

P. 2. n° 86.220

4.

CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.

E

ROCKEFELLER UNIVERSITY

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTI-MICROBIANAS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE AS CONTEM"

A presente invenção efectuou-se com o apoio do Governo sob os números de concessão CA 22090 e CA 43610 do "National Cancer Institute" e sob os números de concessão AI 07012 e AI 20516 do "U.S. Public Health Service". O Governo dos Estados Unidos da América possui alguns direitos nesta invenção.

Antecedentes da Invenção

Nesta memória descritiva referem-se diversas publicações por números árabes entre parenteses. As indicações completas sobre estas referências podem encontrar-se no fim da memória descritiva imediatamente antes das reivindicações. A apresentação das referências a estas publicações na sua globalidade incorpora-se nesta memória descritiva no sentido de descrever mais completamente o estado da técnica ao qual pertence a presente invenção.

Os granulócitos são os componentes fundamentais de pelo menos dois sistemas de defesa do hospedeiro contra as infecções microbianas oportunistas. Num destes sistemas, os leucócitos poli-morfonucleares (PMNs) produzem intermediários que reagem com o oxigénio, os quais destroem directa ou indirectamente os microrganismos invasores. O outro sistema depende de mecanismos

que são independentes das manifestações respiratórias (1-3). Há muito tempo que as proteínas derivadas de neutrófilos são consideradas como componentes implícitos desta via microbiana independente das manifestações respiratórias (4-6). Fez-se já a sequenciação de um grupo de baixo peso molecular (menor do que 4kD) de péptidos antibióticos de neutrófilos humanos, designados por defensinas, e demonstrou-se que estão imuno-histoquimicamente localizados nos grânulos de azurófilo (7). Estes péptidos demonstram in vitro efeitos anti-bacterianos, anti-fúngicos e anti-virais, os quais estão altamente dependentes de muitos factores, incluindo o pH, a potência iónica, e a concentração do cálcio e do magnésio. Além disso, o modo de acção destes péptidos e a sua contribuição actual para a actividade anti-microbiana in vivo, constituem uma matéria em debate.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona uma composição de material útil como agente anti-microbiano. Esta composição de material é constituída por pelo menos dois polipéptidos seleccionados entre o grupo constituído pelos polipéptidos de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo pesos moleculares aparentes de 3 500 daltons, 13000 daltons, 18000 daltons, 29 000 daltons e 54 000 daltons aproximadamente. Esta composição de material possui actividade de anti-microbiana independente da função respiratória, contra bactérias e fungos para valores do pH compreendidos entre cerca de 5,0 e 8,0 aproximadamente e para concentrações dos iões cálcio até cerca de 10 mM, actividade bactericida para concentrações do cloreto de sódio até cerca de 0,3 M, e actividade fungicida para concentrações do cloreto de sódio até cerca de 0,15 M.

A presente invenção também proporciona um método para a preparação de uma composição de material útil como agente anti-microbiano. Este método consiste essencialmente em separar os leucócitos poli-morfonucleares do sangue de modo a obter-se uma preparação rica em leucócitos poli-morfonucleares. Faz-se uma suspensão da preparação rica em leucócitos poli-morfonucleares num tampão adequado, trata-se a suspensão resultante com um inibidor de protease adequado, e tratam-se as células em suspensão sob condições proporcionadas pela lisina de modo a obter-se uma suspensão de leucócitos lisados. Trata-se a suspensão de leucócitos lisados com um agente quelante e depois centrifuga-se a suspensão tratada de modo a obter-se uma fase de núcleos/células não desagregadas e um sobrenadante pós-nuclear. Recolhe-se o sobrenadante pós-nuclear, fracciona-se em gradiente de densidade e recolhe-se a fracção que contém os grânulos azurófilos e faz-se uma suspensão num tampão que possua um pH próximo de 7,0. Trata-se a suspensão resultante de grânulos azurófilos com um reagente que possua um pH inferior a 8,0 aproximadamente e susceptível de solubilizar as proteínas da membrana dos azurófilos. A suspensão tratada separa-se numa fase sólida e num sobrenadante e depois recolhe-se o sobrenadante, obtendo-se assim a composição de material útil como agente anti-microbiano.

A presente invenção também proporciona um polipéptido purificado que é constituído por um polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo um peso molecular estimado de 24 823 daltons e a sequência de aminoácidos apresentada na Figura 20, ou um fragmento que daí derive.

A presente invenção também proporciona outro polipéptido purificado útil como agente anti-microbiano. Este polipéptido é constituído por um polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo um peso molecular aparente de aproximadamente 18 000 daltons.

Além disso, ainda proporciona um polipéptido purificado útil como agente anti-microbiano constituído por um polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo um peso molecular aparente de aproximadamente 54 000 daltons. O polipéptido também possui actividade anti-bacteriana independente das manifestações respiratórias para valores de pH compreendidos entre 5,0 e 8,0 aproximadamente, para concentrações dos iões cálcio até cerca de 10mM, e para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,3 M.

Proporciona também um polipéptido purificado útil como agente anti-microbiano constituído por um polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo um peso molecular aparente de aproximadamente 29 000 daltons, actividade anti-microbiana independente das manifestações respiratórias, contra as bactérias e contra os fungos para valores de pH compreendidos entre 5,0 e 8,0 aproximadamente e para concentrações dos iões de cálcio até cerca de 10 mM, actividade bactericida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,3 M, e actividade fungicida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,15 M.

A presente invenção também proporciona um polipéptido purificado útil como agente anti-microbiano. Este polipéptido é constituído por um polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo um peso molecular aparente de aproximadamente 25 000 daltons. O polipéptido possui actividade anti-microbiana independente das manifestações respiratórias, contra as bactérias e contra os fungos para valores de pH compreendidos entre 5,0 e 8,0 aproximadamente e para concentrações dos iões cálcio até cerca de 10mM, actividade bactericida para concentrações do cloreto de sódio até cerca de 0,3 M e actividade fungicida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,15 M.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1. Distribuição Sub-Celular de Actividade
Bactericida nos Neutrófilos Humanos

(A) Distribuição de marcadores para os grânulos azurófilos (mieloperoxidase), grânulos específicos (vitamina B12 ligada a proteína), e membrana de plasma (fosfato alcalino).

(B) Perfil de actividade bactericida. Extraiu-se cada fracção com 0,05 M de glicina/HCl, pH 2,0, centrifugou-se a 10 000 x g durante 20 minutos e incubou-se o sobrenadante com E. coli K12, para uma concentração de proteína de 5 microgramas/mililitro. Apresenta-se aqui a percentagem de bactérias mortas decorridos 30 minutos de incubação a 37°C. A inserção gráfica (C) apresenta a quantidade de proteína de azurófilos purificados (●) e de grânulos específicos purificados (Δ) necessárias para produzir uma redução de 50% nas unidades de formação de colónias bacterianas (LD₅₀).

Figura 2. Perfil de Actividade Fungicida e Bactericida em
Gradiente "Percoll" de Sobrenadante Pós-Nuclear
de Células HL60

(---) = turvação (OD₄₅₀);

Barras a cheio = perfil de actividade bactericida;

Barras tracejadas = perfil de actividade fungicida.

Figura 3. Associação à Membrana de um Factor Bactericida Derivado de Azurófilos (ADBF)

Fez-se a lisão de grânulos azurófilos isolados em tampão de redução (pH 7,3, ver "Materials and Methods") por tratamento de congelação/descongelação/sonicação e centrifugação. Extraíu-se a pH 2,0 o sobrenadante (■), o material aglomerado (●) e os grânulos totais (Δ), e testou-se a sua actividade bactericida.

Figura 4. Efeito do pH sobre a Extração de um Factor Bactericida a Partir de Membranas de Grânulos Azurófilos

Fez-se a adição de aliquotas de membranas de azurófilos a diversos sistemas tampão (0,05 M): glicina, pH 2,0-3,0; citrato, pH 4,0-6,0; fosfato, pH 7,0. Após incubação a 25°C durante 40 minutos fez-se a centrifugação das suspensões a 10 000 x g durante 20 minutos e ensaiou-se a actividade bactericida e o teor em proteínas dos sobrenadantes. As unidades de aniquilação, U.A. (Killing Units, K.U.) correspondem ao inverso do número de microgramas/mililitro de proteína necessária para matar 10⁵ bactérias em 30 minutos a 37°C. Em qualquer dos casos, o ensaio bactericida efectuou-se em tampão citrato 0,05 M, pH 5,5.

Figura 5. Actividade Bactericida de Extracto de Grânulos Azurófilos em Concentrações Crescentes de Bactérias.

Preparou-se o extracto de grânulos conforme descrito em "Materials and Methods". A cada concentração bacteriana testada adicionou-se 30 microgramas/mililitro (●), 3 microgramas/mililitro (Δ), 0,3 microgramas/mi-

L.

lilitro (■), ou 0,03 microgramas/mililitro (▲) do extracto de azurófilos.

Figura 6. Cinética da Actividade Bactericida de Um Factor Bactericida derivado de Azurófilos (ADBF)

Fez-se a incubação de células *E. coli* K12 (2×10^5 CFU/ml) com 1,4 microgramas/mililitro (●) ou 0,7 microgramas/mililitro (Δ) de extracto de grânulos azurófilos em tampão de citrato 0,05 M, pH 5,5, e apenas com tampão citrato (H).

Figura 7. Efeito do pH na Actividade Bactericida de um Factor Bactericida derivado de Azurófilos

Fez-se a incubação de células *E. coli* K12 ($2,5 \times 10^5$ CFU/mililitro) durante 30 minutos a 37°C com 2,8 microgramas/mililitro (●) ou 0,7 microgramas/ml (Δ) de extracto de grânulos azurófilos em tampão de citrato a pH 5 e 5,5 e em tampão de fosfato de sódio ou fosfato de sódio/citrato para pH entre 6,0 e 8,0.

Figura 8. Efeito do pH sobre a Actividade Bactericida de um Factor Bactericida derivado das Células HL60

Fez-se a incubação de células *E. coli* K12 (2×10^5 CFU/ml) durante 30 minutos a 37°C com 1,25 microgramas/ml (●) ou 0,625 microgramas/ml (■) de extracto de grânulos bruto de HL60 em 50mM de tampão de citrato, pH 5, 5,5, e 6, e em 50 mM de tris-HCl, pH 7 e 8.

Figura 9. Efeito dos Iões Ca^{2+} sobre a Actividade Bactericida
de um Factor Bactericida derivado de Azurófilos

Fez-se a incubação de células *E. coli* K12 ($2,5 \times 10^5$ CFU/ml) durante 30 minutos a 37°C com 2,8 microgramas/ml de extracto de grânulos azurófilos em tampão de citrato 0,05 M, pH 5,5, acrescentado com CaCl_2 conforme se indica.

Figura 10. Efeito dos Iões Ca^{2+} sobre a Actividade Bactericida
de um Factor Bactericida derivado das células HL60

Fez-se a incubação de células *E. coli* K12 (2×10^5 CFU/ml) durante 30 minutos a 37°C com 1,25 microgramas/ml de extracto de grânulos bruto de HL60 em tampão de citrato 0,5 M, pH 5,5, acrescentado com CaCl_2 .

Figura 11. Efeito da Concentração de Cloreto de Sódio sobre a
Actividade Bactericida de um Factor Bactericida
derivado de Azurófilos

Fez-se a incubação de células *E. coli* K12 ($2,5 \times 10^5$ CFU/ml) durante 30 minutos a 37°C com 2,8 microgramas/ml (●) ou 1,4 microgramas/ml (Δ) de extracto de grânulos azurófilos em tampão de citrato 0,05 M, pH 5,5, acrescentado com NaCl conforme indicado. A seta indica a concentração de plasma em NaCl.

Figura 12. Mediu-se a Actividade Fungicida de ADBF em Diversos Momentos e para Diversas Concentrações

- (■) = 1,6 microgramas de ADBF/ml
- (Δ) = 3,2 microgramas de ADBF/ml
- (□) = 8 microgramas de ADBF/ml
- (○) = 16 microgramas de ADBF/ml
- (●) = elemento de controlo

Figura 13. Cromatografia Líquida de Elevada Resolução de Fase Inversa do ADBF

Efectuou-se a cromatografia líquida de elevada resolução de fase inversa conforme descrito em "Materials and Methods". Fez-se o controlo da coluna a 214 nm (0,5 AUFS) e recolheram-se fracções de 1 ml. Para o ensaio, secaram-se 100 microlitros de cada fracção num aparelho "Savant Speed-Vac[®]", fez-se nova suspensão em 100 microlitros de ácido acético a 0,1 %, secou-se novamente e voltou a fazer-se uma suspensão em 160 microlitros de citrato 0,05 M, pH 5,5. Adicionou-se 40 microlitros de células *E. coli* K12 para proporcionar uma concentração final de 2×10^5 CFU/ml e fez-se a incubação a 37°C durante 30 minutos. As áreas tracejadas indicam as regiões de 100 % de aniquilação. O Painel A representa ADBF bruto; o Painel B representa ADBF purificado em TSK (pico a 50-60 KD); e o Painel C representa ADBF purificado em TSK (pico a 10-20 KD).

Figura 14. Análise de Sequência N-terminal de Proteínas derivadas de Azurófilos purificadas por Cromatografia Líquida de Elevada Resolução de Fase Inversa (Designação por uma Letra)

Apresenta-se os dados de sequência cumulativos (de diversas análises) correspondentes aos principais picos de fase inversa apresentados na Figura 13.

Pico 1 = defensina; Pico 4 = catepsina G;
Pico 5a = lisozima; e Pico 8 = elastase.

Figura 15. Cromatografia de Exclusão de ADBF

Fez-se a experiência com 1 mg de ADBF numa coluna de exclusão de TSK conforme aqui descrito.

(●) = perfil de actividade bactericida
(▲) = perfil de actividade fungicida
(-) = perfil de UV.

Figura 16. Ensaio SDS-PAGE de ADBF e de Fracções obtidas por Cromatografia de Exclusão TSK

Recolheu-se o ADBF e diversas fracções de ADBF do cromatograma apresentado na Figura 15 e ensaiaram-se sob condições de redução em gel de 15% de

SDS/poliacrilamida. Bandas 1 e 10 = marcadores de baixo peso molecular; banda 2 = fracção 58; banda 3 = fracção 41; banda 4 = fracção 34; banda 5 = fracção 33; banda 6 = fracção 32; banda 7 = fracção 31; banda 8 = fracção 30; e banda 9 = ADBF antes da cromatografia de exclusão.

Figura 17. Ensaio SDS-PAGE do Pico 9 de RPHPLC em TSK

Introduziu-se a fracção do Pico 9 proveniente da RPHPLC (Figura 13) em gel de redução de 10% de SDS/poliacrilamida.

1 e 3 = marcadores de pesos moleculares;
2 = Pico 9.

Figura 18. Ensaio SDS-PAGE do Pico 5b de RPHPLC em TSK

Analisaram-se fracções consecutivas de RPHPLC correspondentes a tempos de eluição entre 45-65 minutos, em gel de 12% de SDS/poliacrilamida.

A banda 8 contém o Pico 5b (da Figura 13C) e a banda 11 contém o material inicial, o qual era constituído pela fracção 42 de Pico de TSK.

Figura 19. RPHPLC de Factor Bactericida (BF) derivado das Células HL60 Purificadas em TSK

Figura 20. Sequências de proteína de DNA de Polipéptidos de ADBF de 25 000 daltons/13 000 daltons

Figura 21. Cromatografia de Exclusão de ADBF em Concentração elevada de sal

Analisou-se o ADBF por cromatografia de exclusão em TSK em 50 mM de glicina, pH 2, 500 mM de NaCl.

(●) = perfil de actividade bactericida

(▲) = perfil de actividade fungicida

(-) = perfil UV₂₈₀.

Figura 22. Ensaio SDS-PAGE de Fracções Obtidas a Partir de Cromatografia de Exclusão em TSK em Concentração elevada de Sal

Obtiveram-se diversas fracções de ADBF a partir do cromatograma apresentado na Figura 21.

Bandas 1 e 3 = a extracto de ADBF; bandas 2 e 12 = marcadores de peso molecular; bandas 4 e 5 = fracções 34 e 35, respectivamente (p54); banda 6 = fracção 36; bandas 7, 8 e 9 = fracções 37, 38 e 39, respectivamente (p29); banda 10 = fracção 43 (principalmente p14); banda 11 = fracção 45 (p18 + p14).

Descrição Formenorizada da Invenção

A presente invenção proporciona uma composição de material útil como agente anti-microbiano. A presente composição de material é constituída pelo menos por 2 polipéptidos seleccionados entre o grupo constituído por polipéptidos de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo um peso

molecular aparente de 3 500 daltons, 13 000 daltons, 18 000 daltons, 29 000 daltons e 54 000 daltons aproximadamente. Nesta memória descritiva o termo "leucócito poli-morfonuclear" significa um leucócito poli-morfonuclear, neutrófilo, célula precursora de neutrófilo e célula leucémica promielocítica. Esta composição de material possui actividade anti-microbiana independente das manifestações respiratórias, sobre bactérias e fungos para valores de pH entre 5,0 e 8,0 aproximadamente e para concentrações dos iões cálcio até cerca de 10 mM, actividade bactericida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,3 M e actividade fungicida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,15 M.

Num outro aspecto da presente invenção, os polipéptidos de leucócitos poli-morfonucleares humanos derivam das células HL60. Noutro aspecto da presente invenção, os polipéptidos de leucócitos poli-morfonucleares humanos derivam de células KG-1. Ainda noutro aspecto da presente invenção, os polipéptidos de leucócitos poli-morfonucleares humanos derivam de grânulos azurófilos.

Ainda noutro aspecto da presente invenção o polipéptido que possui um peso molecular aparente de aproximadamente 3 500 daltons é a defensina.

Noutro aspecto da presente invenção, o polipéptido que possui um peso molecular aparente de aproximadamente 13 000 daltons é constituído pelo polipéptido de 12 867 daltons apresentado na Figura 20, desde o aminoácido 105 até ao aminoácido 220. Ainda noutro aspecto da presente invenção, qualquer dos polipéptidos que possuem pesos moleculares aparentes de 18 000, 29 000 e 54 000 daltons aproximadamente, podem estar presentes num extracto de grânulos azurófilos.

Ainda noutro dos seus aspectos, o polipéptido que possui um peso molecular aparente de aproximadamente 29 000 daltons é a elastase,

cathepsina G, ou um polipéptido na fracção de extracto de grânulos azurófilos correspondente aos picos 6 ou 7 na Figura 13A. Considerando ainda um aspecto adicional da presente invenção, o polipéptido que possui um peso molecular aparente de aproximadamente 54 000 daltons é constituído pela sequência de aminoácidos N-terminal Val-Asn-Pro-Gly-Val-Val-Val-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Gly-Leu-Asp-Tyr-Ala-Ser-Gln-Gln-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gln-X-X-Leu-Lys-His-Ile-Lys-Ile-Pro-Asp-Tyr-Leu.

A composição da presente invenção pode utilizar-se como conservante desinfectante ou como agente terapêutico. As bactérias contra as quais a presente composição de material possui actividade bactericida, englobam as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os exemplos de tais bactérias Gram-positivas são Staphylococcus aureus, Streptococcus β -hemolyticus, por exemplo, Streptococcus pneumoniae, e Listeria. Os exemplos das bactérias Gram-negativas são Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, e Salmonella typhimurium. Em adição, os fungos contra os quais a presente composição actua como agente anti-microbiano, englobam leveduras. Noutro aspecto da invenção, a levedura é Candida albicans.

A composição objecto da presente invenção retém mais do que 80% da sua actividade anti-microbiana independente do oxigénio, após armazenagem durante 7 dias a pH 2,0 aproximadamente e a cerca de 4°C.

Também se proporciona um método para aniquilar bactérias ou fungos. Esse método consiste em fazer compactar as bactérias ou os fungos com uma quantidade eficaz para aniquilar bactérias ou fungos, de uma composição de material proporcionado pela presente invenção, dissolvida tipicamente num tampão apropriado. Os exemplos de tampões apropriados são conhecidos na especialidade e englobam o tampão fosfato ou a solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato para um pH fisiológico.

A presente invenção ainda proporciona uma composição farmacêutica útil para o tratamento de infecções bacterianas ou fúngicas. Esta composição farmacêutica é constituída por uma quantidade eficaz para aniquilar bactérias ou fungos, da composição de material da presente invenção e por um veículo farmacêuticamente aceitável. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis são conhecidos da técnica e estão descritos na Farmacopeia dos Estados Unidos e no "National Formulary".

Dependendo das aplicações específicas contempladas, as composições farmacêuticas proporcionadas pela presente invenção podem formular-se sob a forma de solução, suspensão, preparação parental, pomada, creme, loção, "spray", pó, comprimido ou cápsula. As preparações parentais podem englobar um veículo tal como a água isenta de pirogêneos especialmente destilada, tampão de fosfatos, ou solução normal de cloreto de sódio. Os unguentos, cremes, loções e "sprays" podem englobar um veículo tal como um óleo vegetal ou mineral, parafina líquida, ou um álcool de elevado peso molecular, isto é, com mais de 12 átomos de carbono. Os comprimidos ou cápsulas podem englobar diluentes, por exemplo, lactose, agentes de ligação, lubrificantes, por exemplo ácido esteárico, e um agente de desagregação, por exemplo, amido de milho.

Também se proporciona um método para o tratamento de um paciente portador de uma infecção bacteriana ou fúngica, que consiste em administrar-se ao paciente uma quantidade eficaz aniquiladora de bactérias ou de fungos, da composição farmacêutica da presente invenção.

A invenção proporciona ainda um método para a preparação de uma composição de material útil como agente anti-microbiano. Este método consiste essencialmente em se separar os leucócitos poli-morfonucleares do sangue de modo a obter-se uma preparação rica em leucócitos poli-morfonucleares.

Faz-se uma suspensão desta preparação num tampão adequado, por exemplo, tampão de fosfato, trata-se a suspensão resultante com um inibidor de protease adequado, por exemplo, fluoro-fosfato de di-isopropilo, e tratam-se as células em suspensão sob condições de lise, de modo a obter-se uma suspensão de leucócitos lisados. Trata-se a suspensão de leucócitos lisados com um agente quelante adequado, por exemplo, EDTA ou o agente quelante de cálcio EGTA, e depois centrifuga-se a suspensão tratada, de modo a obter-se uma fase de núcleos/células não cindidos e um sobrenadante pós-nuclear. Recolhe-se o sobrenadante pós-nuclear e fracciona-se em gradiente de densidade, e recolhe-se a fracção que engloba os grânulos azurófilos e faz-se uma suspensão em tampão que possua um pH de aproximadamente 7,0, por exemplo, o tampão aqui descrito. Trata-se a suspensão resultante de grânulos azurófilos com um reagente que possua um pH inferior a 8,0 aproximadamente e susceptível de solubilizar as proteínas da membrana dos azurófilos. A suspensão tratada separa-se numa fase sólida e num sobrenadante, e depois recupera-se o sobrenadante, obtendo-se assim a composição de material útil como agente anti-microbiano.

Num aspecto da presente invenção, o inibidor de protease adequado é fluoro-fosfato de di-isopropilo. Noutro aspecto da invenção, obtem-se a amostra sanguínea a partir de um ser humano. Ainda noutro aspecto da presente invenção, a preparação rica em leucócitos poli-morfonucleares é constituída por mais de 95% de leucócitos poli-morfonucleares e menos do que 3% de eosinófilos. Ainda noutro aspecto da invenção, trata-se a suspensão de leucócitos poli-morfonucleares por cavitação em azoto para proporcionar uma suspensão de leucócitos lisados.

Num aspecto adicional da invenção, o gradiente de densidade utilizado para fraccionar o sobrenadante pós-nuclear consiste num gradiente de

densidade "Percoll" descontinuo. Ainda noutro aspecto da presente invenção, separa-se o material fraccionado dos grânulos azurófilos antes de se fazer a suspensão, num tampão neutro, dos grânulos azurófilos recolhidos.

Ainda noutro aspecto desta invenção, pode tratar-se a suspensão de grânulos azurófilos de modo a lisar os grânulos azurófilos e recuperam-se os fragmentos de membrana resultantes. Estes fragmentos de membrana recuperados tratam-se depois com um reagente de extracção de modo a obter-se uma suspensão de reagente de extracção/membrana de azurófilos. Noutro aspecto da presente invenção, o reagente de extracção possui um pH inferior a 4,0. Noutro aspecto desta invenção, o reagente de extracção possui um pH de 2,0 aproximadamente. Ainda num aspecto adicional da presente invenção, o reagente de extracção é um detergente não iónico que possui um pH de 7,0 aproximadamente.

A presente invenção também proporciona um polipéptido purificado útil como agente anti-microbiano. Este polipéptido é constituído por polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos que possui um peso molecular avaliado em 24 823 daltons e uma sequência de aminoácidos apresentada na Figura 20, ou um fragmento daí derivado. Também se proporciona uma molécula de DNA que codifica este polipéptido, que consiste na sequência nucleotídica apresentada na Figura 20.

No contexto da presente invenção deve subentender-se que existem variações nas proteínas e ácidos nucleicos entre os indivíduos, por exemplo, substituições de aminoácidos ou nucleótidos, deleções, inserções, e grau ou localização de glicosilação, pelo que os derivados funcionais daí resultantes estão englobados no âmbito da presente invenção.

Num aspecto da presente invenção, o polopéptido purificado possui

um peso molecular aparente de 13 000 daltons aproximadamente. Num aspecto preferencial da presente invenção, o polipéptido possui um peso molecular avaliado em 12 867 daltons. Este polipéptido pode englobar a sequência de aminoácidos apresentada na Figura 20, desde o aminoácido 105 até ao aminoácido 220. Proporciona-se uma molécula de DNA que codifica este polipéptido. Noutro aspecto, a molécula de DNA é constituída pela sequência de DNA apresentada na Figura 20, desde o nucleótido 369 até ao nucleótido 716. Ainda noutro aspecto da presente invenção, o polipéptido possui um peso molecular aparente de 13 000 daltons aproximadamente. Também se proporciona uma molécula de DNA que codifica este polipéptido.

Também se proporciona um método para aniquilar um microrganismo, por exemplo, uma bactéria, fungo, ou um vírus. Este método consiste em fazer-se contactar o microrganismo com uma quantidade eficaz que anula o microrganismo, do polipéptido que possui um peso molecular avaliado em 24 823 daltons ou um seu fragmento, proporcionados pela presente invenção.

Também se proporciona um vector que é constituído pela molécula de DNA que codifica o polipéptido da presente invenção possuindo um peso molecular avaliado em 24 823 daltons ou um seu fragmento. Num aspecto da presente invenção o vector engloba um plasmídeo. Além disso, Proporciona-se um sistema de vector hospedeiro para a produção do polipéptido de 24 823 daltons, ou de um seu fragmento, o qual é constituído por um plasmídeo da presente invenção num hospedeiro adequado. Este sistema de vector hospedeiro pode desenvolver-se sob condições adequadas que permitam a produção do polipéptido de 24 823 daltons da presente invenção, ou de um seu fragmento, e pode recuperar-se o polipéptido resultante.

Também se proporciona um método para a preparação do polipéptido purificado de 24 823 daltons, ou de um seu fragmento, o qual consiste em

se fazer uma cultura de células precursoras neutrófilas, recolher as células e com elas fazer uma suspensão num tampão adequado. Trata-se a suspensão resultante de células precursoras neutrófilas de modo a obter-se uma suspensão de células precursoras neutrófilas lisadas, separa-se a suspensão de modo a obter-se uma fase de núcleos e células não cindidas e um sobrenadante pós-nuclear. Recupera-se o sobrenadante pós-nuclear e trata-se com um reagente de extracção possuindo um pH inferior a 8,0 aproximadamente e susceptível de solubilizar as proteínas da membrana, de modo a obter-se uma fase de reagente de extracção e uma fase de membrana insolúvel. A fase de reagente de extracção separa-se da fase de membrana insolúvel de modo a obter-se uma fase de proteína solúvel e uma fase de membrana insolúvel. Recupera-se a fase de proteína solúvel e purifica-se de modo a obter-se um polipéptido de 24 823 daltons da presente invenção, ou um seu fragmento.

Num aspecto da presente invenção, as células precursoras de neutrófilos são células HL60. Noutro aspecto da invenção, antes de se tratar a suspensão de células precursoras de neutrófilos de modo a obter-se uma suspensão de neutrófilos lisados, trata-se a suspensão com um inibidor de protease adequado. Noutro aspecto da invenção, antes de se separar a suspensão dos neutrófilos lisados, trata-se a suspensão com um agente quelante adequado.

Ainda noutro aspecto da presente invenção, purifica-se a fase de proteína solúvel por cromatografia de permuta iónica. Além disso, a fase de proteína solúvel pode purificar-se por cromatografia de exclusão, cromatografia de afinidade ou cromatografia de imuno-afinidade.

A presente invenção também proporciona uma composição farmacêutica que é constituída por um polipéptido de 24 823 daltons, ou por um seu fragmento, aqui proporcionados e por um veículo farmacêuticamente aceitável. Esta composição farmacêutica pode utilizar-se para tratar um

paciente portador de uma infecção bacteriana ou fúngica, por administração a esse paciente de uma quantidade eficaz para aniquilar bactérias ou fungos, da composição farmacêutica.

A presente invenção ainda proporciona outro polipéptido purificado útil como agente anti-microbiano. Este polipéptido é constituído por um polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos que possui um peso molecular aparente de 18 000 daltons aproximadamente. Num dos aspectos desta invenção, o polipéptido possui actividade anti-microbiana independente das manifestações respiratórias, contra bactérias e fungos, para valores de pH compreendidos entre 5,0 e 8,0 aproximadamente e para concentrações dos iões cálcio até cerca de 10mM, actividade bactericida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,3 M e actividade fungicida para concentrações do cloreto de sódio até cerca de 0,15 M. Noutro aspecto da presente invenção, o polipéptido engloba a sequência de aminoácidos N-terminal X-Pro-Pro-Gln-Phe-Thr-X-Ala-Gln-X-Phe-Ala-Ile-Gln-X-Ile-X-Leu-Asn-Pro.

Também se proporciona um método para aniquilar um microrganismo. Este método consiste em fazer contactar o microrganismo com uma quantidade eficaz aniquiladora de microrganismos, do péptido de 18 000 daltons da presente invenção.

Ainda se proporciona uma molécula de DNA que codifica o polipéptido de 18 000 daltons da presente invenção. Também se proporciona um vector que incorpora a molécula de DNA da presente invenção. Num aspecto desta invenção, o vector inclui um plasmídeo. Além disso, proporciona-se um sistema vector hospedeiro para a produção do polipéptido de 18 000 daltons da presente invenção, o qual é constituído por um plasmídeo da presente invenção num hospedeiro adequado. Este sistema de vector hospedeiro pode

desenvolver-se sob condições adequadas que permitam a produção do polipéptido de 18 000 daltons da presente invenção, e recolhe-se o polipéptido resultante.

Também se proporciona um método para a preparação do polipéptido de 18 000 daltons da presente invenção, o qual consiste em se fazer a cultura de células precursoras de neutrófilos, recolher as células e fazer com elas uma suspensão num tampão adequado. Trata-se a suspensão de células resultante, precursoras de neutrófilos de modo a obter-se uma suspensão de células precursoras de neutrófilos lisadas, e separa-se a suspensão de modo a obter-se uma fase de núcleos e de células não cindidas e um sobrenadante post-nuclear. Recupera-se o sobrenadante post-nuclear e trata-se com um reagente de extracção que possua um pH inferior a 8,0 e susceptível de solubilizar as proteínas da membrana de modo a obter-se uma fase de reagente de extracção e uma fase de membrana insolúvel. A fase de reagente de extracção separa-se da fase de membrana insolúvel de modo a obter-se uma fase de proteína solúvel e uma fase de membrana insolúvel. Recupera-se a fase de proteína solúvel e purifica-se de modo a obter-se um polipéptido de 18 000 daltons.

Num aspecto da presente invenção, as células precursoras de neutrófilos são células HL60. Noutra aspecto desta invenção, antes de se tratar a suspensão de células precursoras de neutrófilos de modo a obter-se uma suspensão de neutrófilos lisados, trata-se a suspensão com um inibidor de protease adequado. Noutra aspecto da invenção, antes de se separar a suspensão de neutrófilos lisados, trata-se a suspensão com um agente quelante adequado.

Ainda noutra aspecto desta invenção, purifica-se a fase de proteína solúvel por cromatografia de permuta iónica. Além disso, a fase de proteina solúvel pode ser purificada por cromatografia de exclusão, cromato-

grafia de afinidade ou cromatografia de imuno-afinidade.

A presente invenção também proporciona uma composição farmacêutica constituída pelo polipéptido de 18 000 daltons aqui proporcionado, e por um veículo aceitável em farmácia. Esta composição farmacêutica pode utilizar-se para tratar um paciente portador de uma infecção por microrganismos fúngicos, administrando-lhe uma quantidade eficaz letal para os microrganismos da composição farmacêutica.

Além disso a presente invenção proporciona ainda um polipéptido purificado útil como agente antimicrobiano constituído por um polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo um peso molecular aparente de 54 000 daltons aproximadamente. Este polipéptido possui actividade anti-bacteriana independente das manifestações respiratórias, para valores de pH compreendidos entre cerca de 5,0 e 8,0 aproximadamente, para concentrações dos iões cálcio até cerca de 10 mM, e para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,3 M. Noutro aspecto da invenção, o polipéptido possui, adicionalmente, actividade anti-fúngica para valores de pH compreendidos entre cerca de 5,0 e 8,0 aproximadamente, para concentrações dos iões cálcio até cerca de 10mM, e para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,15 M.

Noutro aspecto da presente invenção, o polipéptido engloba a sequência de aminoácidos N-terminal Val-Asn-Pro-Gly-Val-Val-Val-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Gly-Leu-Asp-Tyr-Ala-Ser-Gln-Gln-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gln-X-X-Leu-Lys-His-Ile-Lys-Ile-Pro-Asp-Tyr-Leu.

Também se proporciona um método para suprimir bactérias ou fungos. Este método consiste em fazer-se contactar as bactérias ou os fungos com uma quantidade eficaz, que aniquila as bactérias ou fungos, do polipéptido de 54 000 daltons da presente invenção.

Também se proporciona uma molécula de DNA que codifica o Polipéptido de 54 000 daltons da presente invenção, e um vector que engloba a molécula de DNA. A presente invenção também proporciona um vector que incorpora o plasmídeo da presente invenção. Além disso, proporciona-se um sistema vector hospedeiro para a produção do polipéptido de 54 000 daltons da presente invenção, o qual engloba um plasmídeo da presente invenção num hospedeiro adequado. Este sistema vector hospedeiro pode desenvolver-se sob condições adequadas que permitam a produção do polipéptido de 54 000 daltons da presente invenção e depois recupera-se o polipéptido resultante.

Também se proporciona um método para a preparação do polipéptido de 54 000 daltons purificado, da presente invenção, o qual consiste em se fazer a cultura de células precursoras de neutrófilos, recolher essas células e com elas fazer uma suspensão num tampão adequado. Trata-se a suspensão resultante de células precursoras de neutrófilos de modo a obter-se uma suspensão de células precursoras de neutrófilos lisadas e separa-se a suspensão de modo a obter-se uma fase de núcleos e de células cindidas e um sobrenadante post-nuclear. Recupera-se o sobrenadante post-nuclear e trata-se com um reagente de extracção que possua um pH inferior a cerca de 8,0 e susceptível de solubilizar as proteínas da membrana de modo a obter-se uma fase de reagente de extracção e uma fase de membrana insolúvel. A fase de reagente de extracção separa-se da fase de membrana insolúvel de modo a obter-se uma fase de proteína solúvel e uma fase de membrana insolúvel. A fase de proteína solúvel recupera-se depois e purifica-se de modo a obter-se um polipéptido de 54 000 daltons.

Num aspecto desta invenção, as células precursoras de neutrófilos são células HL60. Noutro aspecto da presente invenção, antes de se tratar a suspensão de células precursoras de neutrófilos de modo a obter-se uma suspensão de neutrófilos lisados, trata-se a suspensão com um inibidor de

protease adequado. Noutro aspecto desta invenção, antes de se separar a suspensão de neutrófilos lisados, trata-se a suspensão com um agente que lante adequado.

Ainda noutro aspecto da invenção, purifica-se a fase de proteína solúvel por cromatografia de permuta iónica. Além disso, a fase de proteína solúvel pode purificar-se por cromatografia de exclusão, cromatografia por afinidade ou cromatografia por imuno-afinidade.

A presente invenção também proporciona uma composição farmacêutica que é constituída pelo polipéptido de 54 000 daltons agora proporcionado, e por um veículo farmacêuticamente aceitável. Esta composição farmacêutica pode utilizar-se para tratar um paciente portador de uma infecção bacteriana, administrando-lhe uma quantidade eficaz aniquiladora de bactérias da composição farmacêutica. Noutro aspecto desta invenção, a composição farmacêutica pode utilizar-se para tratar um paciente portador de uma infecção bacteriana ou fúngica administrando-lhe uma quantidade aniquiladora de bactérias ou de fungos da composição farmacêutica.

Proporciona-se um método para eliminar fungos, que consiste em fazer contactar os fungos com uma quantidade eficaz aniquiladora de fungos, de um polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo um peso molecular aparente de 29 000 daltons aproximadamente. Num dos seus aspectos, o polipéptido está presente num extracto de grânulos azurófilos. Noutro aspecto o polipéptido é elastase. Ainda noutro aspecto, o polipéptido é catestpsina G.

Também se proporciona uma composição farmacêutica que é constituída por um polipéptido de leucócitos poli-morfonucleares humanos possuindo um peso molecular aparente de 29 000 daltons, aproximadamente e por um veículo aceitável em farmácia. Proporciona-se um método para o tratamento de um

paciente portador de uma infecção bacteriana o qual consiste em administrar-lhe uma quantidade eficaz aniquiladora de bactérias da composição farmacêutica. Ainda se proporciona um método para o tratamento de um paciente sofrendo uma infecção fúngica, o qual consiste em administrar-lhe uma quantidade eficaz aniquiladora de fungos da composição farmacêutica.

Noutro aspecto proporciona-se um polipéptido purificado, útil como agente antimicrobiano, que engloba um polipéptido de leucócitos polimorfonucleares humanos possuindo um peso molecular aparente de 25 000 daltons, aproximadamente, actividade antimicrobiana independente das manifestações respiratórias contra bactérias e fungos, para valores de pH compreendidos entre cerca de 5,0 e 8,0 aproximadamente e para concentrações de cálcio até cerca de 10 mM e actividade bactericida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,3 M, e actividade fungicida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,15 M.

As composições, polipéptidos e métodos da presente invenção serão mais facilmente compreendidos tomando como referência os exemplos e experiências seguintes, os quais se apresentam com fins ilustrativos e não pretendem impor quaisquer limitações ao âmbito da presente invenção, a qual é definida pelas reivindicações anexas.

Materiais e Métodos

Isolamento de neutrófilos.

Aplicou-se um tratamento anticoagulante ao sangue obtido de doadores saudáveis, com 25 mM de citrato de sódio e misturou-se com igual volume de dextrano a 6% em NaCl a 0,9% para aumentar a sedimentação de eritrócitos. Decorridos 60 minutos à temperatura ambiente, recolheu-se o

sobrenadante rico em leucócitos e centrifugou-se a 200 x g durante 10 minutos. Com os agregados de células fez-se uma suspensão em NaCl a 0,9% e separaram-se os PMNs das células mono-nucleares por centrifugação através de "Ficoll-Hypaque". Removeram-se os eritrócitos contaminantes em dois ciclos sucessivos de lise hipotônica conforme descrito (8, 9). Mais do que 98% das células eram PMNs, e destas mais do que 95% eram neutrófilos e menos do que 3% eram eosinófilos. Esta preparação foi referida como neutrófila. Uma unidade de sangue proporcionou 109 neutrófilos.

Fracçãoamento sub-celular de neutrófilos

Fez-se o tratamento de neutrófilos isolados em solução salina tamponada com fosfato (2×10^7 células/ml) com 5 mM de fluoro-fosfato de diisopropilo (DFP) durante 15 minutos a 4°C. As células tratadas com DFP foram centrifugadas a 130 x g durante 10 minutos a 4°C, e com a massa de células resultante fez-se nova suspensão em tampão, arrefecido com gelo, contendo 100 mM de KCl, 3 mM de NaCl, 1 mM de ATP (Na)₂, 3,5 mM de MgCl₂, e 10 mM de "Pipes", pH 7,3 (tampão de abrandamento). Provocou-se a ruptura da suspensão de células por cavitação com azoto, durante 20 minutos a 350 psi ($350 \times 6,9 \times 10^3$ Pascal) numa bomba adequada (Parr Instrument Company, Moline, IL) a 4°C e o produto de cavitação recolheu-se no EGTA quelante do ião Ca²⁺, pH 7,4, para uma concentração final de 1,5 mM. Com os núcleos e com as células não cindidas fez-se uma massa (P₁) por centrifugação a 500 x g durante 10 minutos a 4°C. Centrifugou-se o sobrenadante post-nuclear (S₁) durante 15 minutos a 20 000 rpm (rotor SS 34) em gradiente de densidade "Percoll" descontínuo, conforme descrito (8). Recolheram-se fracções de aproximadamente de 1 ml a 4°C e fez-se o ensaio para os marcadores específicos dos grânulos azurófilos (β -glucuronidase

e mieloperoxidase), de grânulos específicos (proteína que se liga à vitamina B12) e de membrana de plasma (fosfatase alcalina) conforme descrito a seguir. Removeu-se o "Percoll" das fracções agregadas por centrifugação a 35 000 rpm (180 000 x g) durante 2 horas num rotor SW41. Com a camada que sedimentou acima do Percoll compactado, fez-se nova suspensão em tampão de abrandamento e armazenou-se em aliquotas à temperatura de 70°C.

Ensaio para os marcadores específicos em fracções sub-celulares

Para garantir solubilização completa, aliquotas de grânulos azurófilos em tampão de abrandamento foram diluídas na proporção 1:5 em "Triton X-100" (concentração final de 0,05% p/v) antes dos doseamentos de enzimas ou de proteínas. Fez-se o ensaio de fosfatase alcalina com 1 mg/ml de fosfato de p-nitro-fenilo como substrato em tampão de 0,3 mM de MgCl₂ e 50mM de barbital sódico, pH 10,5. Ensaíram-se amostras de 50 microlitros diluídas em "Triton X-100". Fez-se a incubação das amostras durante 80 minutos a 37°C na mistura de ensaio (1 ml de volume) e interrompeu-se a reacção por adição de 100 microlitros de NaOH 1N. Fez-se a leitura imediata da absorvência a 410 nm. A actividade enzimática calculou-se conforme descrito (10).

Fez-se um ensaio de β -glucuronidase por libertação de fenolftaleína a partir de 1 mM de ácido fenolftaleína- β -monoglucurónico em 100 mM de tampão de acetato de sódio, pH 4,4, a 37°C durante 3 horas. Fez-se o ensaio de amostras de 25 microlitros diluídas em "Triton X-100", em 550 microlitros de mistura de ensaio. Interrompeu-se a reacção adicionando-se 200 microlitros de 1 M de glicina, 1 M de NaCl, 1 M de NaOH e fez-se a leitura da absorvência a 550 nm. Calculou-se a actividade enzimática conforme descrito (8).

A protefna que se liga à vitamina B12 mediu-se em amostras de 25, 50 e 100 microlitros, diluidas em "Triton X-100" conforme essencialmente descrito em (11). Preparou-se ^{57}Co -Vitamina B12 misturando 5 ng/ml de vitamina B12 (Sigma) com 0,025 microcuries/ml de ^{57}Co -cianocobalamina (Amersham, sp.act. 10^5 cpm/ng). Misturou-se 750 microlitros de solução de cloreto de sódio com 350 microlitros de ^{57}Co -Vitamina B12 e com 100 microlitros de amostra para proporcionar o volume final. Depois adicionou-se 0,5 ml de albumina revestida com carvão e fez-se a centrifugação dos tubos de ensaio durante 2 minutos a 10 000 x g á temperatura ambiente. Recolheu-se 1 ml de sobrenadante e fez-se a contagem num contador de cintilação auto-gama "Packard" (Packard Instruments Co., Downers Grove, IL) para determinar a quantidade de ^{57}Co -B12 em cada amostra.

Fez-se a determinação da protefna conforme descrito em (12) utilizando como padrão albumina de soro bovino. Para evitar a interferência do Triton X-100 no ensaio, adicionou-se 0,1% de dodecil-sulfato de sódio á solução de cobre alcalina (13). O "Percoll" não afectou o ensaio na concentração em que se encontrava presente nas fracções.

Para realizar o ensaio de mieloperoxidase diluiu-se 200 microlitros de cada fracção cinco vezes em tampão de redução contendo 0,2% de "Triton X-100", e introduziu-se no compartimento da amostra de um espectro fotómetro de feixe duplo "Perkin-Elmer 557" (Coleman Instruments Division, Oak Brook, IL). Depois mediram-se os espectros de absorção, entre 400 e 600 nm, de fracções oxidadas versus fracções reduzidas com ditonite ($E_{472 \text{ nm}} = 75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (14).

Preparação de um factor bactericida derivado de azurófilos (ADBF)

Agregaram-se fracções de gradientes em "Percoll" correspondentes a

grânulos azurófilos e removeu-se o "Percoll" por centrifugação conforme descrito (8). Fez-se nova suspensão com a preparação de grânulos azurófilos em tampão de redução e conservou-se quer sobre gelo a 4°C ou a -70°C. Verificou-se que os grânulos azurófilos armazenados sobre gelo a 4°C permaneceram intactos visto que durante 2 semanas não foi possível detectar a libertação de β -glucuronidase ou de mieloperoxidase a partir dos grânulos. O congelamento dos grânulos azurófilos a -70°C originou algumas perdas (<20%) de β -glucuronidase, mas não de mieloperoxidase. Os grânulos azurófilos isolados extraíram-se com 0,05 M de tampão glicina-HCl, pH 2,0, durante 40 minutos à temperatura de 25°C. Centrifugou-se o extracto ácido a 10 000 x g durante 20 minutos e utilizou-se o sobrenadante como fonte de ADBF. O sobrenadante ou foi diluído ou foi submetido a diálise em meio de incubação antes dos ensaios bactericidas. Para a diálise dos extractos de ADBF utilizou-se um tubo de membrana com um "cut-off" de ("Spectra/Por, Spectrum Medical, Los Angeles, CA). Extraíram-se fracções de gradientes de densidade em "Percoll" seguindo os mesmos procedimentos; o "Percoll" não apresentou qualquer efeito sobre a extracção ou actividade do factor bactericida.

Ensaio da actividade bactericida

Procedeu-se à avaliação da actividade bactericida em E. coli K12 (NC 4100) em ensaios de rotina e, sempre que indicado, em Salmonella typhimurium LT2, Pseudomonas aeruginosa PAC e PAO, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, e Streptococcus pneumoniae do tipo III, tipo II e variante não capsulada de S. pneumoniae da estirpe do tipo II. Utilizou-se caldo de soja tripticase e placas de agar soja tripticase para cultivar a maioria das bactérias. No caso da S. pneumoniae, utilizou-se o meio Cy e placas de agar sangue de carneiro desfibrinado a 5% (15).

Com os organismos de uma única colónia em placas de agar inoculou-se o meio líquido e fez-se a cultura durante a noite a 37°C. Com aliquotas da cultura nocturna fez-se a inoculação de caldo nutriente fresco e deixou-se desenvolver até ao meio da fase exponencial. Depois fez-se a diluição das culturas bacterianas em meio de teste para proporcionar uma concentração apropriada. A maioria das experiências efectuou-se em tampão de citrato 0,05 M, PH 5,5. As experiências de controlo demonstraram que este tampão não afecta a viabilidade de qualquer bactéria testada excepto P. aeruginosa e S. pneumoniae do tipo II, para as quais se utilizou tampão de fosfato 0,05 M, PH 6,0. Utilizaram-se outros tampões tais como acetato, fosfato ou citrato/fosfato numa concentração de 0,01 M ou de 0,05 M em alguns ensaios bactericidas, conforme especificado a seguir.

Fez-se a incubação das bactérias (4×10^4 unidades de formação de colónias num volume final de 200 microlitros) durante 30 minutos a 37°C com diversas quantidades de extracto de grânulos azurófilos (ADBF) ou de extracto derivado de HL60 (BF) diluídos no meio de incubação. Depois fez-se a diluição das amostras na proporção 1:100 em meio mínimo M63 (16), e espalhou-se sobre placas de agar. Fez-se a contagem das unidades de formação de colónias (CFU), após incubação a 37°C durante 16 horas. A actividade bactericida exprimiu-se sob a forma de percentagem de bactérias mortas após exposição a ADBF ou BF quando comparadas com os elementos de controlo. Em alternativa, define-se uma unidade de actividade aniquiladora (A.A.) (K.U.) como sendo o inverso da diluição da preparação de ADBF ou BF necessária para matar 10^5 bactérias/ml em 30 minutos a temperatura de 37°C (DL_{50}).

Ensaio da actividade fungicida

Testou-se a actividade fungicida com Candida albicans (isolado

clínico de Columbia Presbyterian Hospital) em ensaios de rotina. Para cultivar os fungos utilizou-se caldo de Sabouraud e placas de agar de Sabouraud (Difco).

Com os organismos de uma única colónia em placas de agar fez-se a inoculação em meio líquido e a cultura durante a noite a 37°C. Com ali-quotas da cultura nocturna inoculou-se caldo nutriente fresco e deixou-se desenvolver até ao meio da fase exponencial. Depois fez-se a diluição das culturas de fungos em meio de teste para proporcionar uma concentração apropriada. As experiências efectuaram-se em 10 mM de tampão de fosfato, pH 5,5.

Fez-se a incubação de C. albicans (10^5 unidades/ml de formação de colónias) durante 60 minutos a 37°C, com quantidades variáveis de extracto de grânulos azurófilos (ADBF) ou extracto derivado de células HL60 (BF) diluídos em meio de incubação. Depois fez-se a diluição das amostras na proporção 1:100 em meio mínimo M63 (16), e espalhou-se sobre placas de agar. Fez-se a contagem das unidades de formação de colónias (CFU) após incubação a 37°C durante 30 horas.

Expressou-se a actividade fungicida como a percentagem de fungos aniquilados após a exposição a ADBF ou BF quando comparados com os elementos de controlo. Em alternativa, define-se uma unidade de actividade aniquiladora (A.A.) (I.U.) como sendo o recíproco da diluição da preparação de ADBF ou BF necessária para matar 10^5 fungos em 60 minutos a 37°C (DL_{50}).

Isolamento de membranas de grânulos azurófilos

A partir de células neutrófilas fez-se a cisão de grânulos azurófilos isolados em tampão de redução (pH 7,3) através de sete ciclos de

congelamento em banho de acetona/gelo seco e descongelamento a 37°C, seguindo-se de cada vez a imersão durante 10 segundos em banho de água sonificado (Bransen B3, "Heat Systems-Ultrasonic Inc. Plainview, NY). Depois obteve-se um material agregado por centrifugação dos grânulos lisados a 10 000 x g durante 60 minutos ou a 135 000 x g durante 6 minutos a 4°C. Este material agregado foi referenciado como membranas de grânulos azurófilos. Fez-se o ensaio da actividade ADBF das membranas de grânulos isolados e do teor de grânulos solúveis após incubação com 0,05 M de glicina, pH 2,0, conforme descrito antes.

Caracterização de ADBF por cromatografia de exclusão

Aplicou-se aproximadamente 1 mg de extracto de membrana ADBF a uma coluna de exclusão "Bio-Sil TSK-125" equilibrada quer com 50mM de glicina/0,1 M de NaCl, pH 2,0, quer com 50 mM de glicina/0,5 M de NaCl, pH 2. A partir das fracções eluídas obteve-se um perfil na D.O. 280 e os perfis fungicida e bactericida de ADBF. Efectuou-se a electroforese em dodecil-sulfato de sódio/gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) do extracto de membrana de ADBF e das fracções seleccionadas obtidas da coluna de cromatografia de exclusão.

Caracterização de ADBF por cromatografia líquida de alta resolução de fase inversa

Adicionou-se ácido trifluoroacético (TFA) a ADBF ou ADBF purificado em TSK para 0,1% e fez-se a aplicação das amostras a uma coluna de fase inversa num equipamento "Vydac" de poros de abertura C₄ (250 x 4 mm) e efectuou-se o processamento em gradiente adequado durante 92 minutos, se-

guindo-se mais 3 minutos a 100% e depois uma lavagem de 2 minutos. O dissolvente A consistia em TFA aquoso a 0,1%, o dissolvente B TFA a 0,1% em acetonitrilo de pureza HPLC. O gradiente foi o seguinte:

<u>TEMPO</u>	<u>DISSOLVENTE B</u>
0-2 minutos	0%
2-62 minutos	0-48%
62-92 minutos	48-100%
92-95 minutos	100%
95-97 minutos	0%

O equipamento utilizado foi um sistema de HPLC de fase inversa Beckman, constituído por uma coluna de fase inversa "Vydac" de poro de abertura C_4 (250 x 4 mm), duas bombas 110B, um controlador 421A, um injector 210A, uma amostra auxiliar de 2 ml, um detector de comprimento variável 163, um colector de fracção "2112 Redirac" e um registador de gráficos "Kipp and Zonen BD 41". O detector foi regulado para 214 nm, na escala de absorvência 0-0,5 unidades (AUFS) e as fracções de pico recolheram-se manualmente.

Análise da sequência de polipéptidos derivados de ADBF

Fez-se a concentração de ADBF purificado por RPHPLC e de ADBF purificado por TSK/RPHPLC até 50 microlitros num equipamento "Speed Vac[®]" e carregou-se num sequenciador de fase líquida por impulsos "Applied Biosystems 477A". A análise de fenil-tio-hidantoina (PTH) efectuou-se continuamente utilizando-se um analisador da "Applied Biosystems Model 120A PTH Analyzer".

Análise de aminoácidos de polipéptidos derivados de ADBF

A análise de aminoácidos FTC de polipéptidos obteve-se por hidrólise durante 1 hora com HCl 6,0 N a 150°C utilizando um sistema "Waters Picotag" equipado com um sistema de HPLC (CLER) da "Beckman".

Cultura de células HL60

As células HL60 (39, 40) desenvolveram-se em culturas em suspensão contendo meio basal (isento de soro) acrescentado com insulina e transferrina. As células desenvolveram-se até se obter uma densidade de 2×10^6 células/ml e recolheram-se por centrifugação. Com a massa de células fez-se nova suspensão para proporcionar 1×10^8 células/ml para fracionamento posterior.

Fracionamento subcelular das células HL60

As células HL60 em solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato (2×10^7 células/ml) foram tratadas com 5 mM de DFP durante 15 minutos a 4°C. Fez-se a centrifugação das células tratadas com DFP a 130 x g durante 10 minutos a 4°C e depois fez-se nova suspensão da massa de células resultante em tampão de redução arrefecido com gelo, contendo 100 mM de KCl, 3 mM de NaCl, 1 mM de ATP (Na) 2, 3,5 mM de MgCl₂, e 10mM de "Pipes", pH 7,3. Fez-se a cisão das células em suspensão por cavitação com azoto durante 20 minutos a 350 psi ($350 \times 6,9 \times 10^3$ Pascal) numa bomba a 4°C e recolheu-se o produto de cavitação em EGTA quelante de iões Ca²⁺, pH 7,4, para proporcionar uma concentração final de 1,5mM. Fez-se uma massa (P₁) de células não cindidas e de núcleos, por centri-

fugação a 500 x g durante 10 minutos a 4°C. Centrifugou-se o sobrenadante pós-nuclear (S₁) durante 30 minutos a 10 000 x g para proporcionar uma massa de grânulos. Com esta preparação bruta de grânulos fez-se nova suspensão em tampão de redução e armazenou-se em aliquotas a -70°C. Em alternativa, centrifugou-se o sobrenadante pós-nuclear (S₁) durante 15 minutos a 20 000 rpm (rotor SS 34) em gradiente de densidade "Percoll" descontinuo, conforme descrito em (8). Recolheram-se fracções de aproximadamente 1 ml a 4°C e ensaiou-se os marcadores específicos de grânulos azurófilos (β-glucuronidase e mieloperoxidase), os grânulos específicos (vitamina B12 que se liga à proteína) e membrana de plasma (fosfatase alcalina) conforme descrito antes. Removeu-se o "Percoll" das fracções agregadas por centrifugação a 35 000 rpm (180 000 x g) durante 2 horas num rotor SW41. Com a camada que sedimentou acima do "Percoll" compactado fez-se nova suspensão em tampão de redução e armazenou-se em aliquotas a -70°C.

Preparação de um factor bactericida (BF) derivado de células HL60

Em tampão adequado fez-se nova suspensão de fracções quer de gradientes em "Percoll" correspondentes à actividade de mieloperoxidase quer de preparações de grânulos brutos a partir de células HL60, e armazenou-se quer em gelo a 4°C quer a -70°C. Extraiu-se a preparação de grânulos bruta ou os grânulos isolados com tampão de glicina-HCl 0,05 M, pH 2,0, durante 40 minutos a 25°C. Fez-se a centrifugação do extracto ácido a 10 000 x g durante 20 minutos e diluiu-se o sobrenadante ou fez-se a sua diálise em meio de incubação antes do ensaio da actividade bactericida. Para a diálise dos extractos de BF utilizou-se um tubo de membrana com um "cut-off" de 1000 M_r (Spectra/For, Spectrum Medical, Los Angeles, CA).

Preparação e sondagem de bibliotecas de DNA de células HL60

Procedeu-se ao desenvolvimento de células HL60 humanas (ATCC CCL 240), conforme especificado, para proporcionar 1×10^6 células/ml em DMEM contendo 5% de soro de vitela fetal. Para a biblioteca induzida, efectuou-se o tratamento das células com 1% de DMSO durante 40 horas antes de se recolherem. Recolheram-se as células a 4°C e lavaram-se duas vezes com solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato (PBS). Recuperou-se a massa de células, homogeneizou-se em tampão contendo 20 mM de complexo vanadilo (Bethesda Research Laboratories) e 0,2% de Nonidet P-40, e centrifugou-se durante 10 minutos a 14 000 rpm num rotor JS-13 da "Beckman". Preparou-se o RNA a partir do sobrenadante utilizando-se a extracção com fenol/clo-roformio e submeteu-se o RNA total obtido a cromatografia de afinidade oligo-dT para se obter mRNA.

As preparações totais de mRNA de células induzidas e não induzidas utilizaram-se como modelo para preparar bibliotecas de cDNA em λ gt10, conforme descrito em (41), mas efectuando-se a síntese da segunda cadeia, de acordo com o método descrito em (42). O cDNA resultante foi ligado ao oligonucleótido sintético (CCGGAATTCGG, Bethesda Research Laboratories) e depois digerido com EcoRI. Fraccionou-se o volume do cDNA e purificou-se utilizando geles de poliacrilamida e inseriu-se no sítio EcoRI de λ gt10. A partir de RNA induzido e não induzido obtiveram-se diversos milhares de bacteriófagos. Prepararam-se filtros de sustentação em triplicado e fez-se a sondagem dos bacteriófagos, sob condições restritas moderadas (6 x SSC, 35°C) com uma mistura marcada na extremidade 5' de uma "pool" de 14 mer de 16 oligonucleótidos preparados utilizando-se comple-

mento inverso da sequência que codifica os aminoácidos 31-35 do pico 5b.

Ile-His-Asn-Phe-Asn-Ile-Asn-Tyr

CAT AAT TTT AAT AT

C C C C

SONDA 3'GTA TTA AAA TTA TA

G G G G

Resultados

Distribuição subcelular do factor bactericida

Para se determinar a localização subcelular de ANBF nos neutrófilos, fez-se o fraccionamento dos neutrófilos utilizando o método descrito (8). Tratou-se os neutrófilos com 5 mM de fluorofosfato de di-isopropilo (DFP) por se ter verificado que o DFP, é um poderoso inibidor da serina protease que inibe muito eficazmente a proteólise em extractos PMN (17, 18). Fez-se a cisão de 10^9 células tratadas com DFP, por cavitação com azoto, e centrifugou-se o sobrenadante pós-nuclear em gradiente de densidade "Percoll" descontinuo. Para cada fracção de gradiente fez-se o ensaio dos marcadores específicos dos grânulos azurófilos (mieloperoxidase), grânulos específicos (vitamina B12 que se liga a proteína) e membrana de plasma (fosfatase alcalina). Conforme se verifica pela figura 1, o método originou uma separação eficiente destes três compartimentos. Os grânulos azurófilos não apresentaram qualquer contaminação pelos marcadores de grânulos específicos ou membranas de plasma. Os grânulos específicos não foram contaminados pelas membranas de plasma, mas apresentaram alguma contaminação pelos grânulos azurófilos, conforme indicado pela presença de 10%

de mieloperoxidase neste pico.

A actividade bactericida, obtida por extracção de fracções celulares a pH 2,0, distribuiu-se conforme indicado no quadro I.

TABELA I
Distribuição de BF em Neutrófilos Humanos

Fase de purificação	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	K.U. ^a	S.A. ^b	Rendimento (%)
Produto da cavitação	9,8	0,6	1500	2500	100
Agregado	2,0	0,6	450	750	6
S1 ^c	8,8	0,46	1280	2780	97
S2 ^d	8,0	0,26	6,5	25	0,8
membrana de plasma	3,0	0,13	4,0	30	0,4
grânulos específicos	3,0	0,21	2,5	12,5	4,5
grânulos azurófilos	3,0	0,20	1430	7140	86

^a unidades aniquiladoras

^b Actividade específica (KU/mg proteína)

^c sobrenadante post-nuclear

^d citosol

A maioria da actividade do produto da cavitação estava presente no sobrenadante pós-nuclear (S_1). Verificou-se que 6% de actividade estava associada com a fracção nuclear, devido talvez à aderência de alguns grânulos aos núcleos. A localização do factor bactericida na fracção de grânulos foi ainda indicada por uma actividade específica dupla da actividade do produto de cavitação não fraccionado. Conforme se indica na Figura 1 mais de 90% do factor bactericida estava presente na fracção de grânulos azurófilos. O baixo nível de actividade presente na fracção de grânulos específicos poder-se-á atribuir aos 10% de contaminação pelos grânulos azurófilos, conforme detectado pelo ensaio de mieloperoxidase (ver a Figura 1). Na realidade, é necessário aproximadamente 10 vezes mais proteína da fracção específica do que da fracção de grânulos azurófilos para matar 50% das bactérias (ver inserção da Figura 1).

Para se determinar a localização subcelular de BF nas células HL60, fez-se o fraccionamento de células HL60 tratadas com nFP, conforme descrito para os neutrófilos tratados com nFP. Para cada fracção de gradiente "Percoll" ensaiou-se a actividade bactericida e a actividade fungicida. Conforme se indica na Figura 2, o perfil dos grânulos das células HL60 difere do perfil dos grânulos de neutrófilos, reflectindo possivelmente o facto de as células HL60 serem células precursoras de neutrófilos não diferenciadas. As actividades bactericidas e fungicidas foram superiores nas fracções 20-22. Estas fracções correspondem também às concentrações mais elevadas de actividade de mieloperoxidase.

Associação de membrana de factores bactericidas

Para determinar a localização de ADBF no interior dos grânulos azurófilos neutrófilos, os grânulos purificados intactos foram lisados a pH

neutro através de repetidas operações de congelação/descongelação e sonicação. Após a lise dos grânulos, submeteram-se a centrifugação e o conteúdo solúvel dos grânulos foi separado da massa de membranas dos grânulos. Sob estas condições, encontrou-se mais que 90% de β -glucuronidase e mieloperoxidase na fracção sobrenadante (dados não representados). Em contraste, 98% de ANBF estava associado com as membranas azurófilas, conforme indicado na Figura 3. O exame dos extractos de grânulos brutos, a partir de células HL60, também indicou a associação de BF a membrana. (dados não representados).

Também se examinou a capacidade de diversos agentes para libertarem ANBF a partir de membranas azurófilas. Ensaiou-se a actividade de ANBF no sobrenadante, e a massa obtida, após centrifugação das membranas azurófilas, tratou-se com tampões de pH variável. A Figura 4 indica que menos que 10% de actividade ANBF foi libertada a partir da membrana a pH compreendido entre 5,0-7,0, 50% a pH 4,0 e 100% a pH compreendido entre 2,0-3,0. A extracção do factor bactericida a partir de grânulos azurófilos intactos seguiu a mesma curva de pH (dados não representados). Depois fez-se o ensaio dos outros agentes normalmente utilizados para solubilizar as proteínas das membranas integrais e periféricas (ver quadro II seguinte). Fez-se a incubação de 50 microlitros de membranas azurófilas (0,5 microgramas de proteína/microlitro) a 25°C durante 40 minutos em 200 microlitros de diversos agentes atrás referidos. Após centrifugação a 10 000 x g durante 20 minutos (4°C), recolheram-se os sobrenadantes e fez-se a diálise em 0,05 M de citrato a pH 5,5 e testou-se para avaliar as proteínas e a actividade bactericida. As massas referidas foram lavadas 3 vezes com 0,05 M de fosfato arrefecido em gelo, pH 7,0, e incubou-se a 25°C durante 40 minutos com glicina 0,05 M, pH 2,0, centrifugou-se e fez-se o ensaio dos sobrenadantes para determinar as proteínas e a actividade aniquiladora. Para o tratamento das membranas azurófilas com "triton X-114" seguiu-se



o procedimento descrito em (19).

QUADRO II

Efeito do pH, Potência iônica e Agentes tensio-activos sobre a liberação de ADBF a partir de membranas azurófilas

Membranas azurófilas tratadas com:	Agentes adicionais	Actividade bactericida do material libertado no sobrenadante	Actividade bactericida do material que permaneceu no agregado de membranas
Tampão		(unidades aniquiladoras)	(unidades aniquiladoras)
0,05 M glicina pH 2,0	-	1430	< 10
0,05 M citrato pH 5,5	-	20	1190
0,1 M bicarbonato de sódio, pH 11,0	-	< 10	1100
0,05 M fosfato pH 7,0	2 M NaCl	< 10	820
Nenhum	6 M ureia	< 10	1310
0,05 M fosfato pH 7,0	1% de Triton X-100	1310	< 10
0,01 M Tris pH 7,4	NaCl 0,15 M	170 ^a	N/A ^c
	0,05% de Triton X-114	1200 ^b	

^a fase aquosa

^b fase detergente

^c não aplicável

Conforme indicado no Quadro II, o tratamento das membranas azurófilas com 1% de "Triton X-100" libertou a actividade de ADBF tão eficazmente como o ácido. Em contraste, nem a ureia 6 M nem o carbonato de hidrogénio 0,1 M a pH 11, libertaram dos grânulos o factor bactericida das membranas.

Utiliza-se o "Triton X-114" nas membranas isoladas ou nas células totais para separar as proteínas de membranas integrais de proteínas hidrofílicas; as proteínas hidrofílicas são recuperadas na fase aquosa, ao passo que as proteínas de membranas integrais anfifílicas se encontram na fase detergente após a separação de fase deste detergente à temperatura de 20°C ou mais (19, 20). Quando as membranas azurófilas se extraíram com "Triton X-114", 87% da actividade de ADBF repartiu-se com a fase detergente.

A actividade de ADBF in vitro depende da libertação a partir da membrana azurófila

Trataram-se as membranas azurófilas a pH 2,0, o que solubiliza o ADBF, ou a pH 5,5, o que representa um pH intralisossomal (21-23) mas não liberta o ADBF da membrana (ver a Figura 4). Depois ensaiou-se a actividade bactericida a pH 5,5 nas membranas totais, e no sobrenadante e nas fracções de massas agregadas obtidas após centrifugação das membranas tratadas para ambos os valores de pH. O ADBF das membranas tratadas a pH 5,5 (ADBF ligado a membrana: 1 K.U.) foi 10 vezes menos activo do que o ADBF das membranas tratadas a pH 2,0 (ADBF solúvel: 11,6 K.U.). A actividade bactericida poderia ser recuperada quase completamente a partir de membranas tratadas a pH 5,5, fazendo nova extracção a pH 2,0 (ver quadro II anterior).

Efeito da dose, tempo, estado de crescimento bacteriano e tampão

A actividade de ADBF foi linear, relativamente à concentração de proteína, num intervalo compreendido entre 0,3 e 30 microgramas/ml (Figura 1 e outros dados não apresentados). O efeito da concentração bacteriana apresenta-se na Figura 5: até 10^7 bactérias/ml podem ser mortas por 30 microgramas/ml de extracto contendo ADBF, em 30 minutos a 37°C . A morte foi rápida: 50% das células foram aniquiladas em 5 minutos a 37°C pelo extracto de grânulos azurófilos contendo 1,4 microgramas de proteína/ml (Figura 6). O estado fisiológico das bactérias incubadas no meio de ensaio não afectou a sua susceptibilidade em relação ao ADBF. Assim, as bactérias em crescimento exponencial ou em fase estacionária demonstraram ser igualmente sensíveis. A adição de glicose (20mM) ao meio de incubação não afectou a actividade de ADBF. A actividade aniquiladora de ADBF foi aproximadamente a mesma quando se utilizou como tampão de sais de citrato, acetato ou fosfato (dados não representados).

Efeito de pH e catiões divalentes

Uma vez que se demonstra que os fagossomas atingem rapidamente e mantêm um valor de pH 5,5 durante a morte intracelular de bactérias in vivo (21-23), examinou-se o efeito do pH na actividade bactericida de ADBF e de BF in vitro. O ADBF e o BF foram eficazes em amplos limites de pH (desde 5,0 até 8,0) (Figura 7 e 8 respectivamente). Os meios mais ácidos do que pH 5,0, que são bactericidas de per se, não puderam ser utilizados para ensaiar a aniquilação por ADBF.

Uma vez que os iões tais como Mg^{2+} e Ca^{2+} desempenham uma função crítica na fagocitose (24) e afectam também as propriedades de superfí-

cie das bactérias gram-negativas (25) examinou-se também o efeito destes iões sobre a actividade bactericida de ANBF e de BF. Os iões Mg^{2+} antagonizaram mas não bloquearam completamente a actividade de ANBF. O efeito dos iões Mg^{2+} foi máximo para 1mM, com uma redução de 25% na actividade bactericida (dados não representados). Em contraste, os iões Ca^{2+} inibiram toda a actividade de ANBF e de BF para uma concentração de 25mM e 20 mM (figuras 9 e 10 respectivamente). A diminuição de actividade bactericida foi grosseiramente linear relativamente à concentração de cálcio num intervalo compreendido entre 1 e 25 mM. Uma vez que o meio utilizado para estes ensaios contém citrato, o qual proporciona a quelação dos catiões divalentes, a concentração de catiões livres na solução é inferior à da concentração nominal. Contudo, o citrato não liga quantidades significativas de magnésio e de cálcio para valores baixos de PH (26). A adição de EDTA (1-25 mM) ao meio de incubação (para quelatar os catiões) não afectou a actividade de ANBF ou de BF (dados não representados). O cloreto de sódio inibiu a uma concentração de 0,3 M ou superior (figura 11). As concentrações fisiológicas de cloreto de sódio ou de cloreto de Potássio não inibiram a actividade de ANBF quando se testou este último para uma concentração de 2,8 microgramas/ml ou superior.

Espectro bacteriano de aniquilação por ANBF

O ANBF mata tanto as bactérias gram-positivas como as gram-negativas (ver quadro III seguinte).

QUADRO III

Espectro anti-bacteriano de ADBF

Organismo	Estirpe ou tipo	Actividade de ADBF
<u>Staphylococcus aureus</u>	S27	+
<u>Staphylococcus aureus</u>	450	+
<u>Staphylococcus aureus</u>	TSS-1 ^b	+
<u>Staphylococcus aureus</u>	TSS-2 ^b	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	Tipo III	-
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	Tipo II	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	R6	+
<u>Listeria monocytogenes</u>	450	(+)
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	PAC	+
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	PAO 103-0	+
<u>Salmonella typhimurium</u>	LT2	+
<u>Escherichia coli</u> K12	MC 4100	+

^a A actividade de ADBF avalia-se de acordo com os microgramas/ml de protefna em extracto azurófilo, necessários para aniquilar 10^5 bactérias em 30 minutos a 37°C: +, 0,1 a 0,3 microgramas/ml; (+), 1 a 2,5 microgramas/ml; -, 20 microgramas/ml.

^b Isolados clínicos de dois pacientes com síndrome de choque tóxico.

As bactérias gram-positivas susceptíveis de aniquilação por EDBF englobam diversas estirpes de Staphylococcus aureus (dois isolados de pacientes com síndrome de choque tóxico), streptococcus β -hemoliticus (com a excepção dos estreptococcus encapsulados do tipo III) e de algum modo Listeria monocytogenes. Todas as bactérias gram-negativas testadas foram aniquiladas tão eficazmente como E. coli.

Actividade fungicida de ADBF

A Figura 12 demonstra que o ADBF possui actividade fungicida no intervalo compreendido entre 3,0 microgramas/ml e 16,0 microgramas/ml.

Purificação de ADBF

A cromatografia líquida de alta resolução de fase inversa (RP-HPLC) do extracto de ADBF originou um perfil reprodutível contendo pelo menos 9 picos característicos, alguns dos quais se apresentam como dubletos (ver figura 13A). Sempre que se secou uma porção de cada fracção para remover os dissolventes da fase inversa e depois se fez nova suspensão e se ensaiou, identificaram-se dois picos de actividade conforme demonstrado pelas áreas tracejadas da figura 13A. O primeiro pico de actividade sobrepõe-se aos dois picos de UV principais, designados por pico 5 e pico 6, o segundo pico de actividade está associado com um único pico de UV, designado por pico 9. A sequência de aminoácidos do pico 5 revelou duas proteínas, uma de sequência idêntica a lisozima (5a) e outra (5b) com a sequência N-terminal apresentada na figura 14. O pico 6 continha uma única sequência nova com homologia com a superfamília da tripsina (ver figura 14). O pico 9 continha pelo menos duas proteínas, isto é, 9a e 9b, possuindo as sequências representadas na figura 14.

Uma vez que as sequências designadas por 5b e 9b são idênticas e porque ambos os picos estão associados com actividade bactericida, os requerentes pensam que esta sequência em conjunto com a de 9a, é responsável por tal actividade bactericida.

A actividade de ANBF purificou-se parcialmente por cromatografia de exclusão numa coluna "Bio-Sil TSK-125" conforme se indica na figura 15. Eluiu-se conjuntamente a actividade fungicida e bactericida na coluna com dois picos de actividade, migrando o pico principal na região 50-60 kD (fracções 31 e 32) e o pico menor na região 10-20 kD (fracção 42). O material inicial para a cromatografia de exclusão em TSK (ANBF) e para diversas fracções de cromatografia de exclusão em TSK analisou-se por electroforese em gel de poliacrilamida (15%) conforme indicado na figura 16.

A RPHPLC do pico de exclusão da região 50-60 (fracções 31-32) originou dois picos de actividade, um pico de actividade menor associado com a região que engloba os picos 4, 5 e 6, e um pico de actividade principal associado com o pico 9 (figura 13B). A análise da sequência de aminoácidos do pico 4 demonstra identidade com a catepsina G humana (ver figura 14). O pico 9 corresponde a uma única sequência N-terminal designada por 9a na figura 14. A composição de aminoácidos do pico 9a purificados apresenta-se no quadro IV seguinte.

QUADRO IV

Análise de aminoácidos do pico 9a purificado

<u>Aminoácido</u>	<u>Mol (%)</u>
Asp	7,3
Glu	7,4
Ser	8,8
Gly	7,3
His	1,8
Arg	4,7
Thr	4,2
Ala	11,2
Pro	6,2
Tyr	2,6
Val	8,1
Met	2,5
Ile	5,1
Leu	10,4
Phe	5,5
Lys	7,3

A análise SDS-PAGE (10%) do pico 9 demonstra que a banda de proteína principal possui um peso molecular de aproximadamente 54 000 daltons (figura 17).

A RPHPLC do pico de exclusão da região 10-20 kD (fracção 42) originou um único pico de actividade associado com o pico 5 (figura 13C) e possuindo uma sequência única N-terminal idêntica à de 5b (figura 14). A análise SDS-PAGE do pico 5 revelou uma banda única em SDS-PAGE com um peso molecular aparente de 13 000 daltons (ver figura 18).

A resolução aperfeiçoada obteve-se por cromatografia de exclusão em TSK utilizando um tampão constituído por 50 mM de glicina, pH 2, 500 mM

de NaCl (ver figura 21). Sob estas condições, obteve-se a separação virtualmente completa da banda de 54kD a partir das bandas de 29 kD. Os perfis de actividade indicam que a proteína de 54 kD (fracções 34-36) demonstrou apenas actividade bactericida e nenhuma actividade antifúngica. Uma região contendo predominantemente duas proteínas de 13 kD e de 18 kD (fracções 42-45) continha a maior parte da actividade antifúngica, para além de actividade bactericida. A figura 22 apresenta os resultados do ensaio SDS-PAGE correspondentes às diversas fracções.

O BF derivado de células HL60 purificou-se a partir de grânulos (recolhidos após centrifugação em gradiente "Percoll") por cromatografia de exclusão em TSK e por RPHPLC conforme descrito para o ADBF. A RPHPLC (figura 19) revelou um pico de actividade que após a análise sequencial corresponde à sequência 9a (figura 14) com alguma contaminação de elastase (pico 8).

Fez-se a sondagem das bibliotecas de cDNA das células HL60 humanas com uma sonda derivada de uma sequência constituída pelos aminoácidos 31-35 do pico 5b conforme descrito antes. Purificaram-se da contaminação 16 clones a partir da biblioteca induzida. Cada clone foi digerido com a enzima Sau3a e os fragmentos foram inseridos no bacteriófago M13 de cadeia simples. Fez-se a sondagem dos bacteriófagos por hibridação para a "pool" de polímeros de ordem 14 e estabeleceu-se a sequência dos bacteriófagos M13 positivos utilizando o método de terminação de cadeia di-desoxi conforme descrito em (43). Um destes clones, P-7, continha uma sequência que se adaptava exactamente com o previsto para a sequência proteínica até a um ponto entre o resíduo 13 e 14 de aminoácido, onde se inseriu o oligonucleótido sintético. Utilizou-se o fragmento EcoRI do clone P-7 para voltar a sondar a biblioteca não induzida, a partir do que se isolou os clones 8 de cDNA. Um destes clones, designado por P-FL2, inseriu-se em vectores M13 e sequenciado. Também se fez a sequenciação de um segundo clone de cDNA (P-FL1). Apresentou-se idêntico ao P-FL2 com a excepção da sua extremidade 5' começar num ponto 43 pares de base depois da extremidade 5' do clone P-FL2.

Ambos os clones (P-FL1 e P-FL2) continham cadeias de leitura abertas idênticas que codificam 220 aminoácidos com um peso molecular avaliado em 24 823 daltons (figura 20). Está presente um sítio de glicosilação N-ligado (Asn-85) que poderia originar uma molécula maior. Os resíduos Tr₁₀₀-Ile₁₄₄ correspondem exactamente à sequência amino-terminal obtida para o pico 5b. O peso molecular avaliado para a porção C-terminal da molécula (Tr₁₀₅-Tir₂₂₀) é de 12 867 daltons, semelhante ao peso molecular aparente do pico 5b em SDS-PAGE.

Discussão

Desde os estudos mais antigos efectuados por Hirsch (27-29), tem-se feito a descrição de diversas proteínas bactericidas, em alguns casos isoladas a partir de neutrófilos (7, 18, 30-34). A localização subcelular destas ou de outras proteínas bactericidas derivadas de neutrófilos humanos não está fixada. Conforme agora descrito, trataram-se os neutrófilos humanos com DFP para evitar a proteólise. Estes neutrófilos tratados foram fracionados utilizando um esquema que origina uma separação clara de citosol, membrana de plasma, grânulos específicos, e grânulos azurófilos, com proteólise mínima ou com mínima alteração da densidade e integridade dos grânulos. Determinaram-se as condições óptimas para as extracções e ensaio de ADBF; fez-se a extracção máxima de ADBF para valores de pH entre 2,0-3,0 e ensaiou-se para pH 5,5 (pH fagolisossomal). Perante estas condições, fez-se a sondagem de todos os compartimentos celulares e descobriu-se que a maioria de actividade bactericida (97%) estava associada ao sobrenadante pós-nuclear (S₁) enquanto aproximadamente 90% da actividade migrou conjuntamente com a população de grânulos azurófilos após centrifugação de S₁ em

gradientes de densidade em "Percoll". Nem o citosol nem as fracções de membrana plasmática apresentaram actividade significativa. O baixo nível de actividade (5-10%) na fracção de grânulos específicos pode ser atribuído aos 5-10% de contaminação, desta fracção, pelos grânulos azurófilos mieloperoxidase-positivos. Os dados apresentaram uma única localização para o BF de neutrófilo humano, nomeadamente, o grânulos azurófilo.

Como suporte para estes resultados, descobriu-se uma única localização para o ADBF nos neutrófilos humanos, em que a actividade bactericida estava exclusivamente localizada numa grande população de grânulos mieloperoxidase-positivos (35). Além disso, verificou-se que um dos factores bactericidas derivados de neutrófilos (BFI) se pode recuperar (90%) nas fracções celulares contendo grânulos azurófilos (36). Em contraste, Rest e outros (37) descobriram um factor bactericida, tanto nos grânulos azurófilos como nos grânulos específicos de neutrófilos humanos. Uma vez que utilizaram uma técnica diferente de fraccionamento (homogeneização em sacarose e centrifugação isopícnica em gradientes de densidade de sacarose), assim como métodos diferentes de extracção e doseamento, os seus resultados não são directamente comparáveis com os resultados agora descritos.

O ADBF está associado com a membrana azurófila. Submetendo-se os grânulos azurófilos a lise para valores neutros de pH, o que solubiliza 90% da mieloperoxidase, 90% do ADBF permaneceu na massa que continha as membranas. Todo o ADBF associado às membranas pode ser extraído a pH 2,0 e libertado sob a forma solúvel após centrifugação das membranas tratadas com ácido. As possíveis explicações para o efeito de solubilização do ácido são:

- (1) o ácido induz um fenómeno proteolítico;
- (2) o ácido induz variações conformacionais que provocam a lisão da associação do ADBF com a membrana dos grânulos;
- ou (3) o ácido proporciona uma interacção de cargas entre o

ADBF e a membrana. Não é estritamente exigível um pH baixo para a solubilização do ADBF. O "Triton X-100" para valores neutros de pH também pode libertar o ADBF. Os agentes normalmente utilizados para solubilizar as proteínas da membrana periféricas, tais como NaCl 2 M, ureia 6 M ou carbonato de hidrogénio e sódio 0,1 M a pH 11, não foram adequados para dissociar o ADBF da membrana azurófila. Isto significa que o ADBF está intimamente associado com a membrana azurófila ou que representa um constituinte integral da mesma. Na verdade, ao tratar-se as membranas azurófilas com "Triton X114", o ADBF comportou-se como um constituinte da membrana integral, por se ter repartido na fase detergente.

Também se abordou a questão de se saber se a libertação de um factor bactericida a partir de uma membrana é necessário para a actividade bactericida. O ADBF ligado à membrana apresentou-se dez vezes menos activo do que o ADBF solúvel, sugerindo uma ligação in vitro entre a solubilização do ADBF e a sua actividade. Ainda fica por se compreender o mecanismo molecular de activação do ADBF in vivo.

Com base nos resultados de localização agora descritos, utilizaram-se grânulos azurófilos purificados, intactos, como fonte de ADBF e fez-se o estudo das suas propriedades. Isto contrasta com os trabalhos anteriores em que as proteínas bactericidas foram obtidas a partir de uma fracção rica em grânulos heterogéneos, por extracção com ácido durante longos períodos de tempo (7, 18, 31) na ausência de inibidor de protease (7, 31). O ADBF assemelha-se a algumas das proteínas bactericidas anteriormente descritas por ser extraível com ácido e associado aos grânulos. Em particular, o ADBF partilha muitas das características da fagocitina derivada de neutrófilos de coelho (28, 29, 38): (1) as variações no meio de teste tais como uma variação no tampão, a adição de glicose e a inclusão de um agente de ligação metálico possui um fraco efeito na actividade bactericida do ADBF; e (2) os catiões

divalentes (Mg^{++} , Ca^{++}) não foram necessários para a sua acção letal (para uma concentração elevada estes iões antagonizaram ou, no caso do Ca^{++} , inibiram completamente o efeito bactericida DI_{50} para $Ca^{++} = 10 \text{ mM}$). Tal como a fagocitina, o ADBF foi mais activo para um baixo valor de pH (5,0-5,5), que é o valor de pH fagolisossomal estimado durante a morte intracelular das bactérias.

O ADBF difere de outras proteínas anti-microbianas derivadas de neutrófilos estudadas, por diversas vias. O ADBF é activo num amplo intervalo de valores de pH, com actividade óptima para pH 5,5 e é relativamente insensível a uma potência iónica elevada. Isto contrasta com o factor de aumento da permeabilidade bacteriana (BPI) que possui uma actividade óptima para pH 7,0, e com as defensinas que exigem estritamente um valor de pH entre 7,0-8,0 e condições de baixa potência iónica para a actividade bactericida (7, 31, 34, 35). Pelo seu espectro antimicrobiano, o ADBF difere dos factores purificados tais como o BPI ou as proteínas antimicrobianas catiónicas, os quais apenas são activos sobre as bactérias gram-negativas (18, 31, 34).

O ADBF é extremamente activo: 0,1 a 0,3 microgramas/ml podem matar 10^5 bactérias por ml, utilizando uma variedade ampla de organismos de prova - bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas. Os factores bactericidas purificados específicos para as bactérias gram-negativas, tais como o BPI (31,34) e a proteína antimicrobiana catiónica de 57 kD (18) possuem actividade comparável, ao passo que outras, tais como as defensinas, apenas parecem ser activas para concentrações superiores (50 microgramas/ml), sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas (7, 34). Além disso, o ADBF aniquila as bactérias rapidamente: mais ainda a aniquilação feita pelo ADBF parece não envolver os sistemas dependentes de H_2O_2 , uma vez que a catalase

(500 U/ml) não reduz significativamente a sua actividade (dados não representados) e porque mais do que 90% da mieloperoxidase é libertada na fracção solúvel ao isolar-se o ADBF da membrana.

A cromatografia do ADBF em HPLC de fase inversa revela 9 picos de proteína principais envolvendo pelo menos 10 polipéptidos diferentes. Alguns contêm sequências amino-terminais idênticas às dos polipéptidos conhecidos, englobando:

Pico 1	Defensina
Pico 4	Catepsina G
Pico 5a	Lisozima
Pico 8	Elastase
Pico 9a	Proteína de crescente permeabilidade/bactericida (BPI)

Aniquilação de E. coli associada aos perfis de actividade através das fracções de cromatografia de fase inversa dos extractos de grânulos azurófilos e de ADBF purificado parcialmente, com picos 5b e 9a. Neste modo, podem identificar-se dois polipéptidos purificados com sequências amino-terminais distintas. O BPI, tal como descrito na literatura (31, 44), apenas é activo contra as bactérias gram-negativas.

A partir da sequência de aminoácidos derivada do pico 5b, fez-se a clonagem de um novo cDNA de comprimento completo que codifica um polipéptido de 220 aminoácidos, com um peso molecular avaliado em 24 823 daltons. Esta proteína representa um precursor para o polipéptido de 13 kD descrito pelo pico 5b o qual pode ser processado no neutrófilo ou durante a purificação. O facto de essa sequência do pico 5b também aparecer no pico 9 (sequência designada por 9b na figura 14) pode explicar-se por diversas formas: 1) degradação do C-terminal; 2) diferenças conformativas ou 3) processamento pós-



-coluna de um precursor bloqueado no N-terminal.

Uma vez que os leucócitos polimorfonucleares maduros não se podem desenvolver em cultura durante um tempo prolongado, investigou-se a utilização de células precursoras de neutrófilos para a produção de factores bactericidas. A investigação do factor bactericida (BF) derivado das células HL60 revelou um perfil de grânulos diferente do obtido a partir de neutrófilos após separação em gradientes de "Percoll". Contudo, verificou-se que estava presente um pico de actividade bactericida e fungicida que se sobrepunha ao pico da actividade da mieloperoxidase (um marcador de grânulos azurófilos em neutrófilos maduros). A actividade do BF derivado de HL60 é essencialmente idêntica à do ADBF na sua potência (nanogramas por ml necessários para matar um número fixo de bactérias), perfil de actividade em função do pH, sensibilidade ao CaCl_2 , migração na cromatografia de exclusão em "Superose 12 FPLC" e associação à membrana. Deste modo, a produção de BF a partir das células HL60 proporciona um meio alternativo para gerar grandes quantidades de BF para utilização comercial.

Referências

1. Klebanoff, S.J. e R.A. Clark. 1978. The Neutrophil: function and clinical disorders. North Holland Publishing Company. pp. 1-810.
2. Kaplan, E.L., T. Laxdal, e P.G. Quie. 1968. Estudos de leucócitos polimorfonucleares a partir de pacientes com doença granulomatosa crônica da infância: capacidade bactericida para os estreptococos. Pediatrics 41:591-599.
3. Mandell, G.L. 1974. Atividade bactericida de neutrófilos polimorfonucleares aeróbicos e anaeróbicos. Infect. Immun. 9: 337-341.
4. Elsbach, P., e J. Weiss. 1983. Uma reavaliação das funções dos sistemas de fagócitos microbicidas dependentes de O₂ e independentes de O₂. Rev. Infect. Dis. 5:843-853.
5. Spitznagel, J.K. e W.M. Shafer 1985. Morte por neutrófilos de bactérias, por mecanismos independentes do oxigênio: um resumo histórico. Rev. Infect. Dis. 7:398-403.
6. Ganz, T., M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S.L. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton e R.I. Lehrer. 1985. Defensinas, antibióticos de peptídeos naturais de neutrófilos humanos. J. Clin. Invest. 76: 1427-1435.
7. Selsted, M.E., S.S.L. Harwig, T. Ganz, J.W. Schilling e R.I. Lehrer. 1985. Estruturas Primárias de Três Defensinas de Neutrófilos Humanos. J. Clin. Invest. 76: 1436-1439.

8. Borregaard, N., J.M. Heiple, E.R. Simons, e R.A. Clark. 1983. Localização subcelular do componente b-citocromo da oxidase microbiana de neutrófilos humanos: translocação durante a activação. *J. Cell Biol* 97:52-61.
9. Boyum, A. 1968. Separação de leucócitos a partir de sangue e de medula óssea. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (Suppl.): 77-89.
10. Lindhardt, K. e K. Walter. 1963. Fosfatases (fosfomonoesterases). Em *Methodes of Enzymic Analysis*. H.-U. Bergmeyer, editor. Academic Press, Inc., New York. 779-787.
11. Gottlieb, C., K. -S.Lau, L.R. Wasserman, e V. Herbert. 1965. Ensaio rápido, com carvão, do factor intrínseco (IF), da capacidade de ligação de B12 ao suco gástrico não saturado, do anticorpo ao IF, e da capacidade de ligação de B12 ao soro não saturado. *Blood* 25:875-893.
12. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L.Farr, e R.J. Randall. 1951. Medição de proteína com o reagente de fenólico de Folin. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
13. Wang, C.S. e R.L. Smith, 1975. Determinações de Lowry de proteína na presença de "Triton X-100". *Anal. Biochem.* 63: 414-417.
14. Bos, A., R. Wever, e D. Roos. 1978. Caracterização e quantificação da peroxidase nos neutrófilos humanos. *Biochem. Biophys. Acta.* 525:37-44.

15. Tomasz, A. 1968. Consequências biológicas de substituição da colina por etanolamina na parede da célula de pneumococos: formação da cadeia, perda de transformabilidade, e perda de autólise. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59:86-93.
16. Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp.137-140.
17. Amrein, P.C. e T.P. Stossel. 1980. Prevenção da degradação das proteínas de leucócitos polimorfonucleares humanos por fluorofosfato de di-isopropilo. Blood 56:442-447.
18. Shafter, W.M., L.E. Martin, e J.K. Sptiznagel. 1984. Proteínas antimicrobianas catiónicas isoladas a partir de grânulócitos neutrófilos humanos na presença de fluorofosfato de di-isopropilo. Infect. Immun. 49:29-35.
19. Bordier, C. 1981. Separação de fase de proteínas da membrana integral em presença de uma solução de Triton X-114. J. Biol. Chem. 256:1604-1607.
20. Lewis, V., S.A. Green, M. Marsh, P. Vihko, A. Helenius, e I. Mellman. 1985. Glicoproteínas da membrana lisossomal. J. Cell Biol. 100:1839-1847.
21. Geisow, M.J., P. D'Arcy Hart, e M.R. Young. 1981. Variações temporais do pH do lisossoma e de fagossoma durante a formação do fagolisossoma nos macrófagos: estudos por espectroscopia fluorescente. J. Cell. Biol. 89:645-652.
22. McNeil, P.L., L. Tanasugarn, J.B. Meigs, e D.K. Taylor. 1983. A acidificação de fagossomas inicia-se antes de se detectar a actividade do enzima lisossomal. J. Cell Biol. 97:692-702.

23. Horwitz, M.A. e F.R. Maxfield. 1984. A "Legionella pneumophila" inibe a acidificação do seu fagossoma nos monócitos humanos. *J. Cell Biol.* 99:1936-1943.
24. Silverstein, S.C., R.M. Steinman e Z.A. Cohn. 1977. Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46:669-722.
25. Nikaido, H. e M. Vaara. 1985. Base molecular da permeabilidade da membrana exterior bacteriana. *Microbiol. Rev.* 49:1-32.
26. Chaberek, S. e A.E. Martell, 1959. Agentes de apreensão orgânicos. Wiley & Sons, editors. Chapman & Hall, New York. pp.312-313.
27. Hirsch, J.G. 1956. Fagocitina: uma substância bactericida de leucócitos polimorfonucleares. *J. Exp. Med.* 103:589-611.
28. Hirsch, J.G. 1956. Estudos da acção bactericida da fagocitina. *J. Exp. Med.* 103:613-621.
29. Hirsch, J.G. 1960. Estudos adicionais sobre a preparação e propriedade da fagocitina. *J. Exp. Med.* 111:323-337.
30. Zeya, H.I. e J.K. Spitznagel. 1963. Proteínas básicas enzimáticas e anti-bacterianas de lisossomas de leucócitos: separação e identificação. *Science* 142:1085-1087.
31. Weiss, J., F. Elsbach, I. Olsson, e H. Odeberg. 1978. Purificação e caracterização de um bactericina potente e de uma proteína activa da membrana, a partir dos grânulos dos leucócitos polimorfonucleares humanos. *J. Biol. Chem.* 253:2664-2672.

32. Elsbach, P., J. Weiss, R.C. Franson, S. Becker-Quagliata, A. Schneider e L. Harris. 1979. Separação e purificação de uma proteína de crescente permeabilidade/bactericida potente e de uma fosfolipase A₂ estreitamente associada, de leucócitos polimorfonucleares do coelho. J. Biol. Chem. 254:11000-11009.
33. Lehrer, R.I., K.M. Ladra, e R.B. Hake 1975. Mecanismos fungicidas não oxidantes de granulócitos de mamíferos: demonstração de componentes com actividade candidada nos leucócitos humanos, de coelho e de cobaia. Infect. Immun. 11:1226-1234.
34. Selsted, M.E., D. Szklarek, e R.I. Lehrer. 1984. Purificação e actividade antibacteriana de péptidos antimicrobianos de granulócitos de coelho. Infect. Immun. 45:150-154.
35. Gennaro, R., B. Dewald, U. Horisberger, H.-U. Gubler, e M. Baggiolini. 1983. Um novo tipo de grânulo citoplásmico em neutrófilos de bovino. J. Cell. Biol. 96:1651-1661.
36. Weiss, J., T. Goldberg-Klein, e I. Olsson. 1986. Localização celular e subcelular da proteína de crescente permeabilidade/bactericida neutrófilo. Clin. Res. 34: 537A (Abstr.).
37. Rest, R.F. M.H. Cooney e J. K. Spitznagel. 1978. Actividade bactericida de grânulos específicos e azurófilos de neutrófilos humanos: estudos com mutantes da membrana exterior de "Salmonella typhimurium LT-2". Infect. Immun. 19:131-137.

38. Cohn, Z.A. e J. G. Hirsch. 1960. Isolamento dos grânulos específicos de leucócitos Polimorfonucleares de coelho. *J. Exp. Med.* 112:983-1003.
39. Collins, S.J., Gallo R.C. e Gallagher, R.E., 1977. Desenvolvimento contínuo e diferenciação de células leucémicas miéloides humanas em cultura de suspensão. *Nature* 270: 347-349.
40. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., e Gallo, R.C., 1978. Diferenciação terminal de células leucémicas promielocíticas humanas induzida por dimetil-sulfócido e por outros compostos polares. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2458-2462.
41. Huynh, T.V., et al., 1984. DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, Glover, D. ed., IRL, Oxford.
42. Gubler, V., et al., 1983. *Gene* 25: 263-269.
43. Smith, A.J.H., 1980. *Meth. Enzym.* 65: 560-580.
44. Ooi, C.E., et al., 1987. Um fragmento de 25 kD NH₂-terminal transporta toda a actividade antibacteriana do neutrófilo humano da proteína de crescente permeabilidade/bactericida de 60kD. *J. Biol. Chem.* 252: 14891-14894.

Reivindicações

- 1.- Processo para a preparação de composições utilizáveis como agentes antimicrobianos, caracterizado pelo facto:
- a) de se separarem leucócitos substancialmente polimorfonucleares a partir do sangue para se obter uma preparação de leucócitos polimorfonucleares enriquecida;
 - b) de se suspender a preparação enriquecida de leucócitos polimorfonucleares em um agente tampão apropriado;
 - c) de se tratar, com um agente inibidor da protease apropriado a suspensão de leucócitos polimorfonucleares obtida;
 - d) de se tratar a suspensão de leucócitos polimorfonucleares para se promover a lise dos leucócitos em suspensão;
 - e) de se tratar a suspensão de leucócitos lisados assim obtida com um agente quelante apropriado;
 - f) de se centrifugar a suspensão de leucócitos lisados assim tratada para se obter uma fase de células intactas/núcleos

4.

e uma fase sobrenadante pós-nuclear;

g) de se isolar a fase pós-nuclear sobrenadante;

h) de se fraccionar a fase pós-nuclear sobrenadante em um gradiente de densidade;

i) de se recolher a fracção constituída pelo gradiente de densidade que inclui grânulos azurófilos;

j) de se suspender grânulos azurófilos obtidos em um agente tampão com um pH de cerca de 7;

l) de se tratar a suspensão de grânulos azurófilos resultante com um reagente de extracção com um pH inferior a cerca de 8.0 e capaz de solubilizar as proteínas da membrana azurófila para se obter uma suspensão de reagente da extracção/membrana azurófila;

m) de se separar a suspensão constituída por reagente de extracção/membrana azurófila para se obter uma fase sólida e uma fase sobrenadante;

n) de se isolar a fase sobrenadante.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar fluorofosfato de diisopropilo como agente inibidor da protease.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a amostra de sangue ser obtida a partir de um ser humano.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a preparação enriquecida de leucócitos polimorfonucleares consistir em mais de cerca de 95% de leucócitos polimorfonucleares e menos de cerca de 3% de eosinófilos.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se tratar a suspensão de leucócitos polimorfonucleares por cavitação com azoto para se obter uma suspensão de leucócitos lisados.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar, como gradiente de densidade, um gradiente de densidade descontínuo de Percoll.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se separar o material fraccionado do gradiente de densidade dos grânulos azurófilos antes da fase j).

8.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se lisarem os grânulos azurófilos em suspensão, de se recolherem os fragmentos da membrana e de se tratarem com um reagente de extracção, antes da fase ð), para se obter uma suspensão de membranas de azurófilos/reagente de extracção.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracteriza-

do pelo facto de-o reagente de extracção ter um pH inferior a 4,0.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de o reagente de extracção possuir um pH de cerca de 2,0.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o reagente de extracção consistir em um detergente não iónico com um pH igual a cerca de 7.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a composição consistir em pelo menos dois polipeptidos escolhidos no grupo constituído por polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 3.500 daltons, cerca de 13.000 daltons, cerca de 18.000 daltons, cerca de 29.000 daltons e cerca de 54.000 daltons de a composição possuir uma função de respiração independente, uma actividade antimicrobiana contra bactérias e fungos a um pH de cerca de 5,0 até cerca de 8,0 e para concentrações do ião cálcio de até cerca de 10mM, actividade bacteriana para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,3M e actividade fungicida para concentrações de cloreto de sódio iguais a cerca de 0,15M, e de se incorporar uma quantidade eficaz de pelo menos de 0,01 microgramas da referida composição por 10^5 bactérias ou

fungos,

13.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de os polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos serem derivados de células HL-60.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de os polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos serem derivados de células KG-1.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de os polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos serem derivados de grânulos azurófilos.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 3500 daltons ser a defensina.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 13.000 daltons compreender o polipeptido com 12.867 daltons representado a seguir:

60 70 80 90 100 110
ATGAAACTCCCCTTACTTCTGGCTCTTCTATTGGGGCAGTTTCTGCTCTTCAICTAAGG
10 20
METLysLeuProLeuLeuLeuAlaLeuLeuPheGlyAlaValSerAlaLeuHisLeuArg
120 130 140 150 160 170
TCTGAGACTTCCACCTTTGAGACCTTTGGGTGCTAAGACGCTGCCTGAGGATGAGGAGA
30 40
SerGluThrSerThrPheGluThrLeuTrpValLeuArgArgCysLeuArgMETArgArg
180 190 200 210 220 230
CACCAGAGCAGGAGATGGAGGAGACCTTGCAGGGAGCTGGAGGAAGAGGAGGAGTGGGGC
50 60
HisGlnSerArgArgTrpArgArgProCysArgGluLeuGluGluGluGluGluTrpGly
240 250 260 270 280 290
TCTGGAAGTGAAGATGCCTCCAAGAAAGATGGGGCTGTTGAGTCTATCTCAGTGCCAGAT
70 80
SerGlySerGluAspAlaSerLysLysAspGlyAlaValGluSerIleSerValProAsp
300 310 320 330 340 350
ATGGTGGACAAAAACCTTACGTGTCCTGAGGAAGAGGACACAGTAAAAGTGGTGGGCATC
90 100
METValAspLysAsnLeuThrCysProGluGluGluAspThrValLysValValGlyIle
360 370 380 390 400 410
CCTGGGGCGCCAGACCTGCCGCTACCTCCTGGTGAGAAGTCTTCACACGTTTAGTCAAGCT
110 120
ProGlyArgGlnThrCysArgTyrLeuLeuValArgSerLeuGlnThrPheSerGlnAla

420 430 440 450 460 470
TGGTTTACTTGCCGGAGGTGCTACAGGGGCAACCTGGTTTCCATCCACA¹³⁰ACTTCAATATT
TrpPheThrCysArgArgCysTyrArgGlyAsnLeuValSerIleHisAsnPheAsnIle
480 490 500 510 520 530
AATTATCGAATCCAGTGTCTGTCAGCGCGCTCAACCAGGGTCAAGTCTGGATTGGAGGC
AsnTyrArgIleGlnCysSerValSerAlaLeuAsnGlnGlyGlnValTrpIleGlyGly
540 550 560 570 580 590
AGGATCACAGGCTCGGGTCGCTGCAGACGCTTTCAGTGGGTTGACGGCAGCCGCTGGAAC
ArgIleThrGlySerGlyArgCysArgArgPheGlnTrpValAspGlySerArgTrpAsn
600 610 620 630 640 650
TTTGCGTACTGGGCTGCTCACCAGCCTGGTCCC¹⁹⁰CGGGTGGTCACTGCGTGGCCCTGTGTA
PheAlaTyrTrpAlaAlaHisGlnProGlyProAlaValValThrAlaTrpProCysVal
660 670 680 690 700 710
CCCGAGGAGGCTACTGGCGTCGAGCCACTGCCTCAGAAGATTCCTTT²¹⁰CATCTGTTCTAC
ProGluGluAlaThrGlyValGluProLeuProGlnLysIleProPheIleCysSerTyr
TGA
—

desde o aminoácido 105 até ao aminoácido 220.

18.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos, com um peso molecular aparente igual a cerca de 18.000 daltons, estar presente no extracto de grânulos azurófilos.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 29.000 daltons estar presente no extracto de grânulos azurófilos.

20.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 29.000 daltons ser a elastase.

21.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 29.000 daltons ser a catepsina G.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 54.000 daltons estar presente no extracto de grânulos azurófilos.

23.- Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 54.000 daltons compreender a sequência de aminoácidos Val-Asn-Pro-Gly-Val-Val-Val-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Gly-Leu-Asp-Tyr-Ala-Ser-Gln-Gln-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gln-X-X-Leu-Lys-His-Ile-Lys-Ile-Pro-Asp-Tyr-Leu de N-terminal.

24.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de as bactérias serem Gram-positivas ou Gram-negativas.

25.- Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de as bactérias Gram-positivas serem Staphylococcus aureus, Streptococcus β -hemolyticus ou Listeria e de as bactérias Gram-negativas serem Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli ou Salmonella Typhimurium.

26.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o fungo ser uma levedura.

27.- Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de a levedura ser Candida albicans.

28.- Processo para eliminar bactérias ou fungos, caracte-

rizado pelo facto de se fazer contactar as bactérias ou fungos com uma quantidade eficaz para matar as referidas bactérias ou fungos, igual a pelo menos 0,01mg do polipeptido por 10^5 bactérias ou fungos, de uma composição preparada pelo processo de acordo com a reivindicação 1.

29.- Processo para a preparação de polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular previsto de 24.823 daltons, um peso molecular aparente de cerca de 18.000 daltons e a sequência de aminoácidos representada anteriormente na reivindicação 17, ou um seu fragmento, caracterizado pelo facto de se desenvolver um sistema vector hospedeiro sob condições apropriadas que permitem a produção de polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos, de se isolarem os polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos resultantes, compreendendo o referido sistema vector hospedeiro um plasmídeo em um hospedeiro apropriado, incorporando o dito plasmídeo uma molécula de DNA que inclui, pelo menos, uma fracção da sequência nucleotídica representada na reivindicação 17, a qual codifica os referidos polipeptidos.

30.- Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo facto de o polipeptido ter um peso molecular aparente de cerca de 18.000 daltons e de incorporar a sequência de aminoácidos representada na reivindicação 17, desde o aminoácido 105

até ao aminoácido 220, e de a molécula de DNA incorporar a sequência de DNA representada na reivindicação 17 desde o nucleotido 369 até ao nucleotido 716.

31.- Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo facto de o polipeptido ter um peso molecular previsto de 12.867 daltons.

32.- Processo para eliminar microrganismos, caracterizado pelo facto de se fazer contactar os microrganismos com uma quantidade eficaz para os eliminar de um polipeptido preparado pelo processo de acordo com a reivindicação 29, quantidade essa que é igual a pelo menos 0,01 mg de polipeptido por 10^5 microrganismos.

33.- Processo para a preparação de polipeptidos purificados utilizáveis como agentes antimicrobianos que compreendem polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular previsto de 24.823 daltons e a sequência de aminoácidos indicada na reivindicação 17, ou um seu fragmento, caracterizado pelo facto:

- a) de se cultivarem células precursoras de neutrófilos;
- b) de se recolherem as células precursoras de neutrófilos cultivadas;
- c) de se suspenderem as células precursoras de neutrófilos em um agente tampão apropriado;

- d) de se tratar a suspensão de células precursoras de neutrófilos resultante para se obter uma suspensão de células precursoras de neutrófilos lisadas;
- e) de se separar a suspensão tratada de células precursoras de neutrófilos lisadas para se obter uma fase de células intactas e núcleos e uma fase sobrenadante pós-nuclear;
- f) de se isolar a fase sobrenadante pós-nuclear;
- g) de se tratar a fase sobrenadante pós-nuclear com um reagente de extracção tendo um pH menor do que cerca de 8,0 e capaz de solubilizar as proteínas da membrana para se obter uma fase reagente de extracção e uma fase de membrana insolúvel;
- h) de se separar a fase reagente de extracção da fase de membrana insolúvel para se obter uma fase de proteína solúvel e uma fase de membrana insolúvel;
- i) de se isolar a fase de proteína solúvel; e
- j) de se purificar a fase de proteína solúvel para se obter um polipeptido purificado com 24.823 daltons ou um seu fragmento.

34.- Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de as células precursoras de neutrófilos serem células HL-60.

35. - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de se tratar a suspensão de células precursoras de neutrófilos com um agente inibidor da protease apropriado, antes da fase d).

36. - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de se tratar a suspensão de neutrófilos ligados com um agente quelante apropriado, antes da fase e).

37. - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de permuta iónica.

38. - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de exclusão.

39. - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de afinidade.

40. - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de imunoafinidade.

41.- Processo para a preparação de polipeptidos de leucócitos polimorfonuclears humanos com um peso molecular aparente de cerca de 18.000 daltons, caracterizado pelo facto de se desenvolver um sistema vector hospedeiro sob condições apropriadas que permitem a produção de polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos e de se isolar os referidos polipeptidos, compreendendo o referido sistema vector hospedeiro um plasmídeo em um hospedeiro apropriado e incorporando o referido plasmídeo uma molécula de DNA que codifica o polipeptido.

42.- Processo de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo facto de o polipeptido possuir uma função respiratória independente, actividade antimicrobiana contra bactérias e fungos para um pH desde cerca de 5,0 até cerca de 8,0 e para uma concentração até 10mM de iões cálcio, actividade bacteriana para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,3M e actividade antifúngica para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,15M.

43.- Processo para eliminar microrganismos, caracterizado pelo facto de se fazer contactar os referidos microrganismos com uma quantidade eficaz de pelo menos 0,01mg de um polipeptido preparado pelo processo de acordo com a reivindicação 41, por 10 microrganismos.

44.- Processo para a preparação de polipetidos purificados com um peso molecular aparente de 18.000 daltons, caracterizado pelo facto:

- a) de se cultivarem células precursoras de neutrófilos;
- b) de se recolherem as células precursoras de neutrófilos cultivadas;
- c) de se suspenderem as referidas células precursoras de neutrófilos cultivadas em um agente tampão apropriado;
- d) de se tratar a suspensão de células precursoras de neutrófilos resultantes para se obter uma suspensão de células precursoras de neutrófilos lisadas;
- e) de se separar a suspensão tratada de células precursoras de neutrófilos lisadas para se obter uma fase de células intactas e núcleos e uma fase sobrenadante pós-nuclear;
- f) de se isolar a fase sobrenadante pós-nuclear;
- g) de se tratar a fase sobrenadante pós-nuclear com um reagente de extracção tendo um pH inferior a cerca de 8,0 e capaz de solubilizar as proteínas da membrana, para se obter uma fase reagente de extracção e numa fase de membrana insolúvel;
- h) de se separar a fase reagente de extracção da fase de membrana insolúvel, para se obter uma fase de proteína solúvel e uma fase de membrana insolúvel;
- i) de se isolar a fase de proteína solúvel; e
- j) de se purificar a fase de proteína solúvel isolada para se obter um polipeptido purificado com 18.000 daltons.

45.- Processo de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo facto de as células precursoras de neutrófilos serem células HL-60.

46.- Processo de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo facto de se tratar a suspensão de células precursoras de neutrófilos com um agente inibidor da protease, antes da fase d),

47.- Processo de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo facto de se tratar a suspensão de neutrófilos lisados com um agente quelante, antes da fase e).

48.- Processo de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de permuta iónica.

49.- Processo de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de exclusão.

50.- Processo de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de afinidade.

51.- Processo de acordo com a reivindicação 44, caracteri-

zado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de imunoafinidade.

52.- Processo para a preparação de polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 54.000 daltons, função respiratória independente, actividade antibacteriana para um pH compreendido entre cerca de 5,0 e cerca de 8,0, para concentrações de iões cálcio até cerca de 10mM e de cloreto de sódio até cerca de 0,3 M, caracterizado pelo facto de se desenvolver um sistema vector hospedeiro, sob condições apropriadas que permitem a produção de polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos e de se isolar os polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos resultantes, compreendendo o referido sistema vector hospedeiro um plasmídeo em um hospedeiro apropriado contendo o referido plasmídeo uma molécula de DNA que codifica o polipeptido.

53.- Processo de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo facto de o polipeptido purificado incorporar a sequência de aminoácidos de fórmula geral Val-Asn-Pro-Gly-Val-Val-Val-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Gly-Leu-Asp-Tyr-Ala-Ser-Gln-Gln-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gln-X-X-Leu-Lys-His-Ile-Lys-Ile-Pro-Asp-Tyr-Leu no N-terminal.

54.- Processo para a preparação de polipeptidos purifica-

dos com um peso molecular aparente de 54.000 daltons, caracterizado pelo facto:

- a) de se cultivarem células precursoras de neutrófilos;
- b) de se recolherem as células precursoras de neutrófilos cultivadas;
- c) de se suspenderem as células precursoras de neutrófilos cultivadas em um agente tampão apropriado;
- d) de se tratar a suspensão de células precursoras de neutrófilos, resultante para se obter uma suspensão de células precursoras de neutrófilos lisadas;
- e) de se separar a suspensão de células precursoras de neutrófilos lisadas tratada para se obter uma fase de células intactas e núcleos e uma fase sobrenadante pós-nuclear;
- f) de se isolar a fase sobrenadante pós-nuclear;
- g) de se tratar a fase sobrenadante pós-nuclear com um reagente de extracção tendo um pH inferior a cerca de 7,0 e capaz de solubilizar as proteínas da membrana, para se obter uma fase reagente de extracção e uma fase de membrana insolúvel;
- h) de se separar a fase reagente de extracção da fase de membrana insolúvel para se obter uma fase de proteína solúvel e uma fase de membrana insolúvel;
- i) de se isolar a fase de proteína solúvel; e
- j) de se purificar a fase de proteína solúvel isolada para se obter um polipeptido purificado com 54.000 daltons.

55.- Processo de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo facto de as células precursoras de neutrófilos serem células HL-60.

56.- Processo de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo facto de se tratar a suspensão das células precursoras de neutrófilos com um agente inibidor da protease apropriado, antes da fase d).

57.- Processo de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo facto de se tratar a suspensão dos neutrófilos lisados com um agente quelante apropriado antes da fase e)

58.- Processo de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de permuta iónica.

59.- Processo de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de exclusão de tamanhos,

60.- Processo de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de afinidade.

61.- Processo de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo facto de se purificar a fase de proteína solúvel por cromatografia de imunoafinidade.

62.- Processo para a preparação de polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos com um peso molecular aparente de cerca de 29.000 daltons, função respiratória independente, actividade antimicrobiana contra bactérias e fungos a um pH compreendido entre cerca de 5,0 e cerca de 8,0 e para uma concentração até cerca de 10mM de iões cálcio, actividade bactericida até cerca de 0,3M de concentrações de cloreto de sódio e actividade fungicida até cerca de 0,15M de concentrações de cloreto de sódio, caracterizado pelo facto de se desenvolver um sistema vector hospedeiro que incorpora um plasmídeo em um hospedeiro apropriado e de o referido plasmídeo conter uma molécula de DNA que codifica o polipeptido, sob condições que permitem a produção de polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos e de se isolar depois os polipeptidos de leucócitos polimorfonucleares humanos resultantes.

63.- Processo para eliminar fungos, caracterizado pelo facto de se fazer contactar os referidos fungos com uma quantidade eficaz de pelo menos 0,01mg por 10^5 fungos, de um polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos, preparado pelo processo de acordo com a reivindicação 41.

4.

64.- Processo de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares estar presente em um extracto de grânulos azurófilos.

65.- Processo de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos ser a elastase.

66.- Processo de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo facto de o polipeptido de leucócitos polimorfonucleares humanos ser a catepsina G,

Lisboa, 12 de Maio de 1988

Dr. António Augusto da Silva



R E S U M O

"Processo para a preparação de composições
que contêm proteínas antimicrobianas e sua
utilização"

A presente invenção proporciona um processo para a preparação de uma composição de matéria útil como agente antimicrobiano. Esta composição de matéria é constituída por pelo menos dois polipeptidos escolhidos no grupo constituído por polipeptidos do leucócito poli-morfonuclear humano que possui um peso molecular aparente de cerca de 3.500 daltons, cerca de 13.000 daltons, cerca de 18.000 daltons, cerca de 29.000 daltons e cerca de 54.000 daltons. A composição de matéria possui uma actividade antimicrobiana independente das manifestações respiratórias, para as bactérias e fungos, para um pH compreendido entre cerca de 5,0 e cerca de 8,0 e para concentrações do ião cálcio até cerca de 10mM, actividade bactericida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,3 M, e actividade fungicida para concentrações de cloreto de sódio até cerca de 0,15 M. Também se proporciona um método para a preparação de polipeptidos purificados úteis como agentes antimicrobianos.

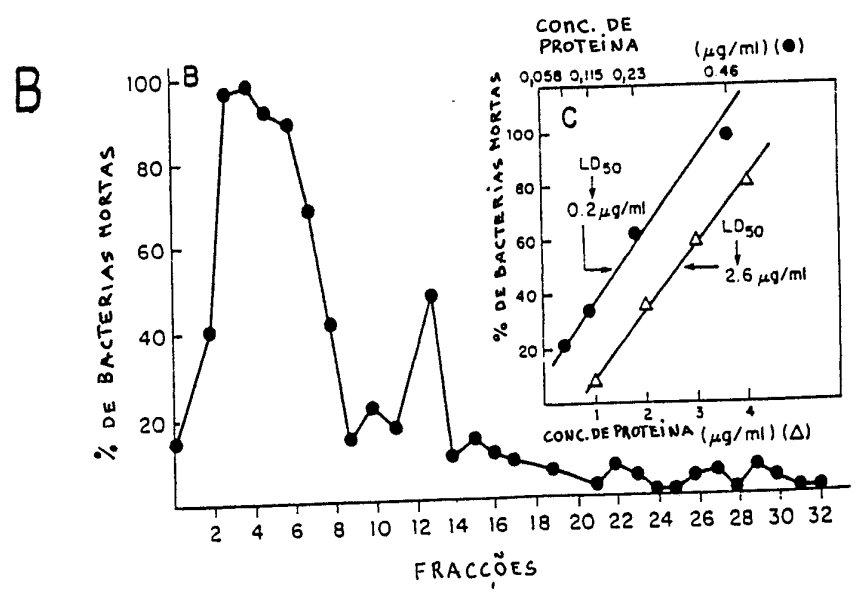
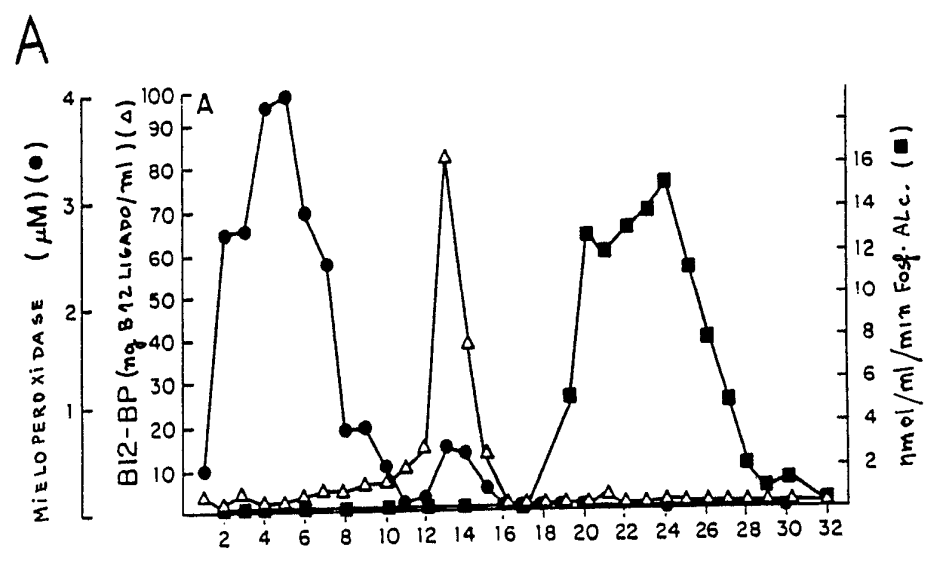
Lisboa, 26 de Novembro de 1987

Assinado e rubricado por



4.

FIGURA 1



FRAÇÕES

FIGURA 2

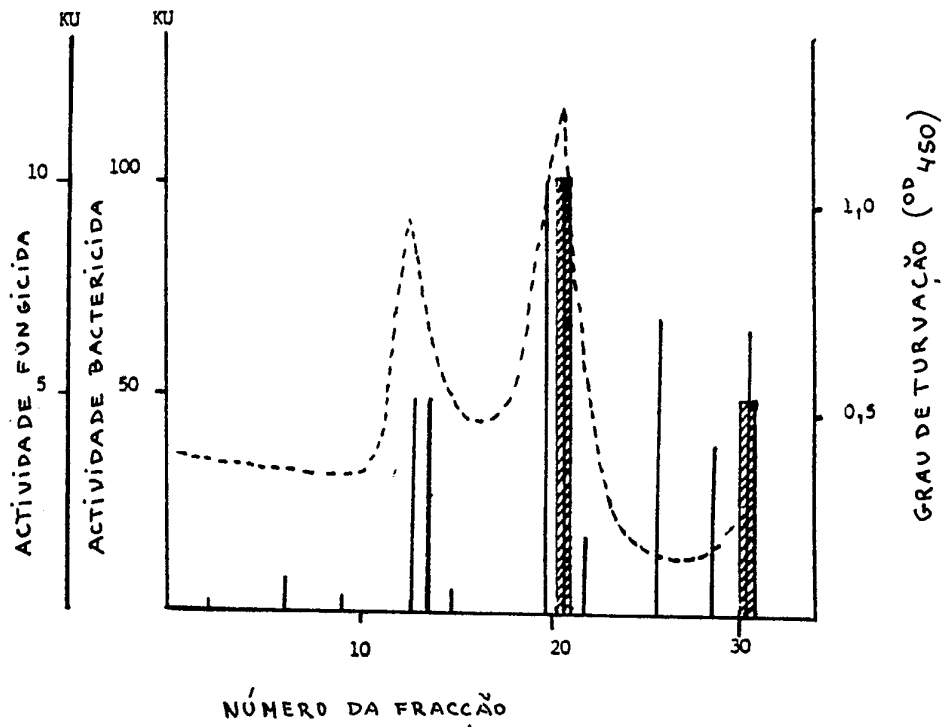


FIGURA 3

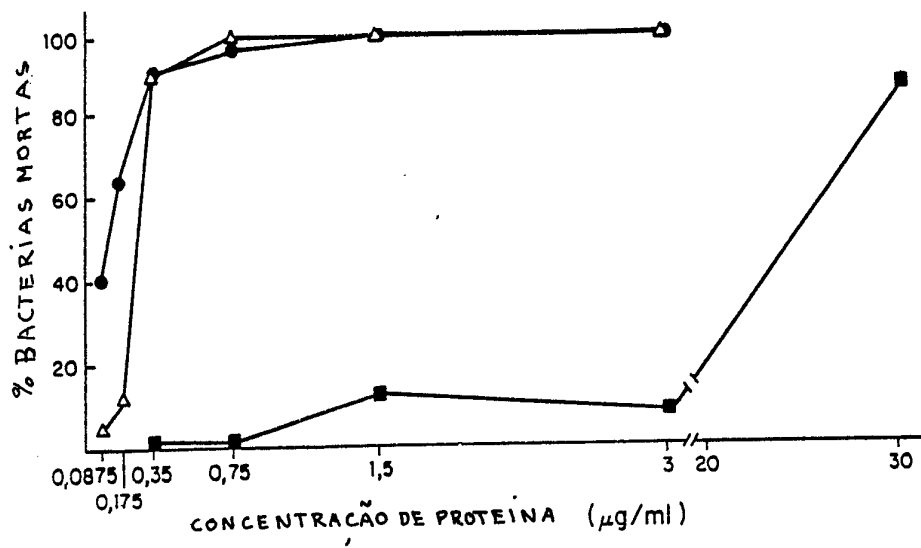


FIGURA 4

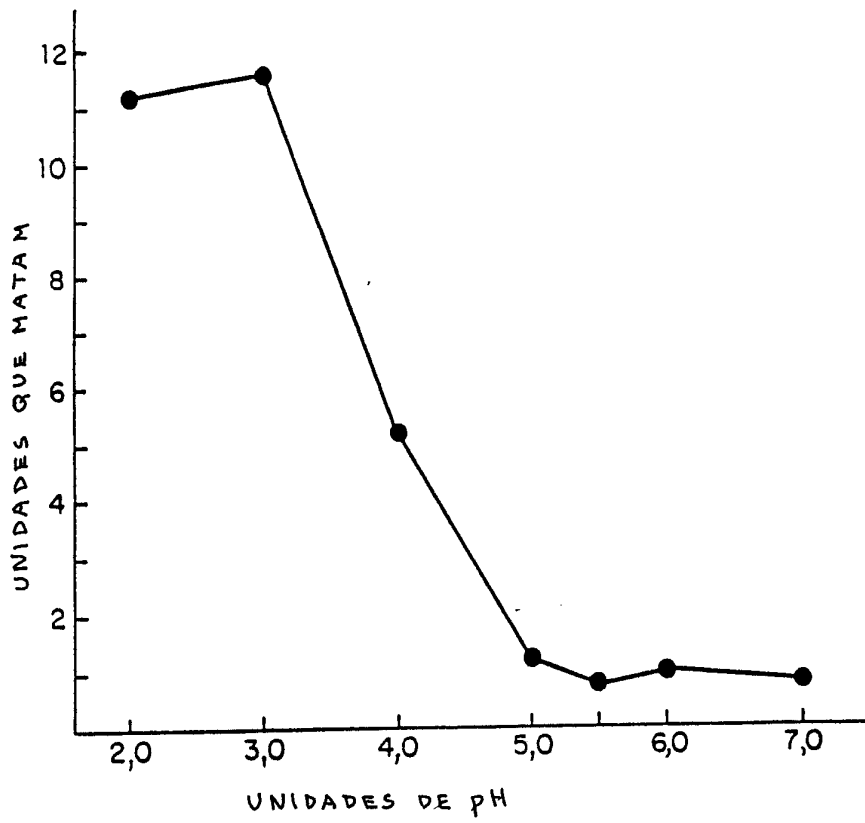
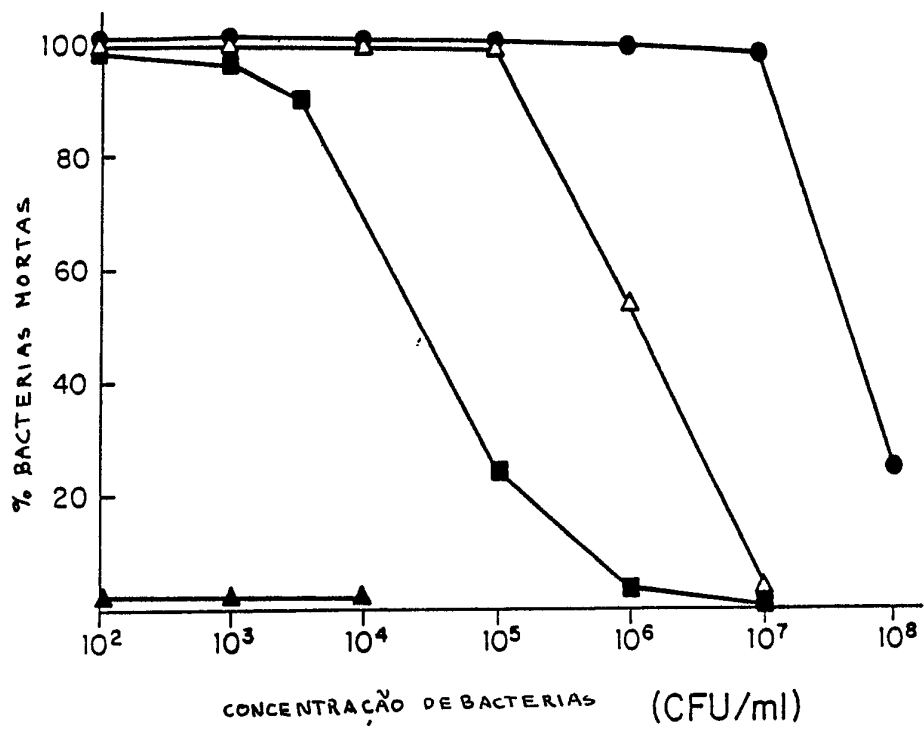
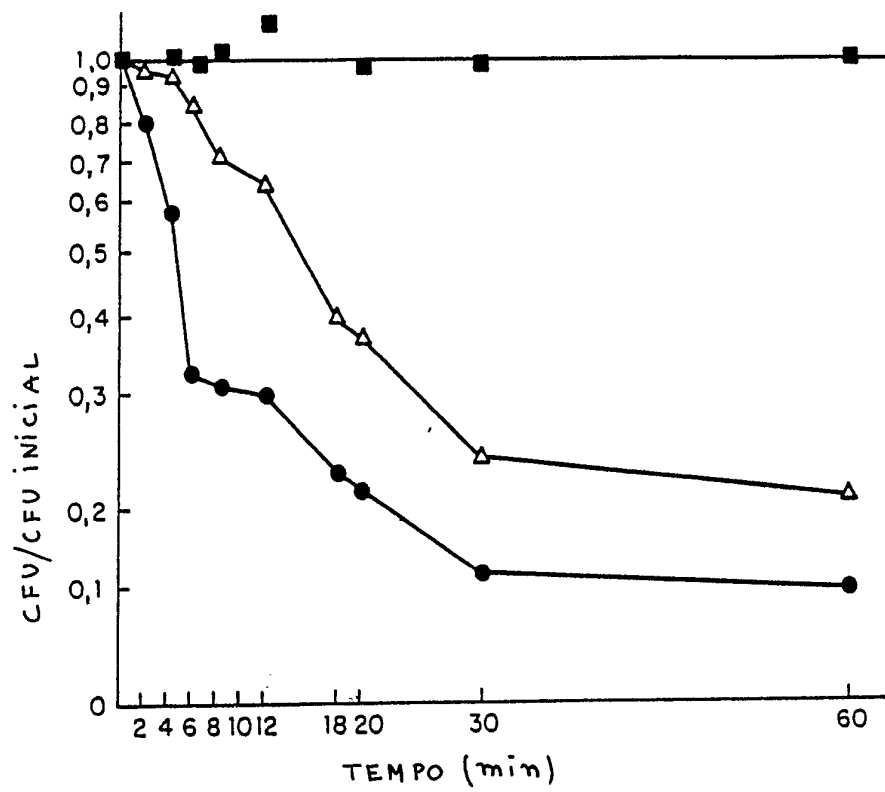


FIGURA 5



4.

FIGURA 6



4.

FIGURA 7

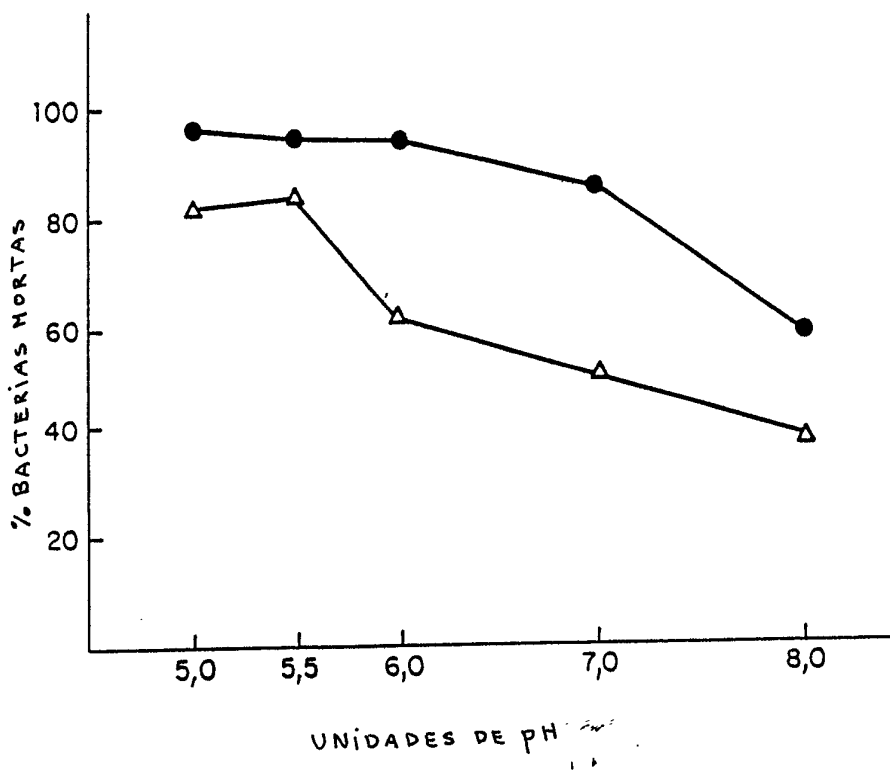


FIGURA 8

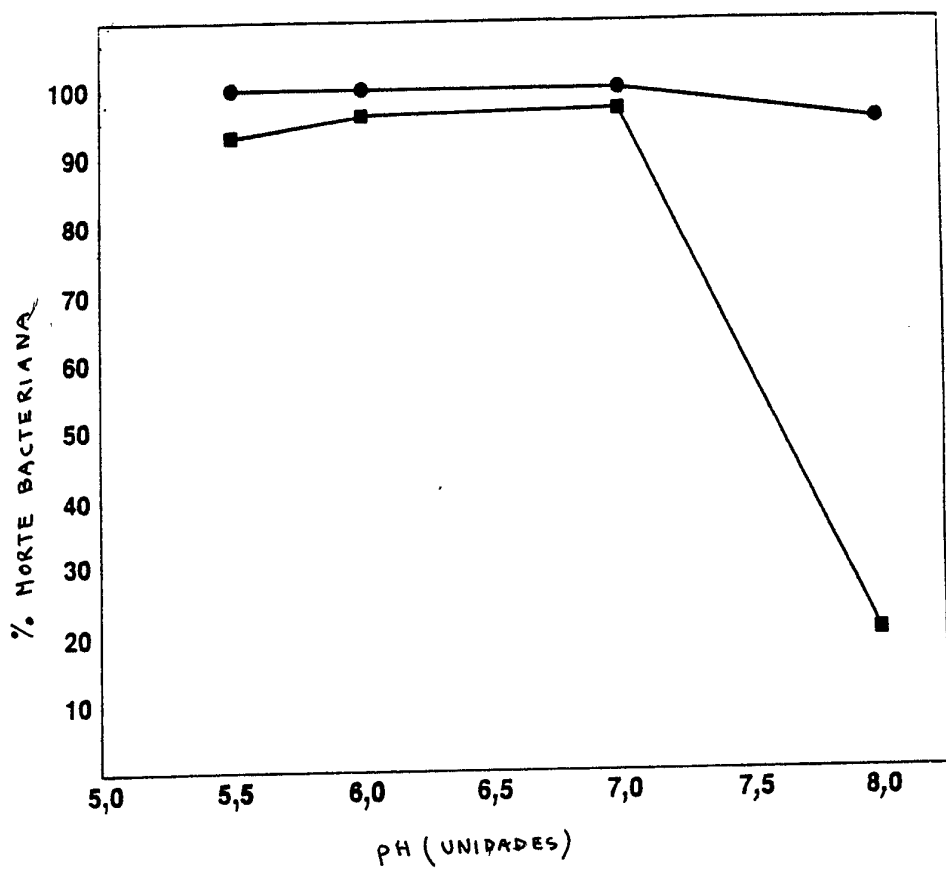


FIGURA 9

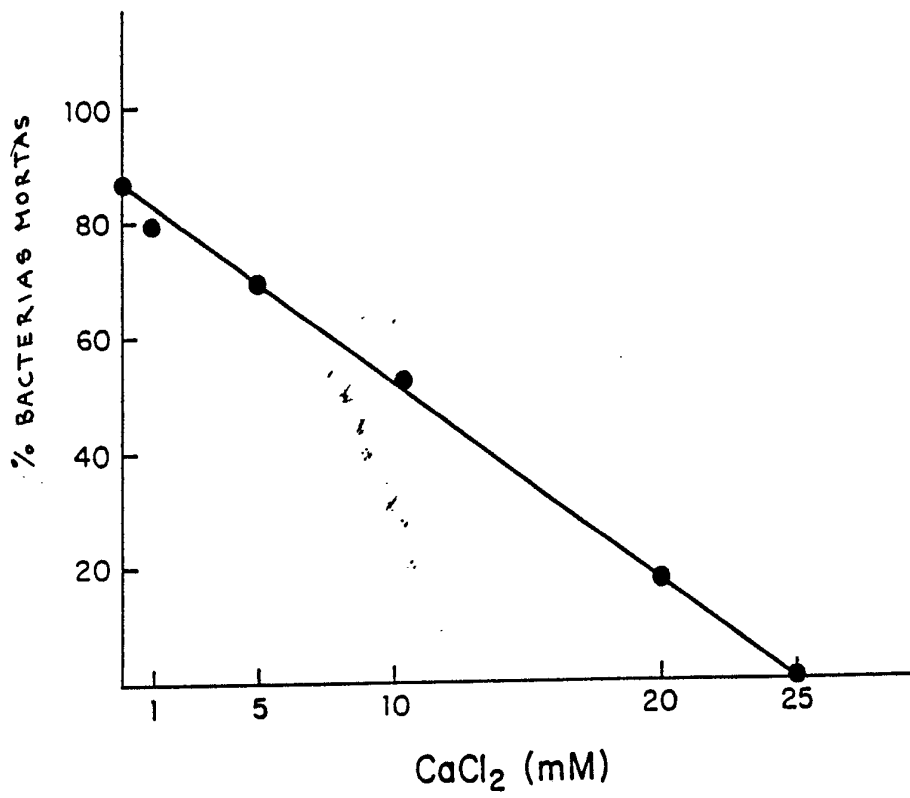
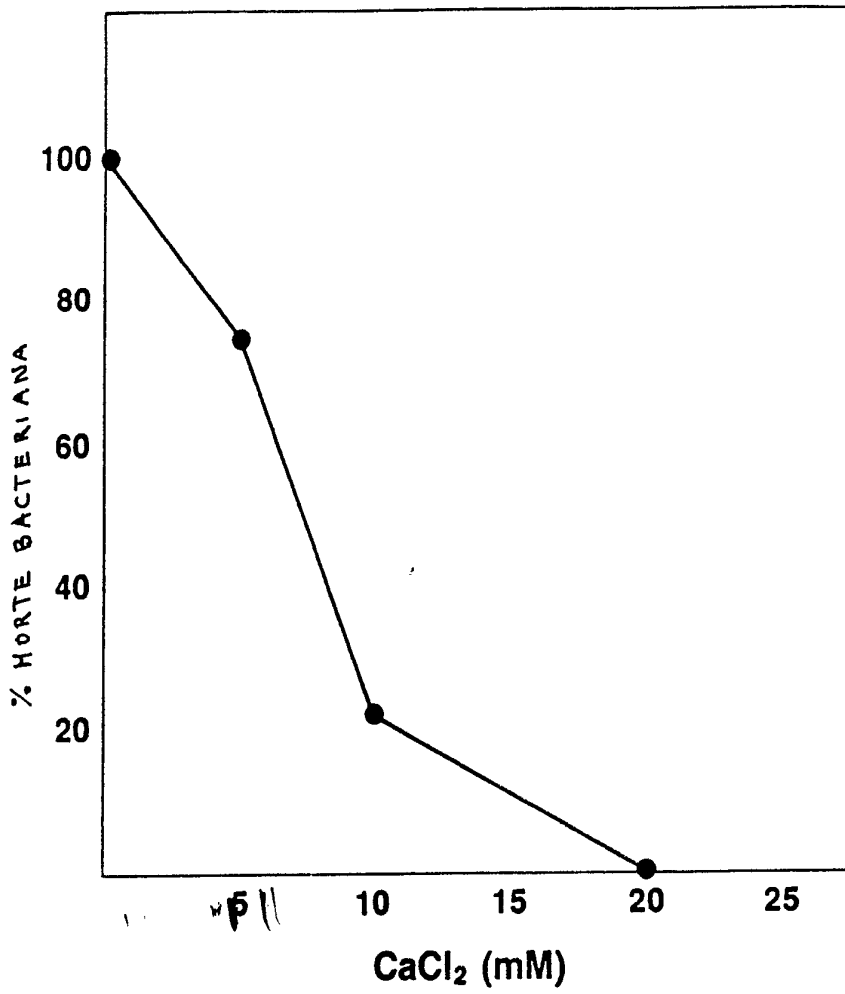


FIGURA 10



4.

FIGURA 11

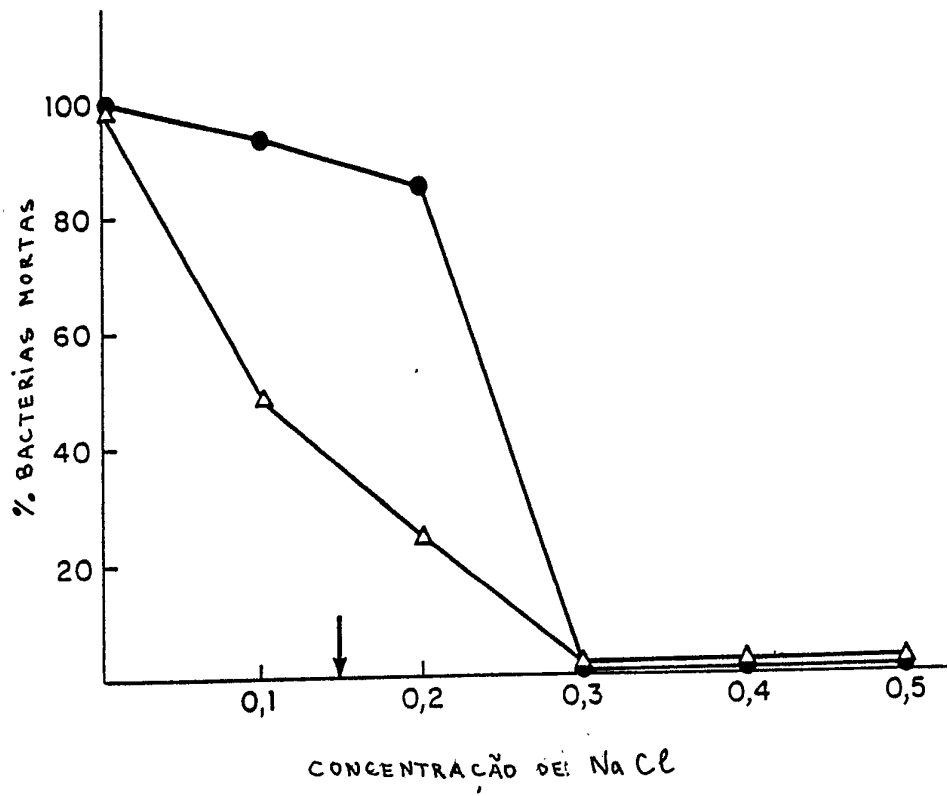


FIGURA 12

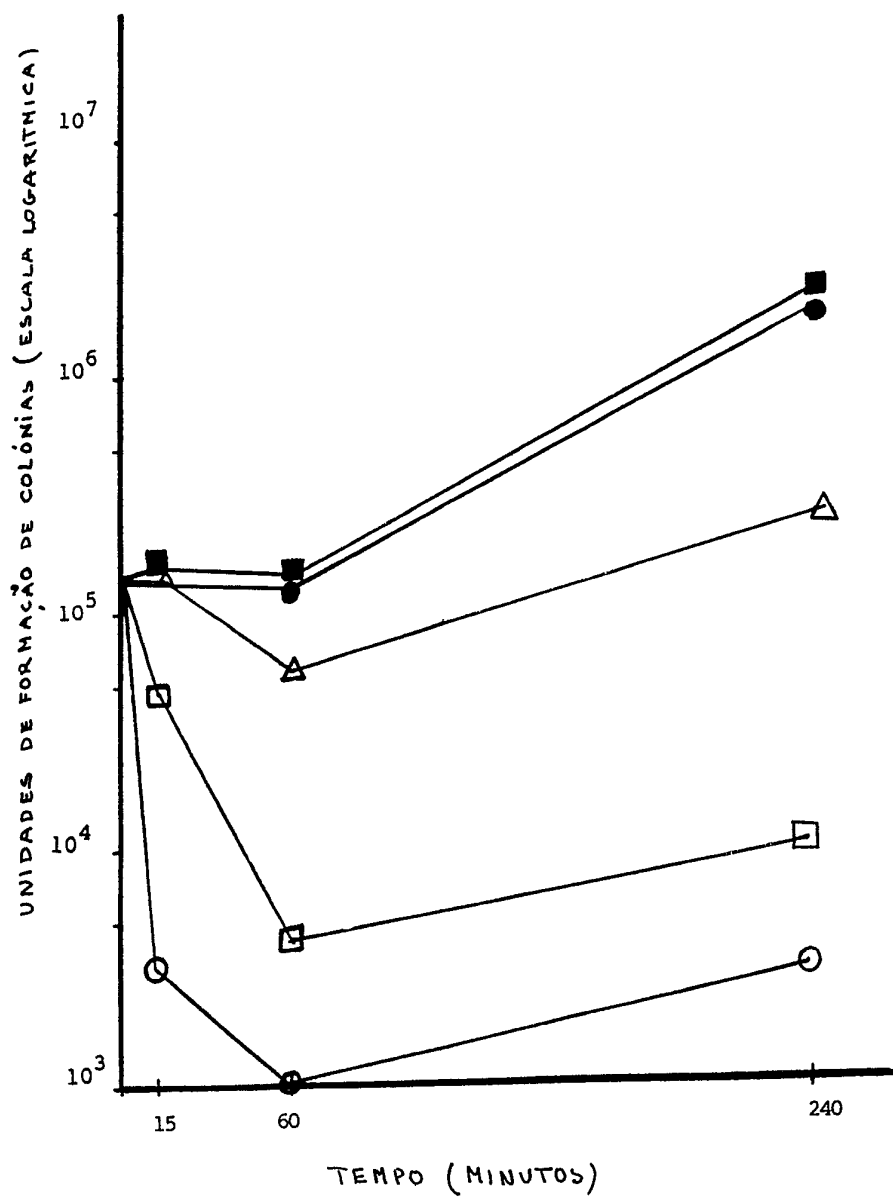


FIGURA 13

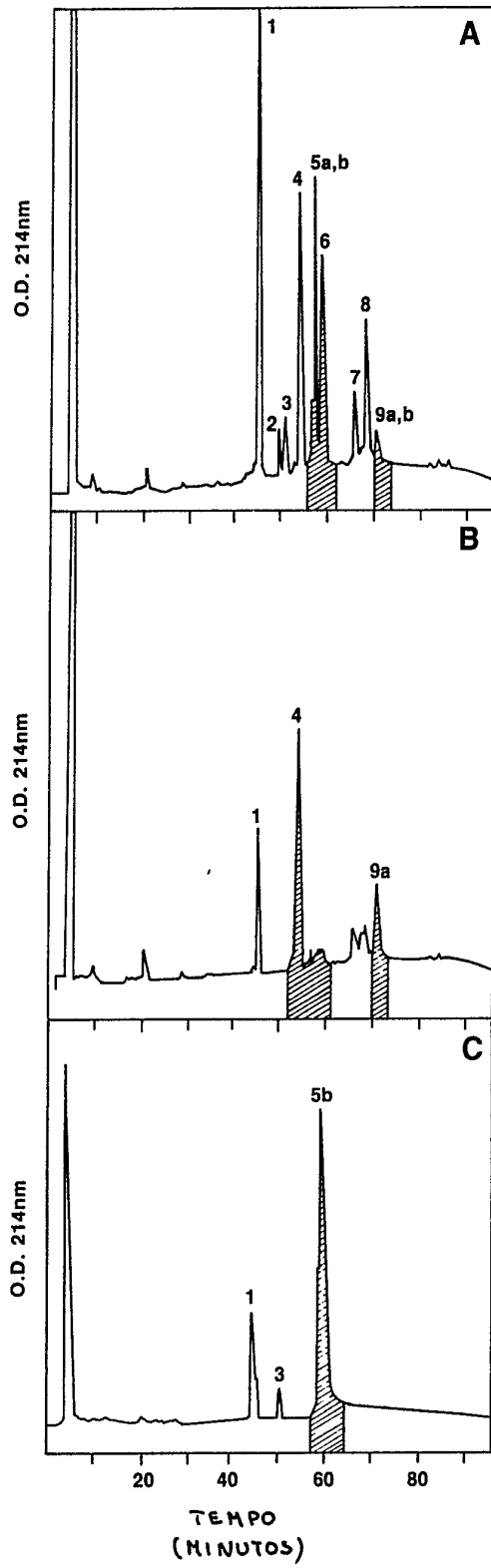


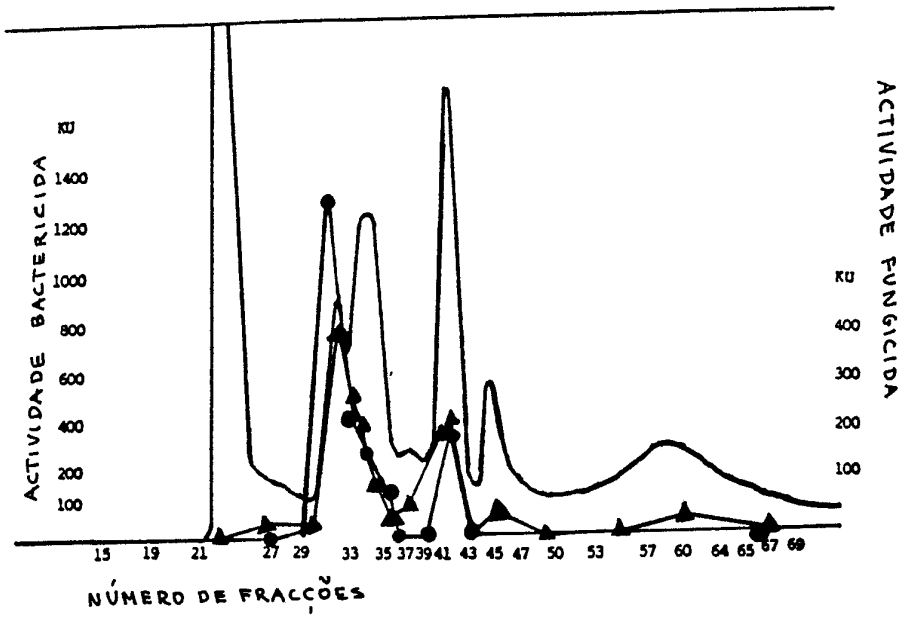
FIGURA 14

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14	16	18	20						
1	X	Y	X	R	I	P	A	X	I	A	G	E	R	R	Y	G	T	X	I	X	Q
4	I	I	G	G	R	E	S	R	P	H	S	R	P	Y	M	A	Y	L	Q	I	Q
5a	K	V	F	E	R	X	E	L	A	R	T	L	K	R	L						
5b	T	C	R	Y	L	L	V	R	S	L	Q	T	F	S	Q	A	X	F	T	X	R
8	I	V	G	G	R	R	A	R	P	H	A	X	P	F	M	V	S	L	Q	L	
9a	V	N	P	G	V	V	V	R	I	S	Q	K	G	L	D	Y	A	S	Q	Q	G
9b	T	C	R	Y	L	L	V	R	S	L	Q	T	F	S	Q	A	X	F	T	X	R

	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40										
1	X																			
4	X	P	A																	
5a																				
5b	R	X	Y	R	G	N	L	V	S	I	H	N	F	N	I	N	Y	R	I	
8																				
9a	T	A	A	L	Q	X	X	L	K	H	I	K	I	P	D	Y	L			
9b	R	X	Y	R	G	N	L	V	S	I	H	N	F	N	I	N	Y	R	I	

4.

FIGURA 15



4.

FIGURA 16

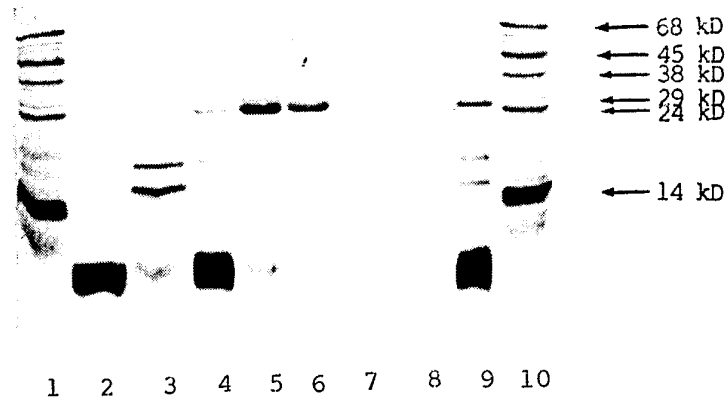


FIGURA 17

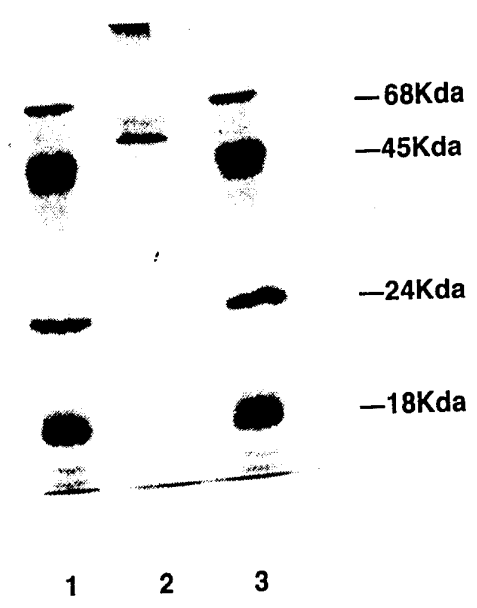
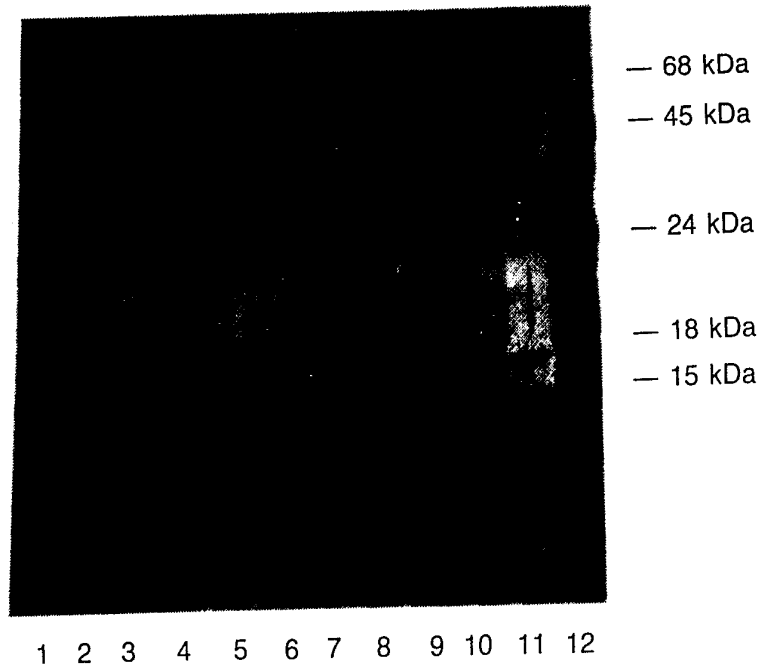


FIGURA 18



4.

FIGURA 19

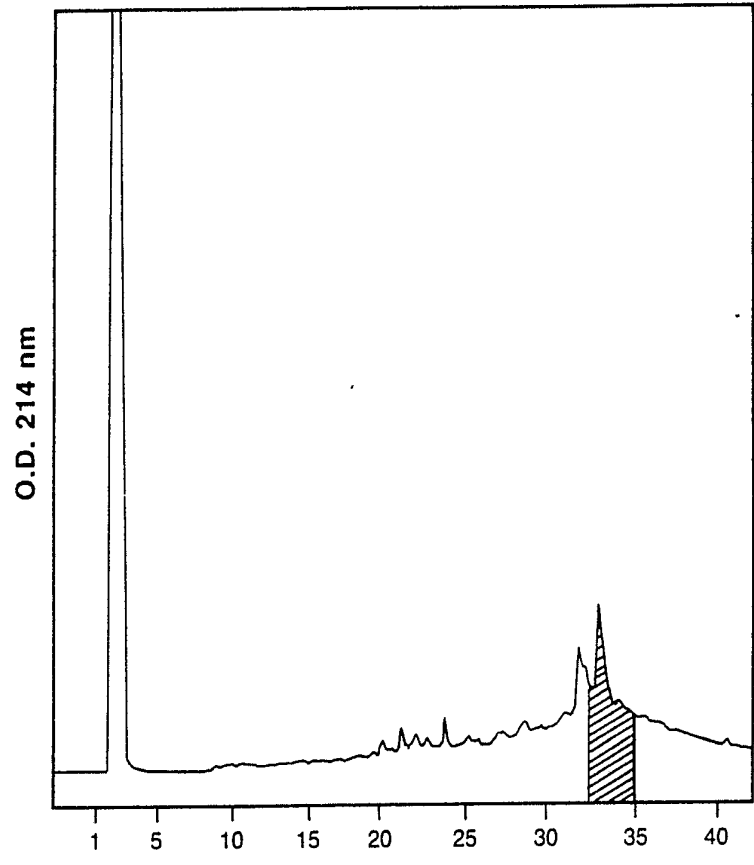


FIGURA 20A

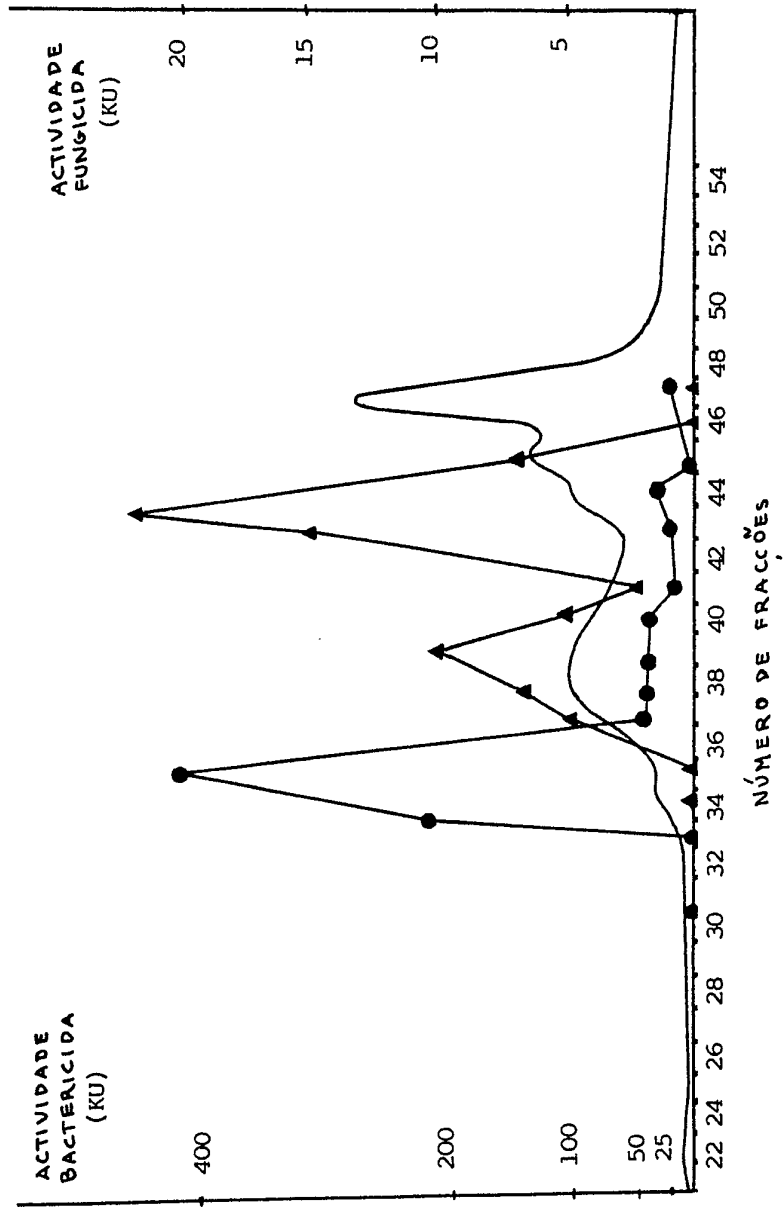
60 70 80 90 100 110
 ATGAAACTCCCCTTACTTCTGGCTCTTCTATTTGGGGCAGTTTCTGCTCTTCATCTAAGG
 10 20
METLysLeuProLeuLeuLeuAlaLeuLeuPheGlyAlaValSerAlaLeuHisLeuArg
 120 130 140 150 160 170
 TCTGAGACTTCCACCTTTGAGACCCTTTGGGTGCTAAGACGCTGCCTGAGGATGAGGAGA
 30 40
 SerGluThrSerThrPheGluThrLeuTrpValLeuArgArgCysLeuArgMETArgArg
 180 190 200 210 220 230
 CACCAGAGCAGGAGATGGAGGAGACCTTGCAGGGAGCTGGAGGAAGAGGAGGAGTGGGGC
 50 60
 HisGlnSerArgArgTrpArgArgProCysArgGluLeuGluGluGluGluTrpGly
 240 250 260 270 280 290
 TCTGGAAGTGAAGATGCCTCCAAGAAAGATGGGGCTGTTGAGTCTATCTCAGTGCCAGAT
 70 80
 SerGlySerGluAspAlaSerLysLysAspGlyAlaValGluSerIleSerValProAsp
 300 310 320 330 340 350
 ATGGTGGACAAAAACCTTACGTGTCCTGAGGAAGAGGACACAGTAAAAGTGGTGGGCATC
 90 100
METValAspLysAsnLeuThrCysProGluGluGluAspThrValLysValValGlyIle
 360 370 380 390 400 410
 CCTGGGCGCCAGACCTGCCGCTACCTCCTGGTGAGAAGTCTTCACACGTTTAGTCAAGCT
 110 120
 ProGlyArgGlnThrCysArgTyrLeuLeuValArgSerLeuGlnThrPheSerGlnAla

FIGURA 20B

420 430 440 450 460 470
TGTTTACTTGCCGAGGTGCTACAGGGGCAACCTGGTTTCCATCCACAACCTCAATATT
130 140
TrpPheThrCysArgArgCysTyrArgGlyAsnLeuValSerIleHisAsnPheAsnIle
480 490 500 510 520 530
AATTATCGAATCCAGTGTTCGTGTCAGCGGCTCAACCAGGGTCAAGTCTGGATTGGAGGC
150 160
AsnTyrArgIleGlnCysSerValSerAlaLeuAsnGlnGlyGlnValTrpIleGlyGly
540 550 560 570 580 590
AGGATCACAGGCTCGGGTCGCTGCAGACGCTTTCAGTGGGTTGACGGCAGCCGCTGGAAC
170 180
ArgIleThrGlySerGlyArgCysArgArgPheGlnTrpValAspGlySerArgTrpAsn
600 610 620 630 640 650
TTTGCCTACTGGGCTGCTCACCAGCCTGGTCCC GGGTGGTCACTGCGTGGCCCTGTGTA
190 200
PheAlaTyrTrpAlaAlaHisGlnProGlyProAlaValValThrAlaTrpProCysVal
660 670 680 690 700 710
CCCGAGGAGGCTACTGGCGTCGAGCCACTGCCTCAGAAGATTCTTTCATCTGTTCTTAC
210 220
ProGluGluAlaThrGlyValGluProLeuProGlnLysIleProPheIleCysSerTyr

TGA

FIGURA 21



4

FIGURÁ 22

