

Received: 2003.09.03

Accepted: 2003.11.17

Published: 2004.03.02

Chemokiny - perspektywy zastosowania związków blokujących ich działanie w terapii*

Chemokines – future therapeutic targets

Kazimiera Waśniowska

Zakład Immunochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Chemokiny, wytwarzane przez leukocyty i komórki tkanek, stanowią dużą rodzinę chemotaktycznych cytokin, mających zdolność stymulowania i regulacji wędrówki leukocytów w procesach zapalnych. Wszystkie opisane (~50) ludzkie chemokiny przekazują sygnał do wnętrza komórki poprzez oddziaływanie ze swoistymi receptorami związanymi z białkami G obecnymi na powierzchni komórki. Chemokiny mogą brać udział w wielu chorobach prozapalnych i autoimmunizacyjnych organizmu i to czyni je i ich receptory atrakcyjnym celem badań wykorzystywanych do rozwoju nowych metod terapii. Wykazano, że antagoniści kilku receptorów chemokin wykazują silną aktywność antyzapalną i antywirusową i mogą stanowić leki nowej generacji.

Słowa kluczowe: chemokiny • receptory chemokin • antagoniści

Summary

The chemokines are a large family of chemotactic cytokines, produced by tissue cells and leukocytes, which regulate leukocytes migration in inflammation and immunity. All the described human chemokines (ca. 50) transmit intracellular signals by binding and activating specific G protein-coupled receptors on the cell surfaces of their target cells. Chemokines appear to be involved in a variety of proinflammatory and autoimmune diseases, and this makes them and their receptors very attractive therapeutic targets. Antagonists of several chemokine receptors have demonstrated potent antiviral or anti-inflammatory activity and may represent therapeutic agents for the treatment of inflammation, as well as autoimmune and viral diseases.

Key words: chemokine • chemokine receptor • antagonists

Full_text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/4828.pdf

Word count: 6008

Tables: 2

Figures: 3

References: 67

Adres autorki: Zakład Immunochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L.Hirszfelda, ul. R.Weigla 12, 53-114 Wrocław, wasniows@immuno.iitd.pan.wroc.pl

*Praca została przygotowana w ramach projektu grantowego nr 3 P05A 018 23 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych, Warszawa



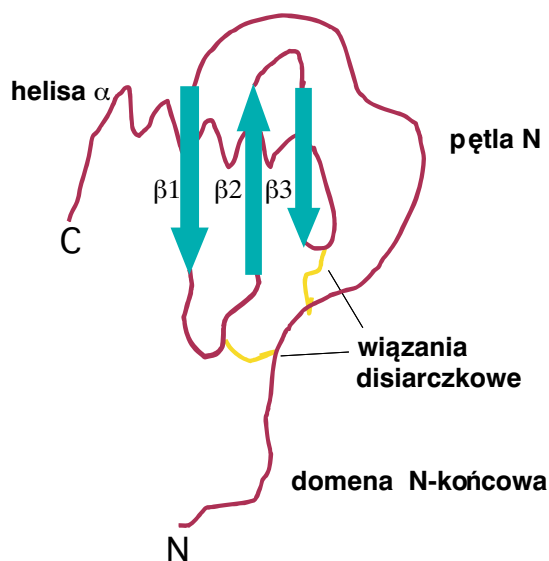
Chemokiny stanowią dużą rodzinę cytokin, które kontrolują wiele procesów biologicznych i patologicznych. Termin chemokina pochodzący od nazwy chemotaktyczna cytokina (chemotactic cytokine), został wprowadzony 10 lat temu [29]. Chemokiny są to niskocząsteczkowe białka wydzielnicze, wytwarzane przez leukocyty i komórki tkanek, konstytutywnie lub po indukcji. Oddziałują chemotaktycznie i aktywująco na różne populacje leukocytów poprzez siedmiohelikalne receptory związane z białkami G. Podstawową rolą chemokin jest rekrutacja leukocytów w celu utrzymania prawidłowego funkcjonowania systemu immunologicznego i w walce z patogenami. Aktywności chemokin nie można ograniczyć tylko do roli chemoatraktantów. Obecnie wiadomo, że pełnią funkcję w angiogenezie, embriogenezie i organogenezie. Uczestniczą również w wielu procesach patologicznych (choroby autoimmunizacyjne, zapalne, promocja wzrostu komórek nowotworowych), a receptory chemokin - wspólnie z receptorem CD4 - ułatwiają zakażenie wirusem HIV. Wyniki wielu badań sugerują, że zahamowanie aktywności chemokin lub zablokowanie ich receptorów może wpływać anty-zapalnie, antywirusowo lub immunomodulacyjnie.

BUDOWA CHEMOKIN

Łańcuchy polipeptydowe chemokin są zbudowane z 70-130 reszt aminokwasowych, wśród których znajdują się cztery konserwatywne reszty cysteiny, tworzące dwa wewnątrzcząsteczkowe mostki dwusiarczkowe. Większość chemokin zalicza się do dwóch głównych grup w zależności od położenia dwóch pierwszych z czterech konserwatywnych reszt cysteiny. Do pierwszej grupy CXC zaliczamy chemokiny, w których dwie pierwsze reszty cysteiny przedzielone są pojedynczym aminokwasem. Chemokiny należące do tej grupy można dodatkowo podzielić na dwie podgrupy zawierające lub niezawierające sekwencji Glu-Leu-Arg (ELR) poprzedzającej pierwszą cysteinę. Obecność motywu ELR jest cechą charakterystyczną wszystkich chemokin reagujących z receptorami CXCR1 i CXCR2. Drugą grupę stanowią chemokiny CC, w których dwie pierwsze cysteiny sąsiadują ze sobą. Opisano dwa dodatkowe warianty struktury chemokin, które rozszerzyły liczbę grup do czterech. Do trzeciej grupy C zaliczono limfotaktynę, która ma tylko jedną z dwóch pierwszych konserwatywnych reszt cysteiny. Przedstawicielem czwartej grupy CX₃C, w której dwie pierwsze cysteiny przedzielone są trzema aminokwasami, jest fraktalkina. W przeciwieństwie do pozostałych chemokin jest ona integralnym białkiem błonowym, w którym domenę chemokinową stanowi N-końcowy fragment cząsteczki. Szybki postęp w tej dziedzinie sprawił, że często wiele grup badawczych opisywało tę samą cząsteczkę pod różnymi nazwami.

Postanowiono więc robocze symbole i nazwy zastąpić przez oficjalne nazwy ustalone wg następujących reguł: zaproponowano aby chemokiny należące do danej grupy miały w nazwie rodzinę do której należą, literę L (ligand) i kolejny numer, np. IL-8 (interleukina 8) ma oficjalną nazwę CXCL8. Przykłady ludzkich chemokin z uwzględnieniem nowego nazewnictwa, przedstawiono w tabeli 1 [40, 53, 61, 66].

Badania struktury trzeciorzędowej chemokin za pomocą analizy rentgenograficznej i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego wykazały, że mimo niskiego poziomu identyczności sekwencji aminokwasowej ~20% ich struktura przestrzenna wykazuje znaczną homologię. W monomerach wszystkich chemokin rdzeń zawierający trzy struktury β jest stabilizowany przez wiązania dwusiarczkowe i oddziaływanie hydrofobowe pomiędzy C-końcówką α helisą i strukturą β (ryc. 1). Wprawdzie struktura trójwymiarowa monomerów chemokin jest identyczna, ich struktura czwartorzędowa jest różna. Chemokiny CXC i CX₃C tworzą globularne dimery, struktury dimerów chemokin CC są bardziej wydłużone. Chemokiny ulegają dimeryzacji i oligomeryzacji w wyższych stężeniach i w obecności glikozaminoglikanów. Funkcja oligomerów nie jest dokładnie poznana, uważa się, że agregacja chemokin w warunkach fizjologicznych chroni te małe białka przed proteolizą i pozwala na immobilizację chemokin i utworzenie gradientu chemotaktycznego. Homooligomery mogą spełniać odmienne funkcje niż wiązanie receptora



Ryc. 1. Schemat budowy chemokiny z zaznaczonymi elementami struktury: β - struktura β , C, N - C i N-końiec łańcucha polipeptydowego [13, 18]

Tabela 1. Rodzina chemokin

*i - chemokina indukowana (prozapalna), k – chemokina konstytutywna (limfoidalna)

Ludzka chemokina		Synonimy	Mysi homolog	Receptor
CXC (α)				
CXCL1	i*	GROα, MGSA	N51/KC, MIP-2	CXCR2>>R1
CXCL2	i	GROβ, MIP-2α	Gro/KC	CXCR2
CXCL3	i	GROδ, MIP-2β	Gro/KC	CXCR2
CXCL4	i	PF-4	nieznany	CXCR2?
CXCL5	i	ENA-78	LIX	CXCR2
CXCL6	i	GCP-2	LIX	CXCR1, CXCR2
CXCL7	i	NAP2	nieznany	CXCR2
CXCL8	i	IL-8	nieznany	CXCR1, CXCR2
CXCL9	i	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	i	IP-10	CRG-2	CXCR3
CXCL11	i	I-TAC	nieznany	CXCR3
CXCL12	k	SDF-1α, SDF-1β	SDF-1α, SDF-1β	CXCR4
CXCL13	k	BCA-1, BLC	BLC	CXCR5
CXCL14	i/k	BRAK, BMAC	BRAK, BMAC	nieznany
CXCL15	k	-	lungkina	nieznany
CXCL16	k	CXCL16	CXCL16	CXCR6
CC (β)				
CCL1	i	I-309	TCA-3	CCR8
CCL2	i	MCP-1	JE	CCR2
CCL3	i	MIP-1α, LD78	MIP-1α, LD78	CCR1, CCR5
CCL4	i	MIP-1β	MIP-1β	CCR5, CCR8
CCL5	i	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	i	-	C-10, MRP-1	nieznany
CCL7	i	MCP-3	MARC/FIC	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	i	MCP-2	nieznany	CCR2, CCR9
CCL9	i	-	MRP-2, MIP-1g	nieznany
CCL10		-	nieznany	nieznany
CCL11	i	eotaksyna	eotaksyna	CCR1, CCR3
CCL12	i	-	MCP-5	CCR2
CCL13	i	MCP-4	nieznany	CCR1-CCR3, CCR5
CCL14	k	HCC-1	nieznany	CCR1
CCL15	k	HCC-2, Lkn-1, MIP-1b	nieznany	CCR1, CCR3
CCL16	i/k	HCC-4, LEC	nieznany	CCR1
CCL17	i	TARC	nieznany	CCR4
CCL18	k	PARC, DC-CK1	nieznany	nieznany
CCL19	k	ELC, MIP-3b, exodus3	nieznany	CCR7
CCL20	k	LARC, MIP-3a, exodus1	nieznany	CCR6
CCL21	k	SLC, 6Ckine, exodus2	nieznany	CCR7
CCL22	i/k	MDC	abcd1	CCR4
CCL23	k	MPIF-1, ckb8	nieznany	CCR1
CCL24	i	MPIF-2, ckb6	nieznany	CCR3
CCL25	k	TECK	TECK	CCR9
CCL26	i	eotaksyna 3, MIP-4α	nieznany	CCR3
CCL27	k	eskina	ALP	CCR10
CCL28	i/k	MEC	CCL28/MEC	CCR3, CCR10
C (γ)				
XCL1	i	limfotaktyna, SCM-1α	limfotaktyna	XCR1
XCL2	i	limfotaktyna, SCM-1β		XCR2
CX3C (δ)				
CX3CL1	i/k	fraktalkina	neurotaktyna	CX3CR1



ponieważ monomer chemokiny jest jednostką funkcjonalną [3, 13, 18].

Chemokiny mobilizują i aktywują leukocyty przez oddziaływanie ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek. Receptory te należą do rodziny białek charakteryzujących się obecnością siedmiu śród-błonowych domen (7 TMD) i przekazujących sygnał przez białka G. Dotychczas zidentyfikowano i sklonowano 19 receptorów chemokin różniących się sekwencją aminokwasową i swoistością wobec ligandów. Większość receptorów rozpoznaje więcej niż jedną chemokinę i kilka chemokin wiąże się do więcej niż jednego receptora (tabela 1). Receptory chemokin omówiono w licznych artykułach przeglądowych [4, 25, 32, 40, 54, 61, 65].

MECHANIZM WIĄZANIA CHEMOKIN

Mechanizm wiązania chemokin do receptora zaproponowano na podstawie strukturalnej analizy chemokin i receptorów oraz ich mutantów. Wykazano, że chemokiny mają dwa główne miejsca interakcji z ich receptorami. Są to: N-terminalny giętki fragment i konformacyjnie usztywniona pętla N występująca po drugiej cysteinie. Obydwa miejsca znajdują się blisko siebie dzięki mostkom dwusiarczkowym (ryc. 1). Receptor rozpoznaje reszty aminokwasowe znajdujące się w łańcuchu polipeptydowym tworzącym pętlę N i ta interakcja ogranicza ruchliwość chemokiny i ułatwia właściwą orientację i oddziaływanie N-końcowego fragmentu chemokiny z receptorem [13, 18]. Wynikiem oddziaływania chemokiny z receptorem jest jego aktywacja, która zaczyna się od zamiany GDP na GTP w podjednostce α białek G. Białka G oddysocjują od receptora i aktywują szereg cząsteczek efektorowych, które uruchamiają kaskadę sygnałów w cytoplazmie komórki [35].

Chemokiny wiążą się również do cząsteczek, które nie przekazują sygnału. W tkankach chemokiny wiążą się do glikozaminoglikanów, obecnych na powierzchni komórki lub zewnątrzkomórkowej macierzy, przez oddziaływanie aminokwasów zasadowych części C-końcowej łańcucha polipeptydowego. Chemokiny związane do glikozaminoglikanów pozostają w miejscu, gdzie są wytwarzane i uwalniane w pełni zachowując aktywność chemotaktyczną. To wiązanie jest ważne w immobilizacji chemokin i tworzeniu lokalnego gradientu chemokin, który przyciąga leukocyty [36]. Do białek, które po związaniu chemokin nie przekazują sygnału należą Duffy i D6. Funkcja tych białek nie została jeszcze wyjaśniona [62].

ROLA CHEMOKIN

Rola chemokin nie ogranicza się tylko do chemotaksji, wiele przykładów wskazuje, że jest znacznie szersza. Bliższa charakterystyka chemokin i ich receptorów pozwoliła podzielić je na dwie grupy, limfoidalne (konstytutywne) i prozapalne (indukowane), w zależności od funkcji jaką pełnią w odporności i reakcjach zapalnych. Chemokiny prozapalne są wytwarzane przez różne tkanki i wędrujące leukocyty w odpowiedzi na toksyny bakteryjne i cytokiny prozapalne, takie jak IL-1, TNF i interferony. Ich głównym zadaniem jest rekrutacja leukocytów do miejsc objętych procesem zapalnym lub infekcją w celu obrony gospodarza [3, 48]. Większość chemokin można zaliczyć do chemokin prozapalnych (tabela 1). Konstytutywne chemokiny są wydzielane przez organizm w zdefiniowanych przestrzeniach tkanek limfoidalnych i biorą udział w podstawowych procesach wędrowki i rozwoju komórek w obrębie systemu immunologicznego.

Informacje na temat roli chemokin limfoidalnych w dojrzewaniu, różnicowaniu i zasiedlaniu limfocytów, uzyskano na podstawie badań na myszach z inaktywacją badanego genu. Wykazano, że myszy pozbawione genu kodującego CXCL12 lub CXCR4 mają poważnie uszkodzony system immunologiczny, układ krążenia i ośrodkowy układ nerwowy, co prowadzi do śmierci organizmu [41, 59, 67]. Wyniki innych doświadczeń wskazują, że chemokiny CXCL13, CCL19 i CCL21 kontrolują przemieszczanie i migrację limfocytów w czasie dojrzewania, różnicowania i prawidłowego umieszczenia w obwodowych narządach limfatycznych [3, 19, 23, 60]. Chemokiny pełnią ważną rolę w obronie organizmu i w rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Funkcja ich wykracza znacznie poza rolę chemoatraktantów i chemokiny włączone są w wiele procesów biologicznych, takich jak hematopoeza, embriogeneza i angiogeneza, a także w wiele procesów patologicznych od zapalenia do infekcji wirusowej i nowotworu.

ROLA CHEMOKIN W CHOROBYCH

Cocchi i współpracownicy w 1995 roku wykazali, że chemokiny CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) i CCL5 (RANTES) hamują infekcje HIV *in vitro* [12]. W następnym roku udowodniono, że receptory CCR5 i CXCR4 wraz z cząsteczką CD4 są koreceptorami ułatwiającymi wniknięcie wirusa HIV do komórki [14, 15, 17]. Udział receptora CCR5 w zakażeniu wirusem HIV została potwierdzona genetycznie, poprzez wykazanie, że osobnicy narażeni na infekcję wirusem HIV, ale nieulegający zakażeniu są homozygotami zawierającymi nieaktywny wariant receptora CCR5 [55]. Nieaktywny



wariant receptora powstał w wyniku delecji 32 par zasad w części kodującej genu dla CCR5. Produktem tego genu jest skrócone białko CCR5Δ32, które nie ulega ekspresji na powierzchni komórki, zmniejsza to znacznie ryzyko infekcji wirusem HIV. W ciągu ostatnich kilku lat wykazano, że około 1% populacji kaukaskiej posiada taką mutację. Odkrycia te stwarzają nowe terapeutyczne możliwości walki z infekcją wirusem HIV i chorobą AIDS [52].

Charakterystyczną cechą wszystkich chorób zapalnych jest nadmierna rekrutacja leukocytów w miejscu zapalenia. Zwiększony poziom indukowanych chemokin można wykryć we krwi obwodowej, płynach ustrojowych i tkankach ludzi w stanach patologicznych. Wydaje się, że chemokiny uczestniczą w większości chorób, w których dochodzi do aktywacji i akumulacji leukocytów w tkankach. Wykazano, że chemokiny odgrywają ważną rolę w patogenezie zapalenia i chorób autoimmunizacyjnych. Zmiany w ekspresji chemokin i ich receptorów zaobserwowano w reumatoidalnym zapaleniu stawów, stwardnieniu rozsianym, miażdżycy, astmie oraz w odrzucaniu przeszczepu. Wykazano, że w formowaniu się nacieków zapalnych w reumatoidalnym zapaleniu stawów uczestniczą CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL4 [58]. W stwardnieniu rozsianym obserwujemy w próbkach mózgu pacjentów wzrost poziomu chemokin CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 i CXCL11, które przyciągają komórki Th1 i monocyty do mózgu. Nagromadzenie się autoagresywnych komórek T i monocytów w mózgu prowadzi do demielinacji i zniszczenia aksonu [57]. Niektóre chemokiny (CCL2, CCL3, CCL5, CCL11) uczestniczą w patogenezie chorób alergicznych przyciągając chemotaktycznie eozynofile do zmian zapalnych toczących się w oskrzelach i płucach. Znacznie zwiększone stężenie CCL5 zaobserwowano w odrzuconych przeszczepach nerek [3, 48].

Obecność CCL2 stwierdzono w ścianach tętnic zwierząt w modelowej miażdżycy oraz w blaszkach miażdżycowych u ludzi [20, 27]. Sugeruje się również, że polimorfizm V64I łańcucha polipeptydowego CCR2 jest związany z zapadalnością na choroby serca i śmiertelnością [45]. Badania kliniczne pacjentów z chorobami serca wykazały korelację pomiędzy ryzykiem zapadalności na choroby serca a polimorfizmem w pozycji M280T i I249V łańcucha polipeptydowego CX3CR1. Wykazano, że obecność izoleucyny w pozycji 249 i metioniny w pozycji 280 łańcucha polipeptydowego CX3CR1 jest związana z mniejszym ryzykiem zachorowania na choroby serca [34, 37].

Chemokiny i receptory zaklasyfikowane jako konstitutywne nie odgrywają dużej roli w chorobach zapalnych. Wyjątkiem jest receptor CXCR4, który jest koreceptorem HIV, a także bierze udział w przerzutowaniu nowotworów [38].

Obszerna literatura dokumentuje ekspresję chemokin i receptorów chemokin w płynach biologicznych, biopsjach i tkankach pobranych od pacjentów w czasie operacji chirurgicznych, u których występuje stan zapalny. Wykazano, że ligandy dla CCR1, CCR2, CCR5, i CXCR3 są wszechobecne w chronicznych stanach zapalnych, podczas gdy w ostrych stanach zapalnych częściej stwierdza się obecność chemokin wiążących się z CXCR1 i CXCR2 [20]. Zaangażowanie chemokin w wiele chorób prozapalnych i autoimmunizacyjnych, a także ich właściwości antywirusowe czyni je i ich receptory atrakcyjnym celem leczniczym.

System chemokin jest często opisywany jako redundancyjny. Występuje kilka par receptor-ligand, tzn. jeden ligand z kilkoma receptorami i jeden receptor z więcej niż jednym ligandem. Stąd obawa, że zablokowanie działania jednej chemokiny może nie dać pożądanego efektu, ponieważ inna chemokina może zająć jej miejsce. Trzeba więc wykazać, który z wielu receptorów jest najważniejszy w danej chorobie i może być potencjalnym celem nowej terapii. Jedną z powszechnie używanych metod określenia ważności pary receptor-ligand związanej z daną chorobą jest badanie wpływu delecji interesującego nas genu *in vivo*. Otrzymano myszy transgeniczne i myszy pozbawione genów kodujących poszczególne chemokiny i ich receptory [cyt wg 3, 47]. Delecja tylko jednego genu (CXCR4/CXCL12) jest śmiertelna [59], a efekty delecji genów kodujących pozostałe chemokiny i ich receptory ujawniają się dopiero w warunkach stresu wywołanego chorobą [7, 28]. W tabeli 2 przedstawiono chemokiny i ich receptory, dla których wykazano ważność w poszczególnych chorobach na podstawie obserwacji klinicznych, badań z przeciwciałami monoklonalnymi oraz modyfikowanymi chemokinami i myszami transgenicznymi [48, 56]. Ze względu na ważną rolę chemokin w patogenezie wielu chorób od kilku lat trwają intensywne poszukiwania substancji blokujących działanie chemokin lub swoistych inhibitorów ich receptorów. Receptory chemokin w modelach chorób u zwierząt mogą być neutralizowane przez użycie przeciwciał monoklonalnych, modyfikowanych chemokin, które działają jako antagoniści receptorów i syntetycznych niskocząsteczkowych inhibitorów.

Tabela 2. Chemokiny w chorobach

Choroba	Receptor	Chemokiny
HIV	CXCR4 CCR5	CXCL12 CCL3, CCL4, CCL5
Stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, odrzucenie przeszczepu, astma	CCR1, CCR2, CCR5 CXCR3	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10
Alergia	CCR3, CCR8	CCL11
Nowotwory	CXCR4, CCR7	CXCL12, CCL19, CCL21
Ostre zapalenie bakteryjna infekcja	CXCR1, CXCR2	CXCL8
Miażdżycza	CCR2, CXCR3	CCL2, CXCL10

ANTAGONIŚCI RECEPTORÓW DLA CHEMOKIN

Obserwacja, że chemokiny mogą hamować infekcję HIV *in vitro*, skłoniła wiele grup badawczych i firm farmaceutycznych do intensywnego poszukiwania leków blokujących rozwój zapalenia lub infekcji HIV, czyli cząsteczek, które wiążąc się do receptora uniemożliwiają związaną liganda. Inhibitorami aktywności chemokin są przeciwciała monoklonalne, rekombinowane mutanty chemokin, naturalnie występujące białka kodowane przez wirusowe genomy oraz małe chemiczne związki. Otrzymano wiele przeciwciał monoklonalnych antychemokiny i ich receptory, które stosowane są głównie w celach badawczych i diagnostycznych. Tylko dwa przeciwciała monoklonalne mają potencjalne zastosowanie w leczeniu, anty-CXCR3 przy przeszczepach organów i anty-CXCR4 w zapobieganiu przerzutowaniu nowotworów [24, 38]. Przeszkodą w szerszym zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych jako leków jest ich immunogenność i mała stabilność w surowicy. Działanie chemokin hamują dwa rodzaje wirusowych białek. Należą do nich białka wirusowe wiążące chemokiny i wirusowe homologii chemokin. Stanowią one struktury modelowe z potencjalnym terapeutycznym zastosowaniem [30]. Największą nadzieję na znalezienie nowych leków pomocnych w zwalczaniu chorób, które są obecnie nieuleczalne dają modyfikowane chemokiny i związki o małej masie cząsteczkowej. Te dwa rodzaje związków są szerzej omówione w następujących rozdziałach.

REKOMBINOWANE WARIANTY CHEMOKIN - ANTAGONISTYCZNE PEPTYDY

Modyfikowane chemokiny otrzymane w wyniku skrócenia, wydłużenia lub modyfikacji chemicznej N-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego nabywają antagonistycznej lub częściowo agonistycznej aktywności. Chemokiny wykazujące właściwości agonistyczne bądź antagonistyczne mogą oddziaływać na receptor stabilizując jego nieaktywną lub aktywną postać. Nie tylko agonistyczna, ale również antagonistyczna aktywność chemokin jest zależna od N-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego [5]. Modyfikacja N-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego chemokin prowadzi do otrzymania pochodnych, które zachowują zdolność wiązania odpowiedniego receptora bez indukowania biologicznej odpowiedzi, zachowują się więc jak kompetyjni antagoniści receptora. Pierwszym opisanym takim antagonistą była skrócona postać CXCL8 (6-72 aa), która hamuje wiązanie CXCL8 i innych ELR⁺ chemokin do CXCR1 i CXCR2 [5, 10]. Niestety, brak odpowiednika CXCL8 u myszy oraz modelu zwierzęcego choroby zahamował badania nad zastosowaniem tej rekombinowanej chemokiny w terapii. Analog CCL2 (9-76aa) otrzymany przez delecję pierwszych ośmiu reszt aminokwasowych jest skuteczny w leczeniu objawów miażdżycy na modelu mysim [21]. Aktywność antywirusową wykazują skrócone postaci CCL5 (9-68aa i 3-68aa). Dodanie końcowej metioniny do CCL5 tworzy zmodyfikowane białko Met-



RANTES, które blokuje wiązanie CCL5 i CCL3 w nanomolarnych stężeniach *in vitro* oraz znacznie redukuje objawy chorób zapalnych na modelach zwierzęcych [1, 22, 46, 50, 56].

Chemicznie modyfikowany analog CCL5, który zawiera dodatkową resztę aminooksypentanową, AOP-RANTES, jest silnym inhibitorem HIV-1. Jest on częściowym agonistą CCR5 efektywnym dlatego, że indukuje internalizację receptora CCR5, ale hamuje jego ponowną ekspresję na powierzchni komórki. Inkubacja AOP-RANTES z komórkami zawierającymi na swojej powierzchni CCR5, powoduje wiązanie AOP-RANTES i internalizację receptora, który nie ulega ponownej ekspresji na powierzchni komórki i dlatego nie może być użyty jako koreceptor dla HIV. Usunięcie z powierzchni komórki receptora CCR5 przez AOP-RANTES nie tylko zapobiega wniknięciu wirusa do komórki, ale również zmniejsza możliwość mutacji wirusa w taki sposób, aby mógł wniknąć w obecności inhibitora [16, 49].

Innym sposobem prowadzącym do redukcji ekspresji receptorów chemokin na powierzchni komórki jest modyfikacja C-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego chemokin przez przyłączenie sekwencji KDEL. W ten sposób powstają tzw. intrakiny (chemokiny zatrzymane wewnątrz komórki), które zapobiegają ekspresji nowo syntetyzowanych receptorów chemokin na powierzchni komórki prawdopodobnie przez tworzenie wewnątrzkomórkowych kompleksów, a to zapobiega recykliczacji receptorów [9, 39, 64].

Niektóre z modyfikowanych chemokin (CCL2, CCL3, CCL5) są testowane przez firmy farmaceutyczne w badaniach przedklinicznych. Wykazano, że modyfikowana chemokina CCL3 (nazwana BB10010) działa antynowotworowo i jest dobrze tolerowana przez ochotników podczas prób klinicznych [11, 33, 51].

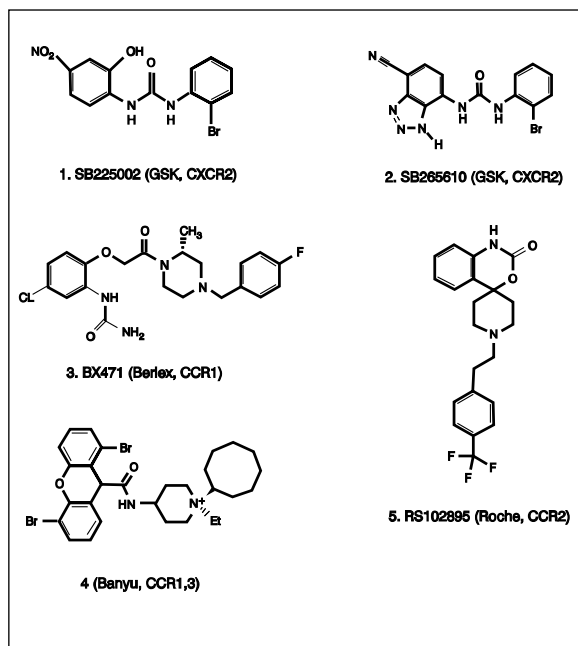
Niedawno opisano naturalnie występujące chemokiny, które wykazują aktywność agonistyczną bądź antagonisticzną w zależności od receptora, z którym się wiążą. Wykazano, że CXCL9, CXCL10 i CXCL11, które są swoistymi ligandami dla CXCR3 zachowują się jak antagoniści po związaniu z CCR3 [31]. Właściwości antagonisticzne wykazują również CCL7 po związaniu z CCR5 oraz CCL11 po związaniu z CCR2 [6, 42, 43]. Powyższe obserwacje sugerują nowy mechanizm regulujący rekrutację leukocytów w czasie reakcji immunologicznych i stanów zapalnych, których podstawą jest połączenie efektów agonistycznych i antagonisticznych chemokin.

Modyfikowane chemokiny i przeciwciała są bardzo pomocne w zrozumieniu roli chemokin w chorobach. Białka te mają jednak pewne ograniczenia jako leki, ponieważ nie mogą być podawane doustnie i są szybko usuwane z surowicy, a ponadto ich produkcja wiąże się z wysokimi kosztami. Idealnym lekiem jest związek chemiczny o małej masie cząsteczkowej podawany doustnie i długo utrzymujący odpowiednie stężenie w krwiobiegu. Dlatego większość firm farmaceutycznych prowadzi obecnie badania w celu poszukiwania związków chemicznych, które będą blokować receptory chemokin i hamować rozwój choroby w badaniach na zwierzętach w podobnym stopniu jak modyfikowane chemokiny.

NISKOCZĄSTECZKOWE ZWIĄZKI CHEMICZNE O WŁAŚCIWOŚCIACH ANTAGONISTÓW CHEMOKIN

Efektywność modyfikowanych chemokin jako inhibitorów przewlekłego zapalenia i infekcji HIV *in vitro*, skłoniła firmy farmaceutyczne do poszukiwania niskocząsteczkowych związków chemicznych o podobnych właściwościach. Zsyntetyzowano wiele związków chemicznych, wykazujących zdolność zablokowania receptorów chemokin, przykłady takich struktur przedstawiono na rycinach 2 i 3 [26, 27, 44]. Pierwszym syntetycznym antagonistą receptorów chemokin była cząsteczka produkowana przez firmę GlaxoSmithKline SB225002 [63]. Cząsteczka ta hamuje wiązanie chemokin do receptora CXCR2 i nie działa na CXCR1, blokuje chemotaksję i adhezję neutrofilów do komórek śródbłonna. Cząsteczka SB225002 wykazuje właściwości antyzapalne *in vivo*, ale nie jest aktywna po podaniu doustnym. Wobec tego za pośrednictwem syntezy otrzymano zmodyfikowaną wersję SB225002 (związek SB26510; ryc. 2), który może być podawany doustnie [56]. Zachęcające wyniki otrzymała firma Berlex podczas testowania w klinice cząsteczki BX471 (inhibitor CCR1; ryc. 2) na pacjentach ze stwardnieniem rozsianym. Dlatego cząsteczka ta przechodzi dalsze fazy testów klinicznych i jest nadzieja, że będzie skuteczna jako lek przeciwko stwardnieniu rozsianemu [8, 26].

Większość badaczy poszukuje inhibitorów CCR5, wykazujących znaczną aktywność antywirusową, ponieważ mogą one być nowymi lekami stosowanymi w leczeniu AIDS. Pierwszym opisanym takim związkiem był TAK779 (ryc. 3) z laboratorium Takeda [2]. Składnik ten blokuje infekcję wirusową w nanomolarnych stężeniach. Niestety, nie może być podawany doustnie, co może być przeszkodą w szerokim zastosowaniu klinicznym. Do związków chemicznych, które po podaniu doustnym nie tracą właściwości leczniczych i są testowane w klinice jako

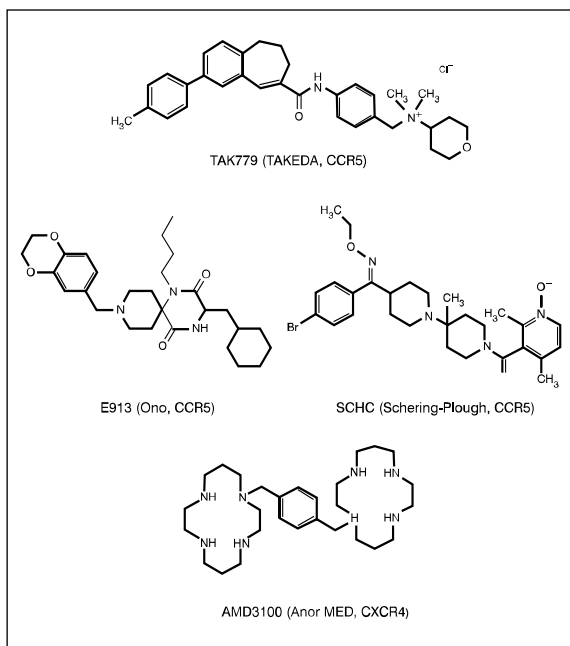


Ryc. 2. Przykłady struktur chemicznych, które są antagonistami receptorów CXCR2, CCR1-CCR3. W nawiasach podano nazwę firmy farmaceutycznej, która wyprodukowała daną cząsteczkę [8, 26, 27, 44]

leki przeciwko HIV należą E913 wyprodukowany przez firmę Ono i SCH przez Schenyl-Plough (ryc. 3) [26, 27]. Mniej badań jest skierowanych na wykrycie inhibitorów CXCR4, ponieważ jest on receptorem HIV w późnym stadium choroby. Ponadto, receptor ten pełni ważną rolę w funkcjonowaniu systemu immunologicznego i jego zablokowanie mogłoby mieć niekorzystne działanie uboczne. Przykładem silnego antagonisty CXCR4, który hamuje replikację wirusa HIV jest ADM31000 (ryc. 3) testowany na ochotnikach przez firmę AnorMED. Niestety w czasie testów klinicznych okazało się, że działa on również niekorzystnie [51, 56].

PODSUMOWANIE

Zaangażowanie chemokin i ich receptorów w choroby prozapalne, wirusowe i autoimmunizacyjne, stwarza



Ryc.3. Przykłady struktur chemicznych, które są antagonistami receptorów, CCR5 i CXCR4. W nawiasach podano nazwę firmy farmaceutycznej, która wyprodukowała daną cząsteczkę [8, 26, 27, 44]

możliwości terapeutycznej interwencji. Wydaje się, że zablokowanie reakcji chemokina-receptor może zahamować lub opóźnić rozwój choroby. W ciągu ostatnich lat dokonał się znaczny postęp w projektowaniu białek wariantowych (rekombinowane chemokiny) i niskocząsteczkowych związków chemicznych hamujących reakcję chemokina-receptor. Opublikowano wiele prac i patentów na temat antagonistów chemokin badanych *in vitro* i na modelach zwierzęcych. Zachęcające wyniki dotychczasowych doświadczeń na zwierzętach i prób klinicznych u ludzi pozwalają wnioskować, że badania dotyczące antagonistów receptorów chemokin dostarczą klinicznie użytecznej terapii w ciągu najbliższych kilku lat.

Pani Profesor Elwirze Lisowskiej dziękuję za krytyczną lekturę manuskryptu.



PIŚMIENNICTWO

- [1] Ajuebor M.N., Hogaboam C.M., Kunkel S.L., Proudfoot A.E., Wallace J.L.: The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic in the rat. *J. Immunol.* 2001, 166: 552-558.
- [2] Baba M., Nishimura O., Kanzaki N., Okamoto M., Sawada H., Iizawa Y., Shiraiishi M., Aramaki Y., Okonogi K., Ogawa Y., Meguro K., Fujino M.: A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96: 5698-5703.
- [3] Baggiolini M.: Chemokines in pathology and medicine. *J. Inter. Med.* 2001, 249: 1-14.
- [4] Baggiolini M., Dewald B., Moser B.: Human chemokines; an update. *Ann. Rev. Immunol.* 1997, 15: 675-705.
- [5] Baggiolini M., Moser B.: Blocking chemokine receptors. *J. Exp. Med.* 1997, 186: 1189-1191.
- [6] Blanpain C., Migeotte I., Lee B., Vakili J., Dornaz B.J., Govaerts C., Vassart G., Doms R.W., Parmentier M.: CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 1999, 94: 1899-1905.
- [7] Boring L., Gosling J., Cleary M., Charo I.F.: Decreased lesion formation in CCR2(-/-) mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998, 394: 894-897.
- [8] Carter P.H.: Chemokine receptor antagonism as an approach to anti-inflammatory therapy: 'just right' or plain wrong? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002, 6: 510-525.
- [9] Chen J.D., Bai X., Yang A.G., Cong Y., Chen S.Y.: Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy. *Nat. Med.* 1997, 3: 1110-1116.
- [10] Clark-Lewis I., Schumacher C., Baggiolini M., Moser B.: Structure-activity relationships of interleukin 8 determined using chemically synthesised analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis and receptor binding activities. *J. Biol. Chem.* 1991, 266: 23128-23134.
- [11] Clemons M.J., Marshall E., Durig J., Watanabe K., Howell A., Miles D., Earl H., Kiernan J., Griffiths A., Towson K., De Tkats P., Testa N.G., Dougal M., Hunter M.G., Wood L.M., Czaplewski L.G., Millar A., Dexter T.M., Lord B.I.: A randomized phase-II study of BB-10010 (macrophage inflammatory protein-1alpha) in patients with advanced breast cancer receiving 5-fluorouracil, adriamycin, and cyclophosphamide chemotherapy. *Blood* 1998, 92: 1532-1540.
- [12] Cocchi F., De Vico A.L., Garzino-Derno A., Arya S.K., Gallor R.C., Lusso P.: Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995, 270: 1811-1815.
- [13] Crump M.P., Gong J.H., Loetscher P., Rajarathnam K., Amara A., Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J., Baggiolini M., Sykes B.D., Clark-Lewis I.: Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* 1997, 16: 6996-7007.
- [14] Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., Marzio P., Marmon S., Sutton R.E., Hill C.M., Davis C.B., Peiper S.C., Schall T.J., Littman D.R., Landau N.R.: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996, 381: 661-666.
- [15] Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., Martin S.R., Huang Y., Nagashima K.A., Cayanan C., Maddon P.J., Koup R.A., Moore J.P., Paxton W.A.: HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996, 381: 667-673.
- [16] Elsner J., Mack M., Bruhl H., Dulkys Y., Kimming D., Simmons G., Clapham P.R., Schlondorff D., Kapp A., Wells T.N., Proudfoot A.E.: Differential activation of CC chemokine receptors by AOP-RANTES. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 7787-7794.
- [17] Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E., Berger E.: HIV-1 entry co-factor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G-protein coupled receptor. *Science* 1996, 272: 872-877.
- [18] Fernandez E.J., Lolis E.: Structure, function and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002, 42: 469-499.
- [19] Forster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Muller I., Wolf E., Lipp M.: CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999, 99: 23-33.
- [20] Gerard C., Rollins B.J.: Chemokines and disease. *Nature Immunol.* 2001, 2: 108-115.
- [21] Gong J.H., Ratkay L.G., Waterfield J.D., Clark L.I.: An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MLR-1pr mouse model. *J. Exp. Med.* 1997, 186: 131-137.
- [22] Grone H.J., Weber C., Weber K.C., Grone E.F., Rabelink T., Klier C.M., Wells T.N., Proudfoot A.E., Schlondorff D., Nelson P.J.: MET-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB J.* 1999, 13: 1371-83.
- [23] Gunn M.D., Kyuwa S., Tam C., Kakiuchi T., Matsuzawa A., Williams L.T., Nakano H.: Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J. Exp. Med.* 1999, 189: 451-60.
- [24] Hancock W.W., Lu B., Gao W., Csizmadia V., Faia K., King J.A., Smiley S.T., Ling M., Gerard N.P., Gerard C.: Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J. Exp. Med.* 2000, 192: 1515 - 1520.
- [25] Horuk R.: Survey: chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001, 4: 313-35.
- [26] Horuk R.: Development and evaluation of pharmacological agents targeting chemokine receptors. *Methods* 2003, 29: 369-373.
- [27] Horuk R., Ng H.P.: Chemokine receptor antagonists. *Med. Res. Rev.* 2000, 20: 155-168.
- [28] Izikson L., Klein R.S., Charo I.F., Weiner H.L., Luster A.D.: Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor, (CCR)2. *J. Exp. Med.* 2000, 192: 1075 -1080.
- [29] Lindley I.J.D., Westwick J., Kunkel S.L.: Nomenclature announcement – the chemokines. *Immunol. Today* 1993, 14, 24.
- [30] Lindow M., Lutichau H.R., Schwartz T.W.: Viral leads for chemokine-modulatory drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003, 24, 126-130.
- [31] Loetscher P., Pellegrino A., Gong J., Mattioli I., Loetscher M., Bardi G., Baggiolini M., Clark-Lewis I.: The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 2986-2991.
- [32] Maghazachi A.A.: Chemokines, G proteins and natural killer cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2000, 48: 65-72.
- [33] Marshall E., Howell A.H., Powles R., Hunter M.G., Edwards M., Wood L. M., Czaplewski L., Puttick R., Warrington S., Boyce M., Testa N., Dexter Y. M., Lord B.I., Millar A.: Clinical effects of human macrophage inflammatory protein-1 alpha MIP-1 alpha (LD78) administration to humans: a phase I study in cancer patients and normal healthy volunteers with the genetically engineered variant, BB-10010. *Eur. J. Cancer* 1998, 34: 1023-1029.
- [34] McDermott D.H., Fong A.M., Yang Q., Sechler J.M., Cupples L.A., Merrell M.N., Wilson P.W.F., D'Agostino R.B., O'Donnell C.J., Patel D.D., Murphy P.M.: Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J. Clin. Invest.* 2003, 111: 1241- 1250.
- [35] Mellado M., Rodriguez-Frade J.M., Manes S., Martinez A.C.: Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2001, 19: 397-421.
- [36] Middleton J., Patterson A.M., Gardner L., Schmutz C., Ashton B.: Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002, 100: 3853-3860.
- [37] Moatti D., Faure S., Fumeron F., Amara M.E.W., Seknadj P., McDermott D.H., Debre P., Aumont M.C., Murphy P.M., Prost D., Combadiere C.: Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 2001, 97: 1925-1928.

- [38] Muller A, Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S.N., Barrera J.L., Mohar A., Verastegui E., Zlotnik A.: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001, 410: 50-56.
- [39] Munro S., Pelham H.R.: A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 1987, 48: 899-907.
- [40] Murphy P.M., Baggiolini M., Charo I.F., Hebert C.A., Horuk R., Matsushima K., Miller L.H., Oppenheim J.J., Power C.A.: International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52: 145-176.
- [41] Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., Takakura N., Nishikawa-S., Kitamura Y., Yoshida N., Kikutani H., Kishimoto T.: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXCL12 chemokine PBSF/DDF-1. *Nature* 1996, 382: 635-638.
- [42] Ogilvie P., Bardi G., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Uguccioni M.: Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* 2001, 97: 1920-1924.
- [43] Ogilvie P., Paoletti S., Clark-Lewis I., Uguccioni M.: Eotaxin-3 is a natural antagonist for CCR2 and exerts a repulsive effect on human monocytes. *Blood* 2003, 102: 789-794.
- [44] Onuffer J.J., Horuk R.: Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002, 23: 459-467.
- [45] Ortlepp J.R., Vesper K., Mevissen V., Schmitz F., Janssens U., Franke A., Hanrath P., Weber C., Zerres K., Hoffmann R.: Chemokine receptor (CCR2) genotype is associated with myocardial infarction and heart failure in patients under 65 years of age. *J. Mol. Med.* 2003, 81: 363-367.
- [46] Plater-Zyberk C., Hoogewerf A.J., Proudfoot A.E.I., Power C.A., Wells T.N.C.: Effect of a CC chemokine receptor antagonist on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Immunol. Lett.* 1997, 57: 117-120.
- [47] Proudfoot A.E., Power C.A., Wells T.N.C.: The strategy of blocking the chemokine system to combat disease. *Immunol. Rev.* 2000, 177: 246-256.
- [48] Proudfoot A.E.I.: Chemokine receptors: multifaced therapeutic targets. *Nature Rev. Immunol.* 2002, 2: 106-115.
- [49] Proudfoot A.E.I., Buser R., Borlat F., Alouani S., Soler D., Offord R.E.: Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 32478-32485.
- [50] Proudfoot A.E.I., Power C.A., Hoogewerf A.J., Montjovent M.O., Borlat F., Offord R.E., Wells T.N.C.: Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 2599-2603.
- [51] Proudfoot A.E.I., Power C.A., Rommel C., Wells T.N.C.: Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. *Semin. Immunol.* 2003, 15: 57-65.
- [52] Proudfoot A.E.I., Wells T.N.C., Clapham P.R.: Chemokine receptors - future therapeutic targets for HIV. *Biochem. Pharmacol.* 1999, 57: 451-463.
- [53] Rollins B.J.: Chemokines. *Blood* 1997, 90: 909-928
- [54] Rossi D., Zlotnik A.: The biology of chemokines and their receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 2000, 18: 217-240.
- [55] Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cogniaux F., Forcielle C., Muyldermans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R.J., Collman R.G., Doms W.R., Vassarat G., Parmentier M.: Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996, 382: 722-725.
- [56] Schwarz M.K., Wells T.N.C.: New therapeutics that modulate chemokine networks. *Nat. Rev. Drug Disc.* 2002, 1: 347-358.
- [57] Sorensen T.L., Tani M., Jensen J., Pierce V., Lucchinetti C., Folcik V.A., Qin S., Rottman J., Sellebjerg F., Strieter R.M., Frederiksen J.L., Ransohoff R.M.: Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 1999, 103: 807-15.
- [58] Szekanecz Z., Kim J., Koch A.E.: Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunol.* 2003, 15: 15-21.
- [59] Tachibana K., Hirota S., Iizasa H., Yoshida K., Kataoka Y., Kitamura Y., Matsushima K., Yoshida N., Nishikawa S., Kishimoto T., Nagasawa T.: The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998, 393: 591-594.
- [60] Voigt I., Camacho S.A., de Boer B.A., Lipp M., Forster R., Berek C.: CXCR5-deficient mice develop functional germinal centers in the splenic T cell zone. *Eur. J. Immunol.* 2000, 30: 560-567.
- [61] Waśniowska K.: Ludzkie receptory chemokin: budowa i funkcja. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1999, 53: 583-600.
- [62] Waśniowska K.: Glikoproteina Duffy jako antygen i białko wiążące chemokiny. *Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im L. Hirszfelda we Wrocławiu* 2001, 1-86.
- [63] White J.R., Lee J.M., Young P.R., Hertzberg R.P., Jurewicz A.J., Chaikain M.A., Widdowson K., Foley J.J., Martin L.D., Griswold D.E., Sarau H.M.: Identification of potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 10095-10098.
- [64] Yang A.G., Bai X., Huang X.F., Yao C., Chen S.: Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 11567-11572.
- [65] Zlotnik A., Morales J., Herdick J.A.: Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Critical Rev. Immunol.* 1999, 19: 1-47.
- [66] Zlotnik A., Yoshie O.: Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000, 12: 121-127.
- [67] Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D.R.: Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998, 393: 595-599.

