну IgG1 (номер депонування NCBI CAA75302), на її 3' кінці. Одержаний вектор може застосовуватись для трансформації лінії клітин CHO або HEK293 з вибором клонів, які стабільно експресують і секретують рекомбінантний гібридний білок, що має CCL2-P8A на N-кінці і послідовність IgG1 на С-кінці (Фіг.7В). Цей клон може у подальшому застосовуватись для збільшення обсягу продукування і для очищення рекомбінантного гібридного білка з культурального середовища. За альтернативним варіантом, положення нуклеїнових кислоти, що кодує константну ділянку (сегмент 243-474) важкого ланцюга лямбда людського імуноглобуліну IgG1 і CCL2-P8A може інвертуватись, а одержаний білок може експресуватись і секретуватись із застосуванням, як і до того, сигнальної послідовності людського CCL2 або будь-якої іншої сигнальної послідовності.

Таблиця І

Амінокислота	Синонімічні групи	Синонімічні групи, яким віддається більша перевага
<b>Ser</b>	Gly, Ala, Ser, Thr	Thr, Ser
<b>Arg</b>	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
<b>Leu</b>	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
<b>Pro</b>	Pro, Ala, Ser, Thr	Pro
<b>Thr</b>	Gly, Ala, Ser, Thr	Thr, Ser
<b>Ala</b>	Gly, Thr, Ser	Gly, Ala
<b>Val</b>	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
<b>Gly</b>	Ala, Thr, Ser, Gly	Gly, Ala
<b>Ile</b>	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
<b>Phe</b>	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
<b>Tyr</b>	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
<b>Cys</b>	Ser, Thr, Cys	Cys
<b>His</b>	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
<b>Gln</b>	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln



<b>Asn</b>	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
<b>Lys</b>	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
<b>Asp</b>	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
<b>Glu</b>	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
<b>Met</b>	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
<b>Trp</b>	Trp, Phe, Tyr	Trp

Таблиця II

Амінокислота	Синонімічні групи
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, ало-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, L-1-тіоазолідин-4-карбонова кислота, D- або L-1-оксазолідин-4-карбонова кислота
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, бета-Ala, Acp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, транс-3,4 або 5-фенілпролін, AdaA, AdaG, цис-3,4 або 5-фенілпролін, Bpa, D-Bpa
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Cys	D-Cys, S--Me--Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S--Me--Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

## Посилання:

- Alexander J.M. et al., Cell, 111; 343-356, 2002.  
Baggiolini M. et al., Annu. Rev. Immunol., 15: 675-705, 1997.  
Baggiolini M., J. Intern. Med., 250: 91-104, 2001.  
Blyth D.I. et al., Am. J. Respir. CeU. Mol. Biol., 14: 425-438, 1996.  
Brown A. et al., J. Pept. Sci. 2: 40-46, 1996.  
Cleland J.L. et al., Curr. Opin. Biotechnol., 12: 212-219, 2001.  
Coleman R.A. et al., Drag Disc Toay, 6: 1116-1126, 2001.  
Dougherty D.A., Curr. Opin. Chem. Bio, 4: 645-652, 2000.  
Fernandez E.J. and Lolis E., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 42:469-499, 2002.  
Garrigue J.L. et al., Contact Dermatitis, 30: 231-237, 1994.  
Godessart N. and Kunkel S.L., Curr. Opin. Immunol., 13: 670-675, 2001.

- Golebiowski A. et al., Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 4: 428-434, 2001.  
Gong J, and Clark-Lewis I., J. Exp. Med. 181: 631-640, 1995.  
Gosling J. et al., J. Clin. Invest., 103: 773-778, 1999.  
Greenwald R.B. et al., Adv. Drag. DeUv. Rev., 55: 217-50, 2003.  
Gu L. et al., Chem. Immunol., 72: 7-29, 1999.  
Gu L. et al., Nature, 404: 407-411, 2000.  
Harris J.M. and Chess R.B., Nat. Rev. Drag. Discov., 2: 214-21, 2003.  
Handel T. et al., Biochemistry, 35: 6569-6584, 1996.  
Hemmerich S. et al., Biochemistry, 38: 13013-13025, 1999.  
Hraby V.J. and Balse P.M., Curr. Med. Chem., 7: 945-970, 2000.  
Izikson L. et al., Clin. Immunol., 103: 125-31 2002.  
Kim K.S. et al., FEBS Lett., 395: 277-282, 1996.

Li A.P., *Drug. Disc. Today*, 6: 357-366, 2001.  
 Loetscher P. and Clark-Lewis I., *J. Leukoc. Biol.*, 69: 881-884, 2001.  
 Lu B. et al., *J. Exp. Med.*, 187: 601-608, 1998.  
 Lubkowski J. et al., *Nat. Struct. Biol.*, 4: 64-69, 1997.  
 Luo B. and Prestwich G.D., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 11: 1395-1410, 2001.  
 Mishell B., *Immunopharm.*, 2: 233-245, 1980.  
 Mahad D.J. and Ransohoff R.M., *Semin. Immunol.*, 15: 23-32, 2003.  
 Mitsui G. et al., *Immunol. Lett.*, 86: 191-197, 2003.  
 Mizumoto N et al., *Immunobiology*, 204:477-493, 2001.  
 Murphy L.R. et al., *Protein Eng.*, 13: 149-152, 2000.  
 Nilsson J. et al., *Protein Expr. Purif.*, 11: 1-16, 1997.  
 Paavola C et al., *J. Biol. Chem.*, 273: 33157-33165, 1998.

Pillai O. and Panchagnula R., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5: 447-451, 2001.  
 Proudfoot A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 1885-1890, 2003.  
 Rogov S.I. and Nekrasov AN., *Protein Eng.*, 14: 459-463, 2001.  
 Sahrbacher U.C. et al., *Eur. J. Immunol.*, 28: 1332-1338, 1998.  
 Schwarz M.K. and Wells T.N., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3: 407-417, 1999.  
 Seet B.T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9008-9013, 2001.  
 Steitz S.A. et al., *FEBS Lett*, 430: 158-164, 1998.  
 Villain M. et al., *Chem. Biol.*, 8: 673-679, 2001.  
 Yoshimura T. et al., *FEBS Lett.*, 244: 487-493, 1989.  
 Xu H. et al., *J. Exp. Med.*, 183: 1001-1012, 1996.  
 Zhang Y. et al., *Methods*, 10: 93-103, 1996.

### ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Еплайд Рісборч Системз ЕРС Холдінг Н.В.

<120> ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНОВИДІВ ХЕМОКІНІВ

<130> WO933

<160> 5

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Людський CCL2

<400> 1

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr  
 1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr  
                   20                  25                  30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala  
           35                  40                  45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met  
       50                  55                  60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr  
   65                  70                  75

<210> 2

<211> 76

<212> PRT

<213> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<223> Людський CCL2-P8A

<400> 2

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Ala Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr  
   1                  5                  10                  15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr  
                   20                  25                  30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala  
           35                  40                  45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met  
       50                  55                  60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr  
 65 70 75

<210> 3

<211> 76

<212> PRT

<213> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<223> Людський CCL2\*

<400> 3

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr  
 1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr  
 20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala  
 35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Ile  
 50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr  
 65 70 75

<210> 4

<211> 76

<212> PRT

<213> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<223> Людський CCL2\*-P8A

<400> 4

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Ala Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr  
1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr  
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala  
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Ile  
50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr  
65 70 75

<210> 5

<211> 331

<212> PRT

<213> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<223> Людський гібридний білок CCL2-P8A\_IgG1

<400> 5

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Ile Ala Ala Thr  
1 5 10 15

Phe Ile Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Ala Val  
20 25 30

Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu  
 35 40 45

Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val  
 50 55 60

Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln  
 65 70 75 80

Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr  
 85 90 95

Pro Lys Thr Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 100 105 110

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 180 185 190

Leu His Asn Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu  
225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
245 250 255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Gln Gly Gln Pro Glu  
260 265 270

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
290 295 300

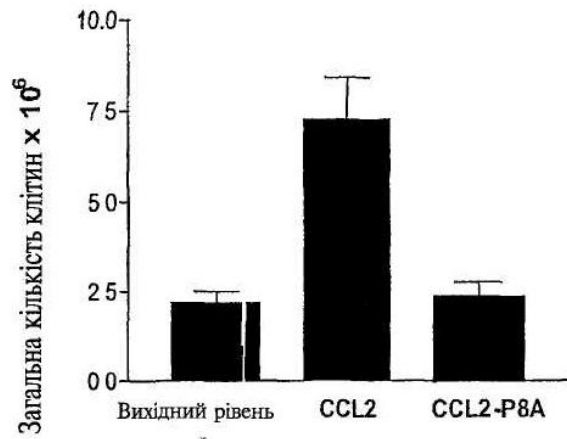
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
305 310 315 320

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

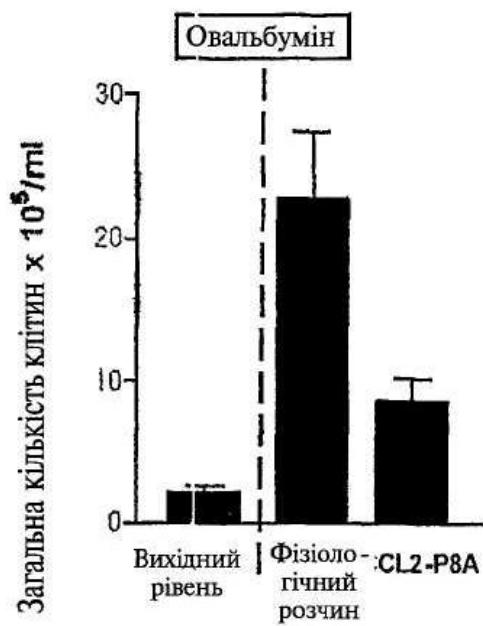
CCL2 1 QPDAINAPVT CCYNITNRKI SVQRLASYRR ITSSKCPKEA VIFKTIVAKE 50  
CCL2-P8A 1 QPDAINAAVT CCYNITNRKI SVQRLASYRR ITSSKCPKEA VIFKTIVAKE 50  
CCL2\* 1 QPDAINAPVT CCYNITNRKI SVQRLASYRR ITSSKCPKEA VIFKTIVAKE 50  
CCL2\*-P8A 1 QPDAINAAVT CCYNITNRKI SVQRLASYRR ITSSKCPKEA VIFKTIVAKE 50

CCL2 51 ICADPKQKWV QDSMIDHLDKQ TQTPKT 76  
CCL2-P8A 51 ICADPKQKWV QDSMIDHLDKQ TQTPKT 76  
CCL2\* 51 ICADPKQKWV QDSIDHLDKQ TQTPKT 76  
CCL2\*-P8A 51 ICADPKQKWV QDSIDHLDKQ TQTPKT 76

FIG. 1

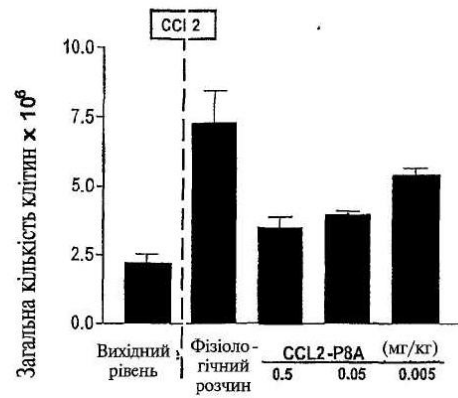


ФІГ. 2

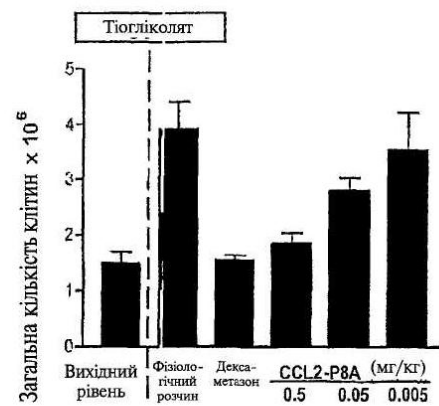


ФІГ. 4

A)

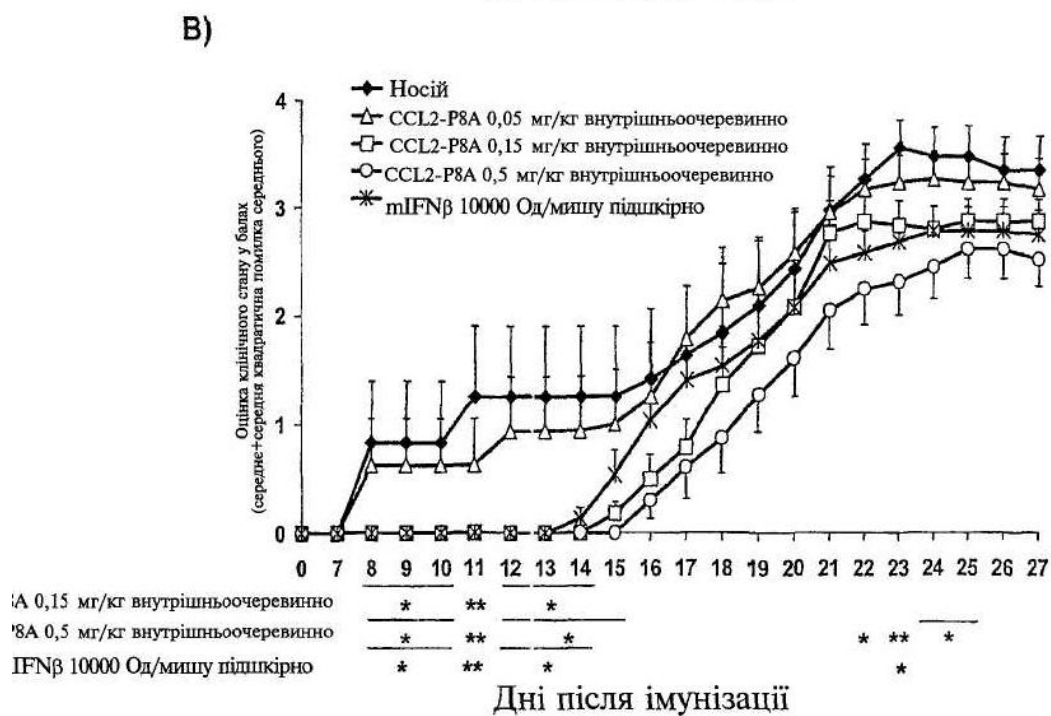
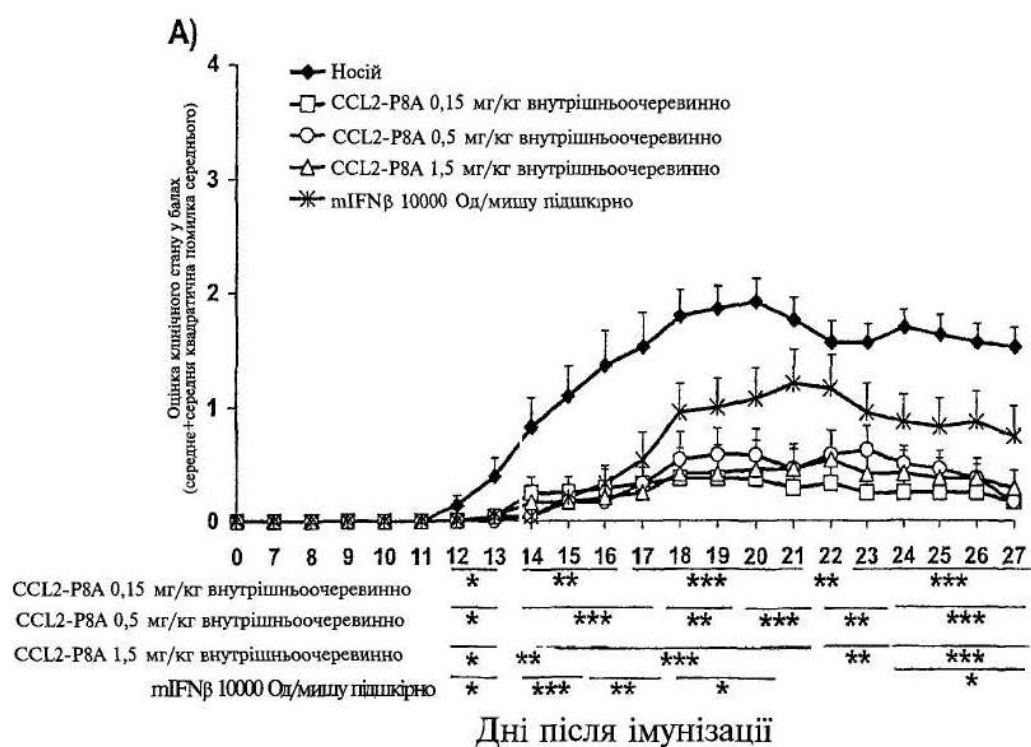


B)

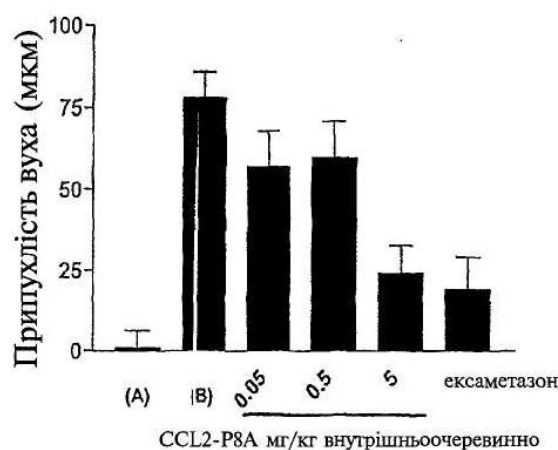


ФІГ. 3

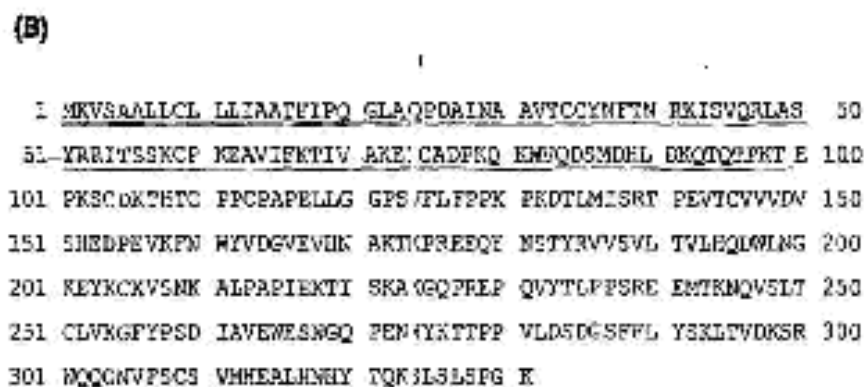
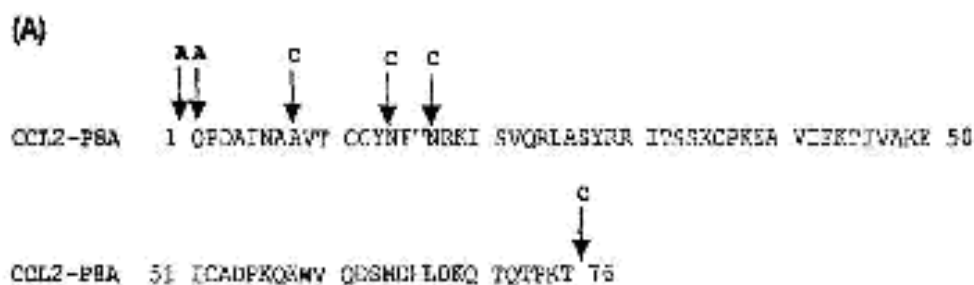




ФІГ. 5



ФІГ. 6



ФІГ. 7