

19



Octrooiraad
Nederland

11 194982

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 8820928

51 Int.Cl.⁷
C07K14/52

22 Ingediend: 12.11.1988

86 Oorspronkelijke internationale aanvraag:
PCT/EP88/01025

87 Publicatienummer en -datum oorspronkelijke
internationale aanvraag: WO 89/04836 01.06.1989

30 Voorrang:
19.11.1987 GB 0008727053
03.03.1988 GB 0008805070
28.10.1988 GB 0008825258

43 Ter inzage gelegd:
02.10.1989 I.E. 1989/19

47 Dagtekening:
10.04.2003

45 Uitgegeven:
02.06.2003 I.E. 2003/06

73 Octrooihouder(s):
Theodor Kocher Institut te Bern, Zwitserland
(CH).
Novartis AG te Basel, Zwitserland (CH).

74 Gemachtigde:
Ir. A. van Westenbrugge c.s. te 2517 KZ Den
Haag.

54 Neutrofiel-activerende factor (NAF) in geïsoleerde vorm, werkwijze voor het bereiden van NAF,
expressievector met een codering voor NAF en een NAF bevattend farmaceutisch preparaat.

NL C 194982

Dit octrooi is verleend onder toepassing van artikel 102b van de rijkswet van 19 december 2002 tot wijziging van de Rijksoctrooiwet 1995 in verband met de behandeling van octrooiaanvragen die zijn ingediend op grond van de Rijksoctrooiwet (Stb. 2003, 35)

Neutrofiel-activerende factor (NAF) in geïsoleerde vorm, werkwijze voor het bereiden van NAF, expressievector met een codering voor NAF en een NAF bevattend farmaceutisch preparaat

De uitvinding heeft betrekking op een neutrofiel-activerende factor (NAF) in geïsoleerde vorm, afgeleid van humane monocytten. Een dergelijke NAF is bekend uit de hieronder genoemde publicaties van Babior en Baggiolini.

De meeste normale leukocyten zijn de neutrofiele leukocyten (neutrofielen) en deze maken 2/3^e van de witte cellen in humaan bloed uit. Ze hebben één hoofdfunctie, het beschermen van het gastheerorganisme tegen microbiële infecties. De neutrofielen zijn mobiel en verantwoordelijk voor chemotactische stimuli ontwikkeld bij infecties en zijn in staat zich naar geïnfecteerde weefsels te verplaatsen teneinde de micro-organismen te doden. Dit doden hangt af van het vermogen van de neutrofielen de micro-organismen uit te schakelen en zuurstofradicalen en microbicidale enzymen vrij te maken (B.M. Babior, *New Engl. J. Med.* 298 (1978) 659–668 en M. Baggiolini, *Experientia* 40 (1984) 906–909). Het vrijmaken van dergelijke producten hangt van de activering van de neutrofielen af. Materialen zoals de neutrofiel-activerende factor (NAF), die hierin is beschreven, kunnen dus worden toegepast ter versterking van de neutrofiel-activering en daardoor van het antimicrobiële afweermechanisme van het menselijk lichaam.

Gebleken is, dat humane monocytten een factor afscheiden die exocytose en de respiratoire uitstorting (vorming van zuurstofradicalen en afgifte van enzymen) in humane neutrofielen induceert en dus neutrofiel-activerende eigenschappen vertoont die van belang zijn bij de antimicrobiële werking.

De factor kan worden verkregen uit de cultuurvloeistof van gestimuleerde humane monocytten en heeft een schijnbaar molecuulgewicht van ongeveer 6000, nauwkeuriger ongeveer 6500, bij de SDS-gelelektroforese.

Monocytten zijn fagocytische cellen, overeenkomstig neutrofielen. In tegenstelling met neutrofielen leven monocytten echter lang. Ze migreren uit het bloed naar alle mogelijke weefselgebieden waar ze zich transformeren tot macrofagen. De transformatie van monocytten in macrofagen kan eveneens bij proeven in celcultures worden waargenomen. De macrofagen in de weefsels hebben vele functies, voornamelijk fagocytose van ongewenst materiaal en de productie van vele peptiden en eiwitten die worden afgescheiden. Macrofagen verzamelen zich op de plaats van de aanhoudende infectie en het is in deze gebieden dat de productie van NAF door deze cellen de vermogens van de neutrofielen om de gastheer te beschermen kan versterken en aldus een pathofysiologisch relevante functie hebben.

NAF wordt gekenmerkt door zijn neutrofiel-activerende eigenschappen, dat wil zeggen inductie van de zogenaamde respiratoire uitbarsting onder vorming van zuurstofradicalen en inductie van enzymafgifte. In moleculaire waarden wordt NAF gekarakteriseerd door de volgende eigenschappen: een schijnbaar molecuulgewicht van ongeveer 6500 in SDS-gelelektroforese, een isoëlektrisch punt van ongeveer 8,6, een bestandheid tegen verwarmen tot 80°C en tegen een aantal denatureringsmiddelen, doch gevoelig voor proteasen, hetgeen de indruk maakt dat NAF een polypeptide is. De werking van NAF op humane neutrofielen is overeenkomstig die van twee bekende chemotactische stimuli, het anafylatoxine C5a en het bacteriële peptide N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-fenyl-alanine (fMLP), doch wordt gemedieerd door een oppervlakreceptor waaraan NAF bindt en die verschilt van de receptoren van elke bekende agonist van humane neutrofielen. In cultuur wordt NAF geproduceerd door humane monocytten, doch niet door humane lymfocyten. De productie hangt af van de aanwezigheid van een stimulusachtig bacterieel lipopolysaccharide (LPS), fytohaemagglutinine (PHA), of concanavaline A (ConA) en van de stimulusconcentratie en incubatietijd. Ze wordt geremd door cycloheximide, hetgeen erop wijst dat de *de novo* synthese van eiwit erbij is betrokken.

Zoals reeds werd vermeld, zijn monocytten en macrofagen overvloedige bronnen van vele bioactieve peptiden en eiwitten (C.F. Nathan, *J. Clin. Invest.* 79 [1987] 319–326). Ze zijn geïdentificeerd als de producten van drie bepaalde cytokinen: interleukine (IL-1), tumornecrosefactor (TNF) en interferon- α (IFN- α). Er is een aantal verslagen gepubliceerd, waaruit blijkt, dat monocytten en macrofagen eveneens factoren die werken op neutrofielen produceren, die verschillen van die welke hiervoor zijn vermeld. Aangezien ze actief zijn op neutrofielen, worden deze factoren hierna uitvoeriger behandeld. In verschillende publicaties is vermeld dat alveolaire macrofagen factoren vrijmaken, die chemotactisch zijn voor neutrofielen (J.A. Kazmierowski en med., *J. Clin. Invest.* 59 [1977] 273–281; W.W. Merrill en med., *J. Clin. Invest.* 65 [1980] 268–270 en G.W. Hunninghake en med., *J. Clin. Invest.* 66 [1980] 473–483), die de antimicrobiële afweer in de longen kan versterken. Daarna werd aangetoond dat deze factoren de microbicidale werking van neutrofielen versterken (J.E. Pennington en med., *J. Infect. Dis.* 148 [1983] 101–109 en *J. Clin. Invest.* 75 [1985] 1230–1237). Zuivering door gelfiltratie en chromatofocussing leiden tot de identificatie van een protease-gevoelige factor (NAF genoemd) die door alveolaire macrofagen, met een molecuulgewicht van

6000 en een isoëlektrisch punt van 7,6, wordt gevormd. Van deze factor werd vermeld dat ze zwak chemotactisch is en de doding van gefagocytoseerde bacteriën door neutrofielen versterkt, zonder echter zelf de productie van zuurstofradicalen of de vrijmaking van enzymen te induceren. Een overeenkomstig mechanisme van een versterkte anti-microbiële werking werd door andere werkers (A. Ferrante en med.,

- 5 Clin. Exp. Immunol. 56 [1984] 559-566) beschreven, die aantoonde dat humane neutrofielen het toevoegen van cultuurmedia uit monocyt en/of macrofagen vereisten teneinde het doden van *Neigleria fowleri* te induceren. Granulocyten-activerende mediators (GRAM) geproduceerd door LPS-simulerende humane monocyt en/of macrofagen beschreven (A. Kapp en med., J. Invest. Dermatol. 86 [1986] 523-528 en F.E. Maly en med., Lymphokine Res. 5 [1986] 21-33). Twee GRAM-species zijn
- 10 beschreven, de belangrijkste met een schijnbaar molecuulgewicht van 60.000 en de minder belangrijke met een schijnbaar molecuulgewicht van 10.000, die een late respiratoire uitbarstingsrespons in humane neutrofielen induceert, zoals door chemiluminescentie blijkt. Deze factoren zijn gevoelig voor warmte en trypsine en hun productie hangt af van de stimulering van de monocyt en/of macrofagen met LPS en blijkbaar van de novo eiwitsynthese.

- 15 In vele verslagen zijn factoren afgeleid van monocyt en/of macrofagen met een chemotactische werking tegen neutrofielen beschreven. Een factor genaamd "mononuclear cell-derived chemotaxin" (MOC), blijkbaar een peptide met een molecuulgewicht van 10.000, dat verschilt van GRAM is beschreven door E. Kownatzki en med., Clin. Exp. Immunol. 64 [1986] 214-222. Een neutrofiële chemotactische factor geproduceerd door humane bloedmonocyt en/of macrofagen gestimuleerd door LPS, met een molecuulgewicht van
- 20 ongeveer 10.000 en een isoëlektrisch punt van 8-8,5, was eveneens bekend (T. Yoshimura en med., J. Immunol. 139 [1987] 788-793). Tenslotte is eveneens beschreven dat peritoneale macrofagen van ratten die in een cultuur waren gestimuleerd met LPS een selectieve neutrofiële chemotactische factor vrijmaken (F.Q. Cunha en med., J. Med. Biol. Res. 19 [1986] 775-777 en Eur. J. Pharmacol. 129 [1986] 65-76.

- Het is tengevolge van de inleidende aard van de biochemische informatie die in deze verslagen
- 25 aanwezig is onmogelijk om te speculeren over overeenkomsten en verschillen wat de structuur betreft tussen deze vele, hiervoor beschreven, factoren.

- Na de voorrangsdatum (a) die is (zijn) geclaimd voor de onderhavige uitvinding, werd een zuivering van een peptide waarschijnlijk overeenkomende met NAF beschreven door Van Damme en med. (J. van Damme en med., J. Exp. Med. 167 [1988] 1364-1376) en is in volgorde identiek aan die van NAF vermeld
- 30 door Gregory en med., (H. Gregory en med., Biochem. Biophys. Res. Commun. 151 [1988] 893-890) voor een peptide, dat werd gezuiverd uit de bovenstaande vloeistoffen van door lectine gestimuleerde humane lymfocyten. Het cDNA coderende voor MDNCF (T. Yoshimura en med., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84 [1987] 9233-9237) werd onlangs gekloond (K. Matsushima en med., J. Exp. Med. 167 [1988] 1883-1893) en bleek overeen te komen met het 3-10C cDNA (J. Schmid en C. Weissmann, J. Immunol. 139 [1987] 250-256). Schmid en Weissmann hebben aangetoond dat het peptide gecodeerd door 3-10C cDNA een
- 35 structurele homologie met plaatjesfactor 4 β -thromboglobuline, bindweefsel-activerend peptide III (CTAP-III) en interferon- γ -induceerbaar peptide (γ -IP-10) heeft. Deze moleculen zijn eveneens homoloog met een uit 73 resten bestaand peptide (MGSA) met melanoma groei stimulerende eigenschappen (A. Richmond en med., EMBO J. 7 [1988] 2025-2033), waarvan de volgorde erg lijkt op die gededuceerd uit het gro-cDNA
- 40 geïsoleerd uit fibroblasten (A. Anisowicz en med., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84 [1987] 7188-7192). Een murine macrofaag-afgeleid inflammatoir proteïne (MIP), waarschijnlijk verwant met de hiervoor beschreven eiwitten, werd eveneens beschreven (G. Davatelis en med., J. Exp. Med. 167 [1988] 1939-1944) en blijkt een lid van een familie van peptiden, waaronder RANTES, het 8 kd product van een cDNA geïsoleerd uit IL-2
- afhankelijke, antigeengestuurde humane T-cel klonen (T.J. Schall en med., J. Immunol. 141 [1988] 1018-1029) te zijn. De functies van deze peptiden zijn vrijwel onbekend. Van MGSA en CTAP-III (C.W. Castor en med., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80 [1983] 765-769) werd vermeld dat ze mitogeen zijn en
- 45 plaatjesfactor 4 bleek immunomodulerende effecten te bezitten (A.D. Barone en med., J. Biol. Chem. 263 [1988] 8710-8715).

- De verkregen resultaten suggereren dat NAF op selectieve wijze neutrofielen activeert met een
- 50 receptor-gemedieerde werkwijze die overeenkomt met die welke door chemotactische agonisten werd geïnitieerd.

Gevonden werd een in de aanhef aangegeven neutrofiel activerende factor (NAF), gekenmerkt door de volgende volledige aminozuurvolgorde:

- X-Leu-Arg-Cys-Gln-Cys-Ile-Lys-Thr-Ser-Lys-Pro-Phe-His-Pro-Lys-Phe-Ile-Lys-Glu-Leu-Arg-Val-Ile-
- 55 Glu-Ser-Gly-Pro-His-Cys-Ala-Asn-Thr-Glu-Ile-Ile-Val-Lys-Leu-Ser-Asp-Gly-Arg-Glu-Leu-Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lys-Phe-Leu-Lys-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser, waarbij
- X = Ser-Ala-Lys-Glu.

Deze NAF verschilt van alle tot nu toe beschreven receptoren.

Voorts heeft een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding betrekking op NAF-derivaten waarbij X = Lys-Glu of X = Glu is. De uitvinding heeft tevens betrekking op NAF als hierboven beschreven, welke is verkregen via een synthetische en/of recombinant DNA-werkwijze.

- 5 Tevens heeft de uitvinding betrekking op werkwijzen voor het bereiden van de bovengedefinieerde drie NAF-derivaten volgens de uitvinding, welke werkwijzen gekenmerkt worden
- doordat men de bovenstaande vloeistof van humane monocultures chromatografisch zuivert en wint, of
 - door tot expressie brengen in E.coli van een expressievector, bevattend een nucleotidesequentie coderend voor een polypeptide met een van de bovenaangeduide aminozuurgordens en winnen ervan.
- 10 De uitvinding betreft eveneens de expressievector p(NAF)-6T3 en equivalenten daarvan, welke geschikt zijn voor de laatstgenoemde werkwijze.

Daarnaast heeft de uitvinding betrekking op een farmaceutische preparaat, dat NAF volgens de uitvinding tezamen met een farmaceutisch aanvaardbare droge of verdunningsmiddel bevat.

Tenslotte betreft de uitvinding een farmaceutisch preparaat, dat een NAF bevat met de volgende

- 15 volledige aminozuurgorde:

X-Leu-Arg-Cys-Gln-Cys-Ile-Lys-Thr-Tyr-Ser-Lys-Pro-Phe-His-Pro-Lys-Phe-Ile-Lys-Glu-Leu-Arg-Val-Ile-Glu-Ser-Gly-Pro-His-Cys-Ala-Asn-Thr-Glu-Ile-Ile-Val-Lys-Leu-Ser-Asp-Gly-Arg-Glu-Leu-Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lys-Phe-Leu-Lys-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser, waarbij X = Ala-Val-Leu-Pro-Arg-Ser-Ala-Lys-Glu-, geschikt voor gebruik bij de behandeling van aandoeningen die

- 20 gepaard gaan met of veroorzaakt worden door een modificatie van het aantal of activeringstoestand van polymorfonucleaire celneutrofielen.

De volledige aminozuurgorde van NAF werd bepaald volgens bekende sequencingmethoden: Ser-Ala-Lys-Glu-Leu-Arg-Cys-Gln-Cys-Ile-Lys-Thr-Tyr-Ser-Lys-Pro-Phe-His-Pro-Lys-Phe-Ile-Lys-Glu-Leu-Arg-Val-Ile-Glu-Ser-Gly-Pro-His-Cys-Ala-Asn-Thr-Glu-Ile-Ile-Val-Lys-Leu-Ser-Asp-Gly-Arg-Glu-

- 25 Leu-Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lys-Phe-Leu-Lys-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser.

Ontleding volgens Edman van het volledige eiwit en van de typtische fragmenten T 7-26 en T 27-47 verkregen na gaven de volgorde tot en met de 47-plaats. Hydrolyse met 75%-ig mierenzuur en ontleding volgens Edman gaven twee ongeveer equimolaire volgorden van 20 aminozuren, gevolgd door een enkelvoudig patroon overeenkomende met de amino eindstandige volgorde van NAF na de 20-plaats. De

30 volgorde van het carboxyl eindstandige peptide A 53-72 werd bepaald door aftrekking en bevestigd door de analyse van het typtische peptide T 61-72. De carboxypeptidasen A en B gaven geen aantoonbaar splitsingsproduct, doch na behandeling van 1 n mol NAF met carboxypeptidase werd Y 120 pmol serine vrijgemaakt, hetgeen wijst op serine als carboxyl eindstandige groep.

- Uit analyses van verschillende NAF-ladingen blijkt enige amino eindstandige heterogeniteit. De hiervoor
- 35 beschreven volgorde is voor het hoofdbestanddeel (ongeveer 70%), die voornamelijk verantwoordelijk voor de biologische eigenschappen wordt geacht. Er konden drie andere varianten worden geïdentificeerd.

Volgorde 1 (ongeveer 17%):

Ala-Val-Leu-Pro-Arg-Ser-Ala-Lys-Glu-Leu-Arg-Cys-Gln-Cys-Ile-Lys-Thr-Tyr-Ser-Lys-Pro-Phe-His-Pro-

- 40 Lys-Phe-Ile-Lys-Glu-Leu-Arg-Val-Ile-Glu-Ser-Gly-Pro-

dat wil zeggen de hiervoor beschreven volledige volgorde verder uitgebreid aan de N-eindstandige groep met Ala-Val-Leu-Pro-Arg- (het volledige eiwit bevat dus 77 aminozuren).

Volgorde 2 (ongeveer 8%):

- 45 Lys-Glu-Leu-Arg-Cys-Gln-Cys-Ile-Lys-Thr-Tyr-Ser-Lys-Pro-Phe-His-Pro-Lys-Phe-Ile-Lys-Glu-Leu-Arg-Val-Ile-Glu-Ser-Gly-Pro-

dat wil zeggen de hiervoor beschreven volledige volgorde aan de stikstof eindstandige groep tekort met Ser-Ala- (het volledige eiwit bevat dus 70 aminozuren).

- 50 *Volgorde 3 (ongeveer 5%):*

Glu-Leu-Arg-Cys-Gln-Cys-Ile-Lys-Thr-Tyr-Ser-Lys-Pro-Phe-His-Pro-Lys-Phe-Ile-Lys-Glu-Leu-Arg-Val-Ile-Glu-Ser-Gly-Pro-

dat wil zeggen de hiervoor aangegeven volledige volgorde aan de stikstof eindstandige groep bekort met Ser-Ala-Lys- (het volledige eiwit bevat dus 69 aminozuren).

- 55 Al deze volgorden kunnen dus in overeenstemming worden gebracht met de voorspelde volgorde uit 3-10C cDNA, bestaande uit 99 aminozuren (J. Schmid en C. Weissmann, J. Immunol. 139 [1987] 250-254). Het NAF hoofdpeptide komt overeen met de plaatsen 28-99 van de 3-10C aminozuurgorde, terwijl de

drie hiervoor genoemde varianten beginnen op de plaatsen 23 (volgorde 1), 30 (volgorde 2) en 31 (volgorde 3) ervan.

- 5 Vergelijking van de 3-10C cDNA-afgeleide volgorde met de hiervoor gegeven volgordewaarden doet veronderstellen dat mononucleaire fagocyten een voorloper van NAF synthetiseren die in de cellen wordt verwerkt. Het peptide met 77 resten kan de grootste afgescheiden vorm van NAF zijn, aangezien dit overeenkomt met de van cDNA-afgeleide volgorde verminderd met het voorspelde signaalpeptide van 22 aminozuren. De belangrijkste NAF-species met 72 resten en de analoga met 70 en 69 resten kunnen door verdere posttranslationale modificaties zijn gevormd.

- 10 Alle NAF-vormen hebben vier cysteïneresten, die volgens verwachting disulfidebruggen tussen de ketens zullen vormen, die van belang voor de activiteit schijnen te zijn, aangezien mercaptoethanol een remmende werking bleek te hebben (P. Peveri en med., J. Exp. Med. 167 [1988] 1547-1560). De disulfidebruggen verbinden waarschijnlijk de 7-34 en 9-50 plaatsen zoals in β -thromboglobuline en plaatjesfactor 4, die gedeeltelijk homoloog zijn aan NAF.

- 15 In overeenstemming met de homologie met β -thromboglobuline heeft NAF twee intramoleculaire disulfidebruggen. Daarom is het berekende molecuulgewicht 8384,7, dus duidelijk hoger dan het schijnbare molecuulgewicht gevonden door SDS-gelelektroforese.

De productie van NAF uit natuurlijke bronnen, zoals humane monocytten, leidt tot slechte opbrengsten en vereist uitgebreide en gecompliceerde zuiveringsstappen.

- 20 Teneinde NAF volgens synthetische werkwijzen die tot grotere hoeveelheden en betere opbrengsten leiden te bereiden, zijn bijvoorbeeld totale chemische syntheses of recombinant DNA werkwijzen geïndiceerd. De bereiding van synthetisch NAF, bijvoorbeeld volgens recombinant DNA-methoden, waaronder expressie in een prokaryotisch of eukaryotisch expressiesysteem, bijvoorbeeld in *E.coli*, maakt eveneens deel uit van de uitvinding. Synthetisch NAF, dat wil zeggen NAF geproduceerd volgens synthetische werkwijzen, zoals recombinant DNA werkwijzen, maakt eveneens deel uit van de uitvinding. Synthetisch
25 NAF, bijvoorbeeld het recombinant NAF dat bijvoorbeeld uit bacteriën is geïsoleerd, heeft dezelfde aminozuurvolgorde(n) als natuurlijk NAF en dezelfde biologische eigenschappen en activiteiten. "Recombinant NAF" geeft NAF verkregen door recombinant DNA-werkwijzen aan.

- De bereiding van NAF door recombinant DNA-werkwijzen wordt volgens bekende methoden uitgevoerd, namelijk synthese, zuivering en met elkaar verbinden van overeenkomstige oligonucleotiden, klonen van het
30 synthetische NAF-gen, tot expressie brengen in bijvoorbeeld *E.coli* en tenslotte winning en zuivering van recombinant NAF. Zo werd bijvoorbeeld een gen coderende voor het uit 72 aminozuren bestaande NAF gesynthetiseerd, bij voorkeur met codonoptimalisatie, daarna gekloond en tot expressie gebracht in *E.coli*.

- Western blot analyse van natuurlijke bacteriële extracten onder toepassing van een antiserum gekweekt tegen natuurlijk NAF, geeft één enkele band, die samen met natuurlijk NAF migreert. Recombinant NAF dat
35 tot homogeniteit is gezuiverd heeft identieke amino- en carboxyl-eindstandige volgorden, zoals de uit 72 aminozuren bestaande natuurlijke NAF. Bij onderzoek op humane neutrofielen bleek ze dezelfde werking en werkingskracht te hebben als natuurlijk NAF in inducerende chemotaxis, een snelle steiging van cytosolisch-vrij Ca^{2+} te geven, tot activering van de respiratoire uitbarsting te leiden en specifieke en azurofiel granule-gehalten vrij te maken.

- 40 In figuur 13 is de structuur van een synthetisch NAF-gen afgebeeld. Veranderingen zijn duidelijk over de coderende volgorde van het 3-10C cDNA, teneinde expressie in *E.coli* te vergemakkelijken. Aan het 3'-uiteinde is de in de natuur voorkomende terminator TAA vervangen door een triple terminator TAATAATGA en een BamHI-plaats is onmiddellijk stroomafwaarts toegevoegd. Aan het 5'-uiteinde zijn SphI en GluI-plaatsen toegevoegd teneinde het opnemen in respectievelijk de klineringsvector en de expressie-
45 vector mogelijk te maken. Bij base 34 is een TaqI restrictieplaats gevormd voor de latere manipuleringen aan het 5'-uiteinde door verandering van het Arg codon uit AGA en CGA.

- Het bloksgewijze annealing (oligonucleotiden 1-2, 3-4 en 5-6) biedt geen voordeel boven de gelijktijdige binding van alle zes oligonucleotiden. 5'-Fosforylering van alle oligonucleotiden geeft aanleiding tot bindingsproducten die groter zijn dan de verwachte grootte, doch indien de eindstandige oligonucleotiden (1
50 en 6) niet gefosforyleerd zijn, is het product met het hoogste molecuulgewicht het volledige gen met 248/240 basen. Het gen wordt gebonden in SphI/BamHI-cut pBS M13⁻ en getransformeerd in *E.coli*. Plasmide DNA geïsoleerd uit zes van de verkregen, tegen ampicilline bestand zijnde koloniën werd geknipt met ClaI/BamHI, telkens onder vorming van een 237 bp band op een 1,4% agarosegel. DNA sequencing vertoont de klonen die de juiste volgorde bevatten. De ClaI/BamHI-band uit een juiste kloon wordt uit de gel
55 verwijderd en gekloneerd in de Trp-promotervector pL402 (Term). Als mogelijk middel voor het toenemen van de expressie, kan een synthetische transcriptieterminator (zie voorbeeld 17) in deze vector gehecht aan het 3'-uiteinde van de humane GM-CSF-gen bij de BamHI plaats worden opgenomen. Het NAF-gen wordt

daartoe opgenomen tussen deze BamHI en de ClaI-plaats stroomafwaarts van de transcriptie initiatieplaats in de promotor, ter vervanging van het GM-CSF-gen. Het verkregen NAF-expressieplasmide p(NAF)-6T3, is weergegeven in figuur 14.

- 5 Zilvervlekken en western blot analyse van extracten van door indoolacrylzuur-geïnduceerde E.coli bevattende p(NAF)-6T3 toont de tijdsafhankelijke productie van een peptide, dat migreert met natuurlijk NAF en reageert met een antiserum tegen natuurlijk NAF, aan.

Het hiervoor beschreven expressiesysteem kan eveneens worden toegepast ter bereiding van de hiervoor genoemde NAF-varianten of andere biologisch actieve NAF-fragmenten, zoals amino-truncated NAF-fragmenten.

- 10 De biologische eigenschappen van NAF zijn species specifiek. De werking in het konijn komt het meest overeen met de werking bij mensen. Voorafgaande proeven bij muizen, ratten en Guinese biggetjes wezen niet op een duidelijke werking.

- NAF is geïndiceerd voor toepassing bij de behandeling van aandoeningen die gepaard gaan met of veroorzaakt worden door, plaatselijk of systemisch, een modificatie van het aantal of de activeringstoestand van de PMN (polymorfonucleaire cellen – neutrofielen). NAF modificeert in sterke mate deze PMN parameters en is daarom geïndiceerd voor toepassing bij de behandeling van aandoeningen waarbij een verhoging van het aantal of de activeringstoestand van PMN leidt tot een klinische verbetering, bijvoorbeeld bij bacteriële, mycoplasma, gist en schimmel en virusinfecties. Verder is NAF geïndiceerd voor toepassing bij ontstekingsziekten, zoals psoriasis, arthritische aandoeningen en astma of bij ziekten met een abnormaal laag neutrofiel getal en/of die geleid hebben tot een lage neutrofiel Spiegel en ter bereiding van antagonisten voor toepassing bij deze indicaties.
- 20

Figuur 1: NAF-productie geïnduceerd door LPS

- Mononucleaire cellen die zijn afgescheiden op de wijze als beschreven in voorbeeld 1 werden geënt in cultuurplaten met 24 putjes (5×10^6 cellen in 1 ml) en gestimuleerd met LPS met de aangegeven concentraties. Op verschillende tijdsperioden werden de media verzameld, geklaard door centrifugeren (20.000 omw./min. gedurende 20 min. bij 4°C) en de NAF-werking werd gemeten. Cellen van één enkele donor; middel voor duplicaatcultures. Deze resultaten zijn representatief voor vier overeenkomstige proeven onder toepassing van cellen van verschillende donoren.
- 25

30

Figuur 2: productie van NAF door mononucleaire fagocyten, doch niet door lymfocyten

- a) De totale mononucleaire celfractie (●, ■, 5×10^6 cellen/ml) en daaraan hechtende cellen die ervan zijn afgeleid (○, □) werden 24 uren gekweekt in de aanwezigheid (●, ○) en afwezigheid (■, □) van 100 ng LPS.

- 35 b) Monocyten (○, 10^6 cellen/ml) en lymfocyten (Δ, 4×10^6 cellen/ml) die waren gezuiverd door elutriatie werden gekweekt in de aanwezigheid van 100 ng LPS.

- Grafieken geven de gemiddelde relatieve waarden voor de vrijmaking van elastase uit 5(a) en 6(b) afzonderlijk proeven, elk in tweevoud uitgevoerd, weer. De waarden zijn genormaliseerd door de 24-uurwaarde van ● te plaatsen in panel a en ○ in panel b gelijk aan 1,0 en de overige waarden (gemiddeld $\pm$ S.D.) ten opzichte ervan te berekenen. Dit type weergave werd gekozen teneinde rekening te houden met de individuele variatie bij de NAF-productie enerzijds en in respons op de neutrofielen die werden toegepast voor het onderzoek van NAF anderzijds.
- 40

Figuur 3: gedeeltelijke zuivering van NAF door fosfocellulosechromatografie

- 45 De verdeling van eiwit (absorptie bij 280 nm, ---), NAF (○) en IL-1 (Δ) is aangegeven. De fracties met de hoogste NAF-waarden werden verzameld, zoals werd beschreven.

Figuur 4: zuivering van NAF door HPLC-gelfiltratie

- a) Verdeling van eiwit (absorptie bij 280 nm) en elutietijden van molecuulgewichtsmerkers (pijlen: 1 = mol.gewicht 66200, 2 = mol.gewicht 42700, 3 = mol.gewicht 21500, 4 = mol.gewicht 6500 en 5 = mol.gewicht 1255).
- 50 b) Profiel van de NAF-werking.

Figuur 5: zuivering van NAF door chromatografie over hydroxylapatiet

- 55 De kolom werd beladen met gedeeltelijk gezuiverd NAF met een lage zoutconcentratie en vervolgens geëluëerd met een buffer die 1M natriumchloride bevatte. De blokken geven de NAF-werking aan.

Figuur 6: zuivering van NAF door chromatograferen over heparine-sefarose

Gedeeltelijk gezuiverd NAF werd gebracht op de kolom bij een lage zoutconcentratie en vervolgens geëluëerd met een buffer die 1,5 M natriumchloride bevatte. De blokken of kolommen geven de NAF-werking aan.

5

Figuur 7: zuivering van NAF door in de omgekeerde fase uitgevoerde HPLC op een C4-kolom

- a) Een RP-kolom werd beladen met gezuiverd NAF in 0,1%-ig trifluorazijnzuur. De kolom werd ontwikkeld met een lineaire gradiënt van acetonitril in 0,1%-ig trifluorazijnzuur.
- b) De blokken geven de NAF-werking aan.

10

Figuur 8: zuivering van NAF door in de omgekeerde fase uitgevoerde HPLC over een CN-propylkolom

- a) Een Bakerbond CN-propylkolom werd beladen met gezuiverd NAF in 0,1%-ig trifluorazijnzuur. De kolom werd ontwikkeld met een lineaire gradiënt van n-propanol in 0,1%-ig trifluorazijnzuur.
- b) De kolommen geven de NAF-werking aan.

15

Figuur 9: zuivering van NAF door chromatofocussing

Gedeeltelijk gezuiverde NAF werd gebracht op een chromatofocusserende kolom. De kolom werd ontwikkeld met polybuffer 96-HCl, pH 7,0. De fracties werden onderzocht op de NAF-werking (—■—) en op de pH (—■—).

20

Figuur 10: respiratoire uitbarsingsrespons op gedeeltelijk gezuiverd NAF

- a) Superoxideproductie: neutrofielen ($3 \times 10^6/\text{ml}$) werden van tevoren bij 37°C gedurende 2 min. geïncubeerd met of zonder 1 μM PAF en daarna gestimuleerd met toenemende hoeveelheden NAF. Registraties van cytochroom c vermindering na de toevoeging van NAF is aangegeven.
- 25 b) Waterstofperoxide-afhankelijke chemiluminescentie: de progressiekrommen na stimulering met gedeeltelijk gezuiverde NAF en ongeveer even actieve concentraties van C5a en fMLP zijn links afgebeeld. De beginfase van de respons is uitvoerig weergegeven aan de rechterkant. De stimulantia werden toegevoegd in 50 μl PBS-BSA.

30 Figuur 11: onderscheid tussen NAF en C5a

C5a en NAF werden 15 min. geïncubeerd met vers humaan serum of met PBS en de werking van de preparaten werd bepaald (superoxideproductie).

- a) C5a in PBS,
- b) C5a in serum,
- 35 c) serum alleen,
- d) NAF in PBS,
- e) NSF in serum.

Figuur 12: superoxidevorming in respons op opeenvolgende stimulering met gedeeltelijk gezuiverde NAF,

40 C5a en fMLP

- a) Neutrofielen ($3 \times 10^6/\text{ml}$) werden van tevoren 5 min. geïncubeerd bij 37°C en daarna gestimuleerd met verschillende agonisten, zoals is aangegeven (pijlen).
- b) Achtereenvolgens of herhaalde stimulering met NAF en C5a. De omstandigheden zijn zoals beschreven onder a).

45

De pijlen geven de toevoeging van agonisten, op de beschreven wijze, aan. De concentratie van C5a is 0,5 nM in a) en 0,2 nM in b), die van fMLP is 20 nM bij beide proeven. De agonisten werden toegevoegd in 50 μl PBS-BSA.

Figuur 13: nucleotidevolgorde van het synthetische NAF-gen De enkelvoudige oligonucleotiden, ON-1-ON-6,

50

toegepast voor het opbouwen van het gen zijn aangegeven door onderbroken lijnen. De (onderstreepte) nucleotidegetallen verschijnen aan de rechterkant boven de dubbele streng. De overeenkomstige peptidevolgorde van de hoofdvorm is genummerd, te beginnen bij het amine eindstandige uiteinde (Ser). De ClaI en BamHI restrictieplaatsen zijn aangegeven boven de dubbele streng. De TaqI-plaats die verkregen wordt door substitutie van een C voor de A in het argininecodon is eveneens weergegeven.

55

Figuur 14: expressievector p(NAF-6T3)

A^R = tegen ampicilline resistent gen

Trp P/O = tryptofaan promotor

T = synthetische transcriptie terminator

Figuur 15: identiteit van natuurlijk en recombinant NAF

- 5 Bovenste grafieken: cytosolisch vrije Ca^{2+} veranderingen geïnduceerd door natuurlijk (links) en recombinant (rechts) NAF. Neutrofielen (4×10^6 cellen/ml) werden beladen met 0,1 nmol quin-2/AM en daarna gestimuleerd met 3 nM NAF (merk). Quin-2 verzadigingsveranderingen werden gekalibreerd op de wijze als beschreven in V. Von Tscharner en med., *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 10163–10168.
- Onderste grafieken: respiratoire uitbarsting geïnduceerd door natuurlijk (links) en recombinant (rechts) NAF. Neutrofielen (10^6 cellen/ml) werden op tijdstip nul gestimuleerd met 3, 10 en 30 nM NAF en de waterstofperoxidevorming werd met chemiluminiscentie gemeten (M.P. Wymann en med., *Anal. Biochem.* 165 [1987] 371–378).
- 10

Figuur 16: plasmalek in huidgebieden

- 15 Na intradermale injectie van NAF of endotoxine;
duur: 4 uren;
gemiddelde $\pm$ standaardfouten van de gemiddelde respons van drie konijnen.

Figuur 17: neutrofiele accumulatie op huidgedeelten

- 20 Gelijktijdige bepaling met de responsen uitgezet in figuur 16.

Figuur 18: effect van polymyxine B op neutrofiel accumulatie

- Na intradermale injectie van NAF (10^{-9} mol/plaats), fMLP (10^{-9} mol/plaats) of endotoxine (10^{-13} mol/plaats);
- 25 Polymyxine B: 40 μg /plaats,
duur: 2 uren;
gemiddelde $\pm$ standaardfouten van de gemiddelde responsen van drie konijnen.

Figuur 19: effect van actinomycine D op neutrofiele accumulatie

- 30 Na stimulatie van huddelen met NAF (10^{-9} mol/plaats), fMLP (10^{-9} mol/plaats) of endotoxine (10^{-13} mol/plaats);
duur: 2 uren;
gemiddelde $\pm$ standaardfouten van de gemiddelde responsen van drie konijnen.

35 Voorbeelden

De volgende voorbeelden lichten de uitvinding toe. Alle temperaturen zijn uitgedrukt in $^{\circ}\text{C}$. De volgende afkortingen werden toegepast:

- PHA: fytohaemagglutinine
ConA: concanavaline A
40 LPS: E.coli lipopolysaccharide
BSA: runderserumalbumine
fMLP: N-formyl-L-methionyl-L-Leucyl-L-fenylalanine
PAF: 1-O-hexadecyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-fosfocholine (plaatjes activerende factor)
MEM: Eagle's minimaal essentieel medium (Seromed GmbH, München, FRG), aangevuld met 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ neomycine, gebufferd tot pH 7,4 met 25 mM NaHCO_3 en 20 mM HEPES
45 MEM-PPL: zoals hiervoor, bovendien bevattende 1% gepasteuriseerde plasmaproteïne-oplossing (5% PPL-SRK, Zwitsers Rode Kruis Laboratorium, Bern, Zwitserland) en 100 IU/ml penicilline en streptomycine (Gibco A.G., Basel, Zwitserland)
PBB: met fosfaat-gebufferde zout zonder Ca^{2+} en Mg^{2+} (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM NaH_2PO_4 en 1,5 mM KH_2PO_4 , ingesteld op pH 7,4)
50 PBS-BSA: PBS aangevuld met 0,9 mM CaCl_2 , 0,49 mM MgCl_2 en 2,5 mg/ml BSA
HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethaansulfonzuur
PPL-SRK: plasma eiwitoplossing (het Zwitserse Rode Kruis
NAF: neutrofiel-activerende factor of eiwit
55 CX: cycloheximide
IL-1: interleukine-1

- SOD: superoxide
 C5a: anafylatoxine
 CPC: bepaald poreus glas
 5 PAGE: polyacrylamidegelelektroforese
 GM-CSF: granulocyt-macropaagkolonie-stimulerende factor
 CB: cytochalastine B (5 µg/ml)
 MES: 2-[N-morfolino]ethaansulfonzuur
 HPLC: onder hoge druk uitgevoerde vloeistofchromatografie
 10 SDS: natriumdodecylsulfaat.

Deel I: NAF-productie door humane monocyten

Voorbeeld 1: bereiding van NAF door humane monocyten gestimuleerd door LPS

- Humane monocyten werden geïsoleerd uit buffy coats van donorbloed (Zwitserse Rode Kruis Laboratorium, Bern, Zwitserland) door centrifugering door een Ficoll-Paque gradiënt. Deze methode scheidt neutrofielen van de zogenaamde mononucleaire cellen, een mengsel van monocyten (ongeveer 20%) en lymfocyten (ongeveer 80%). Er werd gebruik gemaakt van drie monocytenpreparaten: (i) de totale mononucleaire celfractie, (ii) monocyten verrijkt uit de mononucleaire celfractie door aanhechting en (iii) 90% zuivere monocyten afgescheiden van de lymfocyten door centrifugaal elueren (G. Garotta en med., Biochem. Biophys. Res. Comm. 140 [1986] 948-954 en K.J. Clemetson en med., J. Exp. Med. 161 [1985] 972-983).
- 20 De cellen werden gekweekt in MEM-PPL en gestimuleerd met toenemende concentraties (0,1 ng tot 1 µg/ml) LPS. Op verschillende tijdstippen werden monsters van porties van de cultuurmedia genomen en werd de NAF-activiteit bepaald als de capaciteit voor het induceren van het vrijmaken van elastase uit humane neutrofielendie waren voorbehandeld met cytochalasine B (B. Dewald en med., Biochem. Pharmacol. 36 [1987] 2505-2510).

- 25 Mononucleaire celculturen (5×10^6 cellen/ml) bestaande uit monocyten en lymfocyten in een verhouding van ongeveer 1:5 produceren NAF bij stimulering met LPS (100 ng/ml). NAF verzamelt zich in het medium gedurende 24 uren en de productie neemt af tussen 24 uur en 48 uur. Er werd geen NAF in afwezigheid van stimulus gevormd. Figuur 1 vertoont het tijdsverloop en de concentratieafhankelijkheid van de effecten van LPS die reeds actief is tussen 0,1 ng/ml en 1 ng/ml.

- 30 De bron voor NAF werd onderzocht onder toepassing van verschillende mononucleaire celpreparaten. Figuur 2a vertoont de LPS-afhankelijke ontwikkeling van NAF door de totale mononucleaire celfractie en de monocyten die daaruit door aanhechting werden gekozen. Deze resultaten bevestigen dat de NAF-vorming afhankelijk is van LPS en duiden erop dat NAF door de monocyten wordt gevormd. De aanwezigheid van lymfocyten blijkt geen invloed op de hoeveelheid NAF-productie te hebben. Overeenkomstige resultaten
- 35 werden verkregen met monocyten en lymfocyten gezuiverd door elueren. Zoals uit figuur 2b blijkt, wordt NAF door de monocyten en niet door de lymfocyten gevormd.

Voorbeeld 2: bereiding van NAF door humane monocyten gestimuleerd door PHA of ConA

- De mononucleaire celfractie uit humaan bloed buffy coat, afgescheiden zoals beschreven in voorbeeld 1, werd gekweekt onder de omstandigheden vermeld in voorbeeld 1 en gestimuleerd met PHA (5 µg/ml) of
- 40 ConA (10 µg/ml). Het tijdsverloop van de NAF-productie is overeenkomstig dat welke werd waargenomen met mononucleaire cellen gestimuleerd door 100 ng/ml LPS. Een maximum werd na ongeveer 24 uren bereikt.

Voorbeeld 3: remming van de NAF-productie door cycloheximide

- Het feit dat NAF niet onmiddellijk na stimulering van de monocyten, doch gedurende een tijdsperiode van
- 45 uren, afhankelijk van de stimulusconcentratie, wordt vrijgemaakt, doet veronderstellen dat de novo-eiwitsynthese nodig is en dat de NAF-bereiding in werkelijkheid door de stimulus wordt geïnduceerd. De noodzaak van eiwitsynthese wordt gedemonstreerd door proeven waarbij de NAF-productie wordt geremd door toevoeging van cycloheximide. De resultaten van een representatieve proef zijn opgenomen in tabel 1.

TABEL 1
Remming van de NAF-productie door cycloheximide

Behandeling	gemiddelde productie van NAF na		
	4 uur	8 uur	24 uur
5 geen	0	0	0
LPS	726	2042	2633
10 LPS+CX	0	0	0
LPS+CX bij 4 uur	774	966	639
LPS+CX bij 8 uur	752	1884	1854

- 15 Cycloheximide (CX, 10 µg/ml) werd 4 of 8 uur na LPS (100 ng/ml) toegevoegd. De activiteit is weergegeven in fluorescentie-eenheden, die de elastaseafgifte tot uitdrukking brengen.

Deel II: NAF-zuivering

Voorbeeld 4: scheiding van NAF en IL-1 door fosfocellulosechromatografie

- 20 Mononucleaire cellen verkregen uit donorbloed buffy coats, zoals beschreven in voorbeeld 1, werden 48 uren gekweekt in MEM-PPL in aanwezigheid van 100 ng/ml LPS in geroerde cultuurkolven ($1,5 \times 10^6$ cellen/ml). De bovenstaande vloeistoffen van de cultures werden daarna verzameld, 20 min. bij 4°C gecentrifugeerd met 20.000 omw./min. teneinde deeltjesvormig materiaal te verwijderen en gebracht op een 10 ml fosfocellulosekolom (Whatman P11, 1,4 x 6 cm), die in evenwicht is gebracht met 20 mM kalium-
- 25 fosfaatbuffer, pH 7,2, die 20 mM natriumchloride en 5% glycerol bevatte. De kolom werd met 30 ml van de hiervoor beschreven buffer gewassen en daarna geëluëerd met 90 ml van een lineaire natriumchlorideconcentratiegradiënt (0,02 M tot 1,5 M) in dezelfde buffer. Fracties van 2 ml werden verzameld in 0,1%-ige polyethyleenglycol en op NAF en IL-1-werking onderzocht. Als maat voor het eiwit werd de absorptie bij 280 nm voortdurend gevolgd.
- 30 Figuur 3 laat verdelingsprofielen van eiwit (absorptie bij 280 nm) en twee biologische activiteiten, elastase-afgifte als een maat van de NAF-werking en thymocytenvermeerdering als maat van de IL-1-activiteit zien. Het grootste gedeelte van het eiwit evenals de IL-1-werking werden gewonnen uit doorgestroomde volume. Elutie met een lineaire natriumchloridegradiënt levert wat IL-1-activiteit bij lage ionconcentratie gevolgd door een piek van elastase afgevendende activiteit overeenkomende met NAF, dat begint te elueren bij
- 35 0,5 M en zijn maximum bij 0,8 M natriumchloride bereikt, op. De piek is symmetrisch en wordt door een smalle schouder voorafgegaan. Wat ultraviolet licht absorberend materiaal wordt door de zoutgradiënt geëluëerd; het profiel ervan valt echter niet samen met de bepaalde biologische activiteiten. Zoals in figuur 3 is aangegeven, kunnen IL-1 en NAF geheel worden vrijgemaakt. Er is geen elastase vrijmakende werking in associatie met IL-1 en geen thymocytenvermeerdering inducerende werking tezamen met NAF. De
- 40 opbrengst aan NAF na fractionering is bijna 100%, hetgeen doet veronderstellen dat de media geen remmers of activatoren bevatten.

Voorbeeld 5: zuivering van NAF door gelfiltratie

- Een monster van 200 ml NAF, gedeeltelijk gezuiverd door fosfocellulosechromatografie (voorbeeld 4) werd aangebracht op een HPLC TSK- G2000 SW kolom (7,5 x 600 mm) met een TSK-GSWP voorkolom
- 45 (7,5 x 75 mm). De kolom werkt met 100 mM NaHPO₄, pH 7,0, bevattende 100 mM natriumchloride, met een snelheid van 0,5 ml/min. Runderserumalbumine (mol.gewicht 66200), ovalbumine (mol.gewicht 42700), sojabonentrypsineremmer (mol.gewicht 21500), aprotinine (mol.gewicht 6500) en actinomycine D (mol.gewicht 1255) werden als ijkstandaards gebruikt. NAF elueert met een enigszins asymmetrische piek, even na aprotinine en goed voor actinomycine D. Het schijnbare molecuulgewicht van NAF is daarom ongeveer
- 50 6500. Geen NAF-activiteit wordt vóór of na de beschreven piek geëluëerd (figuur 4).

Voorbeeld 6: zuivering van NAF door hydroxylapatiet

- Een verzameling van fracties verkregen door fosfocellulosechromatografie (voorbeeld 4) met een totaal volume van 15 ml (overeenkomende met ongeveer 800 ml van de niet-gefractioneerde bovenstaande cultuurvloeistof) werd 1:10 verdund met een beladingsbuffer (10 mM natriumfosfaat, pH 6,9 in 0,1%-ige
- 55 polyethyleenglycol 6000) en gebracht in een hydroxylapatietkolom van 3 ml (Biogel HTP), in evenwicht gebracht in de beladingsbuffer. De kolom werd gewassen met drie porties van 3 ml van de beladingsbuffer en daarna met beladingsbuffer aangevuld met 1M natriumchloride geëluëerd. Volgens deze methode wordt

NAF uit de kolom verkregen. Daarna uitgevoerde elutie met een 0,5 M natriumfosfaatbuffer, pH 6,9, levert verder geen NAF-werking op (figuur 5).

Voorbeeld 7: zuivering van NAF door heparine-Sefarose

- 5 Een monster van 1 ml NAF, gedeeltelijk gezuiverd door fosfocellulosechromatografie (voorbeeld 4) werd gebracht op een kolom van 0,5 ml van heparine-Sefarose 4B, in evenwicht gebracht in 10 mM natriumfosfaat, pH 7,3, aangevuld met 0,1%-ige polyethyleenglycol 6000 en 50 mM natriumchloride. De kolom werd eerst met dezelfde buffer gewassen en daarna geëluëerd met 10 mM natriumfosfaat, pH 7,3, aangevuld met 1,5 M natriumchloride. Bij wassen van de kolom werd een geringe hoeveelheid NAF in de doorgestroomde vloeistof aangetoond, doch het grootste gedeelte van de activiteit gebonden in de kolom werd met een
- 10 buffer met een hogere ionconcentratie geëluëerd (figuur 6).

Voorbeeld 8: zuivering van NAF door een in de omgekeerde fase uitgevoerde vloeistofchromatografie onder hoge druk met een C4-kolom

- 15 Een monster van NAF gezuiverd door fosfocellulosechromatografie (voorbeeld 4) gevolgd door een hydroxylapatiet-zuivering (voorbeeld 6) werd gebracht in een omgekeerde fase C4-kolom met grote poriën (Biorad RP 304). De kolom werd geëluëerd met een gradiënt van 0–80% acetonitril in 0,1%-ige trifluorazijnzuur, met een increment van 0,66% per minuut. De stromingssnelheid is 0,5 ml/min. De fracties werden verzameld en onder verminderde druk gedroogd. De residuen werden weer gesuspenderd in 100 µl PBS bevattende 0,1% polyethyleenglycol 6000 en onderzocht op de NAF-werking. NAF elueert met een retentietijd van ongeveer 60 min., overeenkomende met ongeveer 40% acetonitril, als een enkele, scherpe
- 20 piek (figuur 7).

Voorbeeld 9: zuivering van NAF door in de omgekeerde fase en onder hoge druk uitgevoerde vloeistofchromatografie met een CN-propylkolom

- 25 Een monster van NAF, gezuiverd door in de omgekeerde fase uitgevoerde chromatografie, zoals beschreven in voorbeeld 8, gedroogd onder verminderde druk en weer gesuspenderd in 100 µl PBS bevattende 0,1%-ige polyethyleenglycol, werd verdund met 1 volume 0,1%-ige trifluorazijnzuur en gebracht op een Bakerbond cyaan (CN)-propylkolom met grote poriën (Baker Research Products, Phillipsburg, NJ, USA). De kolom werd geëluëerd met een gradiënt van 0 tot 50% n-propanol in 0,1%-ige trifluorazijnzuur, met een increment van 0,41% per minuut. De stromingssnelheid is 0,5 ml per minuut. De fracties werden verzameld en onder verminderde druk gedroogd. De residu's werden weer gesuspenderd in 100 µl met
- 30 fosfaat gebufferde zoutoplossing die 0,1%-ige polyethyleenglycol 6000 bevatte en onderzocht op de NAF-activiteit. NAF elueert met twee scherpe pieken, een hoofdpijk met een retentietijd van 53 min., overeenkomende met 22% n.-propanol en een kleinere piek voor minder dan 30% van de totale activiteit, met een retentietijd van 66 min., overeenkomende met 27,5%-ige n-propanol (figuur 8).

Voorbeeld 10: chromatofocussing van NAF

- 35 Een monster van 4 ml NAF die gedeeltelijk gezuiverd is door fosfocellulosechromatografie (voorbeeld 4) werd gedialyseerd tegen startbuffer die 25 mM ethanolamine-HCl, pH 9,4 en 0,1% polyethyleenglycol 6000 bevatte en gebracht op een PBE 94 kolom (0,7 en 19 cm, Pharmacia), die met dezelfde buffer in evenwicht is gebracht. Daarna werd de kolom geëluëerd met 200 ml polybuffer 96-HCl (1:10 verdund met water), pH 7,0, bevattende 0,1%-ige polyethyleenglycol 6000. De fracties van 10 min. werden verzameld bij een
- 40 stromingssnelheid van 10–14 ml per uur en onderzocht op de NAF-activiteit. Het grootste gedeelte van de activiteit elueert in het gebied van pH 8,5 tot pH 8,8 (figuur 9).

Deel III: de fysisch chemische en biologische karakterisering van NAF

Voorbeeld 11: de fysisch-chemische eigenschappen van NAF

- 45 Bij deze proeven werd gebruik gemaakt van gedeeltelijk gezuiverd NAF verkregen door fosfocellulosechromatografie (voorbeeld 4). Na fosfocellulosechromatografie, werden fracties met de hoogste NAF-activiteit gedurende een nacht bij 4°C gedialyseerd tegen PBS, onder toepassing van een membraan met een molecuulgewichtsgrens van 1000 dalton. Daarna werd het verkregen preparaat onderworpen aan de volgende behandelingen: a) incubatie bij 37°C met en zonder trypsine, chymotrypsine of proteïnase K (100
- 50 µg/ml), gevolgd door toevoeging van een overmaat BSA (2 mg per ml) teneinde de NAF-proteolyse te beëindigen, b) verhitten tot 56°C, 80°C of 95°C (vergeleken met 22°C voor de controle), c) blootstellen aan een pH van 2 of 10 (bij 22°C) gevolgd door instelling van de pH op 7,4 (vergeleken met pH 7,4 voor de controle), en d) blootstellen van 2 M lithiumchloride, 6 M guanidiniumchloride, 1%-ige 2-mercaptoethanol of 0,5%-ige natriumdodecylsulfate (SDS) gedurende 3 uren bij 22°C, gevolgd door 24 uren dialyseren bij 4°C
- 55 tegen PBS. Wanneer toevoegingen werden gedaan, werden monsters zonder NAF op dezelfde wijze gehanteerd en onderzocht op mogelijke beïnvloeding van het NAF-onderzoek.

Zoals uit tabel 2 blijkt, is NAF opmerkelijk bestand tegen inactivering. De activiteit ervan gaat verloren bij

incuberen met verschillende proteasen, hetgeen erop wijst dat NAF een polypeptide is. Daarentegen wordt NAF niet gauw geïnactiveerd door warmte, zuren en alkalische pH-omstandigheden of door blootstellen aan SDS. Enige inactivering treedt op met 2-mercaptoethanol, lithium- en guanidiniumchloride.

5

TABEL 2
Fysisch-chemische eigenschappen van NAF

Behandeling	Omstandigheden	Relatieve activiteit
10 Temperatuur	22°, 3 uur	100
	56°, 1 uur	82
	80°, 15 min	80
	95°, 5 min	66
pH 2,	22°, 3 uur	76
15 pH 10,0	22°, 3 uur	90
SDS 0,5%	22°, 3 uur	100
2-mercaptoethanol, 1,0%	22°, 3 uur	30
lithiumchloride 2 M	22°, 3 uur	52
guanidiniumchloride 6 M	22°, 3 uur	68
20 trypsine 100 µg/ml	37°, 4 uur	100
	37°, 12 uur	8
α-chymotrypsine 100 µg/ml	37°, 4 uur	80
	37°, 12 uur	1
proteïnase K 100 µg/ml	37°, 12 uur	0

25

Voorbeeld 12: door NAF-geïnduceerde exocytose (inductie van de vrijmaking van granula door NAF in humane neutrofielen)

Neutrofielen (5×10^6 /ml), gesuspenderd in PBS/BSA, werden 5 min. bij 37°C voorgeïncubeerd met of
 30 zonder cytochalasine B (5 µg/ml). De vrijmaking van granula werd geïnitieerd door toevoeging van de stimulus, bijvoorbeeld NAF of een standaardstimulus. De reactie werd 15 min. later beëindigd door snel afkoelen in ijs, gevolgd door centrifugering teneinde de cellen te sedimenteren. Vitamine B12-bindend eiwit, β-glucuronidase en lactaatdehydrogenase werden in de cel-vrije media en celpersstukjes bepaald en de vrijmaking van deze bestanddelen werd berekend in percenten van de totale cellulaire hoeveelheid (B.
 35 Dewalt en M. Baggiolini, *Methods Enzymol.* 132 [1986] 267).

De effecten van NAF op de vrijmaking van vitamine B12-bindend eiwit en β-glucuronidase, die de bestanddelen van respectievelijk de specifieke en de azurofiele granula zijn, zijn samengevat in tabel 3.

TABEL 3

40 Stimulus afhankelijke exocytose van de granula-inhoud door humane neutrofielen

Stimulus	Percentage afgifte van CB		
	Vit. B12-bindend eiwit	β-glucuronidase	lactaat dehydrogenase
45 geen	- 6,0 ± 0,4	2,1 ± 0,4	6,2 ± 2,5
NAF 50 µl	- 12,9 ± 1,6	2,7 ± 1,3	5,8 ± 0,7
NAF 100 µl	- 13,9 ± 2,1	3,0 ± 1,3	6,8 ± 2,2
fMLP 0,1 µM	- 14,0 ± 0,9	2,3 ± 0,8	5,7 ± 1,1
50 geen	+ 10,0 ± 1,1	2,4 ± 0,2	7,0 ± 3,2
NAF 50 µg	+ 25,6 ± 3,4	7,9 ± 2,0	6,7 ± 1,6
NAF 100 µg	+ 26,8 ± 4,9	8,5 ± 1,7	7,3 ± 2,1
fMLP 0,1 µM	+ 35,6 ± 5,5	12,1 ± 4,4	5,3 ± 1,6
55 gemiddelde waarden ± SD			

In normale neutrofielen induceert NAF alleen de exocytose van specifieke granula. Indien de cellen echter waren voorbehandeld met cytochalasine B, wordt een grote afgifte van beide typen granula verkregen. Onder de laatste omstandigheden loopt de vrijmaking van β -glucuronidase parallel aan die van elastase, de merker die wordt toegepast voor het onderzoeken van de NAF-activiteit (voorbeeld 1). Kwantitatief zijn de

- 5 exocytose-inducerende eigenschappen van NAF gelijk aan die van het chemotactische peptide fMLP. Geen enkele stimulus induceert de vrijmaking van het cytosolische enzym lactaatdehydrogenase, hetgeen erop wijst dat de schade aan de cel verwaarloosbaar is.

Voorbeeld 13: door NAF geïnduceerde respiratoire uitbarsting (inductie van de vorming van superoxide door NAF in humane neutrofielen)

- 10 De superoxidevorming werd bij 37°C gemeten als de voor SOD sensitieve reductie van ferricytochroom c (M. Markert en med., *Methods Enzymol.* 132 [1984] 267). Het onderzoeksmengsel (800 μ l) bestond uit $0,75 \times 10^6$ cellen/ml PBS-BSA bevattende 85 μ M cytochroom c. Absorptieveranderingen werden geregistreerd met een Hewlett-Packard 8451A diode array spectrophotometer, uitgerust met een thermostatisch geregelde cuvetverwisselaar met 7 plaatsen. Tabel 4 ondersteunt de capaciteit van NAF ter opwekking van de
- 15 respiratoire uitbarsting in humane neutrofielen.

TABEL 4
NAF-afhankelijk superoxideproductie door humane neutrofielen

20	Cytochroom c reductie+		
	NAF (μl)	Maximum snelheid (nmol/min)	Totaal in 3 min (nmol)
	5	0,81	0,89
25	10	1,45 ± 0,63	1,45 ± 0,50
	20	2,32 ± 0,56	2,16 ± 0,39
	30	2,51 ± 0,50	2,30 ± 0,55
	50	3,51 ± 0,69	3,10 ± 0,55
	100	3,69	3,39
30			
	+ alle waarden zijn uitgedrukt per 10 ⁶ cellen		
	gemiddelde waarden ± SD		

- 35 Een geleidelijke toename van de maximum snelheid en de totale hoeveelheid superoxide-ontwikkeling treedt op bij toenemende hoeveelheden NAF. Zoals met vergelijkingsproeven kan worden aangetoond, komen de hoeveelheden NAF die maximale gehalten superoxide produceren overeen met die welke een maximale exocytose induceren.

- 40 Voorbeeld 14: waterstofperoxidevorming (vergelijking van NAF me fMLP en C5a als stimulus van de respiratoire uitbarsting in humane neutrofielen)

De eigenschappen van NAF, fMLP en C5a als stimula van de respiratoire uitbarsting werden vergeleken door beoordeling van de productie van superoxide of waterstofperoxide door de gestimuleerde cellen. De superoxidevorming werd bepaald op de wijze als beschreven in voorbeeld 13. De waterstofperoxidevorming werd bepaald door chemiluminescentie (M.P. Wymann en med., *Anal. Biochem.* 165 [1987] 371-378). Het onderzoeksmengsel bestond uit PBS-BSA bevattende 0,1 M natriumazide, 0,01 mM luminol, 9 E/ml mierikswortelperoxidase en 10^6 neutrofielen en werd 10 min. bij 37°C voorgeïncubeerd en de reactie werd gestart door via een micro-injectiespuit de stimulus toe te voegen.

- 50 Figuur 10 toont de superoxidevorming geïnduceerd door toenemende hoeveelheden NAF aan. Tengevolge van de snelle start, grote snelheid en vroegtijdig afvlakken lijkt de respons op NAF veel op die opgewekt door fMLP of C5a. De respons op NAF wordt duidelijk beïnvloed door de voorbehandeling van de cellen met PAF (figuur 10), die eveneens de superoxidevorming geïnduceerd door fMLP of C5a versterkt. Een directe vergelijking van de responsen op NAF, fMLP en C5a is weergegeven in figuur 9. De chemiluminescentieregistraties van de snelheid van de vorming van H_2O_2 tegen de tijd onderstreept de overeenkomst van de responsen. Deze evenals andere bepalingen tonen bovendien aan dat de tijd tussen de toevoeging van de stimulus en het begin van de H_2O_2 -vorming geïnduceerd door NAF, fMLP en C5a identiek zijn en ongeveer 2 seconden bedragen, zoals reeds eerder werd vermeld voor fMLP, C5a, PAF en leukotrieën B_4 .

(M.P. Wymann en med., *J. Biol. Chem.* 262 [1987] 12048). De kwalitatieve en kwantitatieve overeenkomst van de neutrofielrespons op NAF, fMLP en C5a geeft aan dat NAF neutrofielen activeert door te binden aan een oppervlakreceptor en dus zich als een receptoragonist gedraagt.

Voorbeeld 15: onderscheid tussen Naf en C5a

- 5 Zoals in voorbeeld 14 werd vermeld, is het profiel van de NAF-werking ten opzichte van humane neutrofielen gelijk aan die van C5a. De overeenkomsten tussen deze twee peptiden strekken zich uit over verschillende fysisch-chemische eigenschappen, zoals de bestandheid tegen warmte en zuur. Aangezien C5a en NAF dezelfde effecten op neutrofielen hebben, moesten nog meer proeven worden uitgevoerd teneinde een volledig onderscheid tussen deze twee te kunnen maken. Monsters van NAF en C5a werden
10 blootgesteld aan vers humaan serum. Het is bekend dat deze behandeling C5a omzet in zijn relatief inactieve des-arginylderivaat door splitsing met een carboxypeptidase. Zoals uit figuur 11 blijkt, vernietigt de serumbehandeling volledig de werking van C5a, doch beïnvloedt niet die van NAF. Dit toont aan dat deze twee middelen wat structuur betreft verschillen.

Voorbeeld 16: bewijs dat NAF zijn eigen specifieke receptor op neutrofielen heeft

- 15 Indien neutrofielen twee maal met dezelfde hoeveelheid van dezelfde receptoragonist (bijv. fMLP) worden gestimuleerd en de superoxideproductie wordt geregistreerd als een maat van de neutrofielenrespons, is de tweede stimulering praktisch inactief. Indien aan de andere kant agonisten die op verschillende receptoren werken achter elkaar worden toegepast (bijv. fMLP gevolgd door C5a), geven deze stimulaties een normale respons. Onderzoekingen van dit type werden derhalve toegepast teneinde erachter te komen of NAF via
20 haar eigen receptor of via een receptor die eveneens door andere agonisten wordt gebruikt werkt.

Figuur 12a laat zien dat neutrofielen normaliter een respons geven op fMLP na een eerste provocatie met NA of C5a. In figuur 12b zijn de resultaten van herhaalde stimulering met NAF en C5a weergegeven. De cellen werden eerst gestimuleerd met NAF en C5a in concentraties die ongeveer dezelfde hoeveelheid superoxidevorming opwekken en daarna voor de tweede keer met hetzelfde, of een andere stimulus.

- 25 Indien dezelfde agonist twee maal wordt toegepast geven de cellen geen respons op de tweede stimulering. Daarentegen werd een normale respons verkregen op C5a in cellen die eerst met NAF waren geprovoceerd en op NAF in cellen die eerst met C5a waren geprovoceerd. Aangezien de neutrofielen volledige desensibilisatie voor beide stimuli vertonen, doch geen kruis-desensibilisatie, lijken NAF en C5a hun stimulerende effecten via niet-verwante receptoren uit te oefenen, hetgeen erop wijst dat ze een verschillende structuur
30 hebben. Combinaties van NAF met PAF, fMLP en leukotrieën B₄ geven evenmin kruis-desensibilisatie. NAF oefent derhalve haar werking uit via een selectieve, tot nu toe onbekende, receptor.

Voorbeeld 17: neutrofiel accumulatie en plasmalekkage geïnduceerd door NAF bij konijnen

- Inflammatoire responsen werden onderzocht op de huid van wakkere albinokonijnen uit Nieuw Zeeland met een gewicht van 2,0–2,5 kg. Erythrocyten in het bloed van donorkonijnen werden gesedimenteerd met
35 hydroxyethylcellulose (Polysciences, Warrington, Pa) en neutrofielen in het verkregen plasma dat veel leukocyten bevat werden gezuiverd (> 94% neutrofielen) met dichtheidsgradiënt centrifugatie op Percoll (Pharmacia, Uppsala, Zweden). De cellen werden weer gesuspenderd in Ca²⁺ en Mg²⁺ – vrije Tyrode's oplossing, die 10% plaatjesarme plasma bevatte, tot een concentratie van 10⁶ leukocyten/ml en werden 15 min. bij kamertemperatuur gelabeld met 40 µCi ¹¹¹indium-oxide (Amersham) per 10⁶ cellen. De gelabelde
40 cellen werden gewassen door centrifugeren door 10%-ige plaatjesarme plasma en ongeveer 10⁶ cellen per recipiënt werden gemengd met 10 µCi met ¹²⁵jodium-gelabeld humaan serumalbumine (Amersham) en intraveneus geïnjecteerd in de laterale oorader van konijnen met ontstekingslesies die werden onderzocht. Daarna werden intradermale injecties van middelen tegen ontstekingen bereid en de dieren werden 2 uur
45 later gedood voor de onderzoekingen met actinomycine D en polymyxine B en 4 uur later bij dosisresponsproeven. Halverwege de periode dat radioactief gelabelde cellen in circulatie zijn, werd een bloedmonster genomen en werden de specifieke activiteiten van neutrofielen en plasma in het bloed bepaald. De radioactiviteit in ontstekingslesies aan het einde van elke proef werd bepaald in een gammacounter met vele kanalen, de activiteit in controlehuidplaatsen werd afgetrokken en het absolute aantal neutrofielen en volume plasma die zich hadden opgehoopt in de gebieden met ontstekingen werden uit de specifieke
50 activiteiten berekend. De neutrofielgetallen in gebieden met ontstekingen waren tussen de dieren gestandaardiseerd door de resultaten als celgetal per 10⁶ neutrofielen rondstromende per ml perifeer bloed, volgens de methode van Cybulsky en med., *Am. J. Pathol.* 124 Z [1986] 367 tot uitdrukking te brengen.

Recombinant NAF verkregen volgens voorbeeld 19 werd opgelost in een hoeveelheid van 400 µg/ml in minimaal essentieel medium (50 mM) plus 0,45 M NaCl (pH 6,5). Endotoxine (E.coli serotype 055:B5,

- 55 Sigma, St. Louis, Mo.) werd opgelost in een pyrogeenvrije normale natriumchloride-oplossing. fMLP werd opgelost in dimethylsulfoxide tot 10⁻² M en verdund tot werkconcentraties in PFS. Polymyxine B en actinomycine D werden opgelost in 1 ml ethanol en 20-voudig verdund door mengen met NAF, endotoxine

of fMLP in PFS. Bij onderzoeken betreffende de remming van ontstekingsresponsen werden 40 µg polymyxine B en 10^{-7} mol actinomycine D per huidgedeelte geïnjecteerd met 10^{-6} mol endotoxine. Bij alle proeven werden 0,2 ml van de middelen tegen ontstekingen intradermaal per gebied geïnjecteerd met behulp van naalden van 26 gauge, met vijf herhalingen van elke behandeling bij elk dier.

- 5 NAF induceert een dosis-afhankelijke toename van de plasmalekkage (figuur 16) en accumulatie van neutrofielen (figuur 17) boven het onderzochte dosistraject (10^{-11} tot 10^{-9} mol per plaats). Daarmede vergeleken veroorzaakt endotoxine plasmalekkage (figuur 16) en accumulatie van neutrofielen (figuur 17) met een vergelijkbare intensiteit bij 10^{-13} mol per gebied. In vijf konijnen is NAF 3 tot 10 malen krachtiger dan fMLP als stimulus voor plasmalekkage en ophoping van neutrofielen. De accumulatie van neutrofielen
- 10 geïnduceerd door verdunning van de buffer die werd toegepast voor het oplossen van NAF tot de concentratie die aanwezig is in oplossingen die 10^{-9} per gebied afgeven, verschilt niet van responsen in gebieden die alleen PFS ontvingen. De mogelijkheid dat de activiteit van het NAF-preparaat toegeschreven kan worden aan een endotoxineverontreiniging werd onderzocht door injectie van polymyxine B (40 µg/gebied) tezamen met NAF, fMLP of endotoxine. Polymyxine B veroorzaakt 84% remming van de respons op
- 15 endotoxine (10^{-13} mol), doch is zonder effect op de accumulatie van neutrofielen geïnduceerd door NAF (10^{-9} mol) of fMLP (10^{-9} mol) (figuur 8).

Injectie van een niet-reversibele remmer van de RNA transcriptie, actinomycine D (10^{-7} mol/plaats) tezamen met 10^{-13} mol endotoxine, veroorzaakt 90% remming van de ophoping van neutrofielen (figuur 19). Daarentegen heeft actinomycine D geen effect op de accumulatie van neutrofielen geïnduceerd door NAF

- 20 (10^{-9} mol) of fMLP (10^{-9} mol) (figuur 19).

Uit deze resultaten blijkt dat NAF actief is in vivo en een dosis afhankelijke accumulatie van neutrofielen en lekkage van plasma in gebieden met ontstekingen veroorzaakt. De molpotentie van NAF is vergelijkbaar met het klassieke chemotactine C5a en LTB en 3–5 malen hoger dan fMLP. De accumulatie van neutrofielen geïnduceerd door NAF wordt niet geremd door de gelijktijdige intradermale injectie van een remmer van

25 de eiwitsynthese (actinomycine D). NAF werkt dus direct, zoals een chemotactische agonist, zoals fMLP en anders dan endotoxine.

Voorbeeld 18: door NAF geïnduceerde exocytose (effect op de neutrofielen van konijnen)

Neutrofielen van konijnen werden geïsoleerd uit perifeer bloed (verkregen uit de oorader of slagader) door dextran sedimentatie gevolgd door Hypaque-Ficoll dichtheidsgradiënt centrifugatie. Gezuiverd natuurlijk

- 30 NAF werd toegepast.

Exocytosecondities: $0,6 \times 10^6$ cellen (in een totaal volume van 0,15 ml) van tevoren gedurende 5 min. bij 37°C behandeld met cytochalasine B, werden 15 min. gestimuleerd met NAF (0,1–100 nM) of fMLP (100 nM). N-acetyl-β-glucosaminidase, een azurofiele granulamarker, werd bepaald in het medium dat geen cellen bevatte. De resultaten zijn opgenomen in tabel 5.

35

TABEL 5
Door NAF-geïnduceerde exocytose

Stimulus	Concentraties (nM)	N-acetyl-β-glucosaminidase (pmol/min)
40 geen		41
NAF	0,1	53
	1,0	99
	10,0	139
45	100,0	157
fMLP	100,0	181

Deel IV: recombinant NAF

- 50 Voorbeeld 19: synthese en expressie van NAF in E.coli

a) Oligonucleotide synthese en zuivering

De oligonucleotiden ON-1 – ON-6 (zie figuur 13) werden gesynthetiseerd in een automatische DNA-synthesizer onder toepassing van standaardchemie met 3'-β-cyaaanethyl-N,N-diisopropylfosforamidiet-nucleosiden als monomeren, op een vaste drager, zoals Fractosil silicagel of bepaald poreus glas (CPG)

- 55 (S.L. Beaucage en M.H. Caruthers, *Tetr. Letters* 22 [1981] 1859; N.D. Sinha en med., *Nucleic Acids Res.* 12 [1984] 4539).

De gedetrityleerde materialen werden van de drager afgescheiden door 2 uren behandelen met 25%-ige

ammonia bij kamertemperatuur, alle beschermende groepen werden afgesplitst door de ammoniakale oplossing 20 uren te verhitten op 55°C en de producten werden gelyofiliseerd. Scheiding van de uitgangsmaterialen geschiedde door polyacrylamide-gelelektroforese (PAGE) met 12% acrylamide, 0,3% bisacrylamide, 7 M ureum, 0,089 M tris-boraat, 0,089 M boorzuur, 0,002 M EDTA bij 20 V/cm. Oligonucleotiden met volledige lengte werden gelokaliseerd door toepassing van ultraviolet licht op fluorescentie silicagelplaten, waarna de gelgedeelten werden uitgesneden en in een elutiekamer werden geëlektroëluëerd. De geconcentreerde oplossingen werden ontzout met een Biogel P2-kolom (30 x 0,9 cm) door elutie met 10%-ige ethanol en gelyofiliseerd. Monsters van ON-1 tot ON-6 werden radioactief gelabeld met ^{32}P - γ -ATP en polynucleotidekinase. Analyses met PAGE en autoradiografie bevestigden dat ze homogeen waren. De juiste volgorden werden bevestigd door Maxam-Gilbert sequencing van de oligonucleotiden geïmmobiliseerd op een gemodificeerd filtreerpapier (A. Rosenthal en med., *Nucleic Acids Res.* 13 [1985] 1173–1184).

b) Annealing en ligatie

Voor annealing en ligatie werden porties van 250 pmol van de oligonucleotiden 40 min. bij 37°C gefosforyleerd met 4 μCi ^{32}P -ATP (5000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) en 9 eenheden polynucleotidekinase in 20 μl kinasebuffer (T. Maniatis en med., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* [1982], Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.), gevolgd door 20 min. behandelen met 5 mmol niet-gelabelde ATP. De reactie werd beëindigd met 1 μl 0,5 M EDTA bij 70°C. De gefosforyleerde oligonucleotiden werden gezuiverd door adsorptie aan NENSORB 20 patronen (Du Pont) en elutie met 20%-ige ethanol en de opbrengst bedroeg ongeveer 90%. Gelijktijdig annealing en ligatie van gelijke hoeveelheden 30 tot 100 pmol 5'-gefosforyleerde ON-2 tot ON-5 en ongefosforyleerd ON-1 en ON-6 werd uitgevoerd in 25 μl buffer (125 mM Tris-HCl, pH 7,6) bevattende 25 mM MgCl_2 . Het mengsel werd 4 min. verhit op 90°C, in 3 uren afgekoeld tot 14°C en nog eens 14 uren geïncubeerd bij 14°C. Het volume werd ingesteld op 60 μl met 50 nM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, 0,1 mg/ml runderserumalbumine bevattende 1600 tot 2000 eenheden T4-ligase. De ligatie geschiedde gedurende 14 uren bij 14°C en werd beëindigd door toevoeging van 1 μl 0,5 M EDTA en verhit op 70°C. Na extraheren met fenol werd de waterige oplossing toegevoegd aan 0,3 M natriumacetaat, 0,01 M magnesiumacetaat en het DNA werd neergeslagen met ethanol en de producten werden gezuiverd met PAGE (8% acrylamide, 7 M ureum) met een maximale belading van 10 pmol DNA per 1,5 cm van een 0,5 mm dikke gel. Het product met de juiste lengte werd geïdentificeerd door autoradiografie, het gelgedeelte werd uitgesneden en het DNA werd geëlektroëluëerd gedurende 6 uren bij 200 V in Biotrap BT100 en met ethanol neergeslagen, waardoor een eindopbrengst van 5–8 pmol van het gezuiverde, dubbelstrengs DNA per 100 pmol oligonucleotide werd verkregen.

c) Klonering van het synthetische gen

Een monster van 110 mg van het geïsoleerde synthetische NAF gen werd geligeerd met 260 ng van met behulp van een agarosegel gezuiverde SphI/BamHI-cut pBS M13 plasmide DNA (Stratagene). Eén tiende van dit ligatiemengsel werd toegepast voor de transformering van 200 μl E.coli-stam 5K cellen, geschikt ingesteld volgens de methode van D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* 166 [1983] 557–580 en er werden ongeveer 320 tegen ampicilline resistent zijnde koloniën per ng DNA uitgangsmateriaal verkregen. Men selecteerde 6 klonen en liet die een nacht groeien in L-cultuurvloestofampicilline. Plasmide DNA werd bereid (H.C. Birnboim en J. Doly, *Nucleic Acids Res.* 7 [1979] 1513–1523), dat men liet lopen op een 1%-ige agarosegel. Zuiver supergewonden DNA werd geïsoleerd door elektroforese van de banden op 3 MM papier (Whatman) en centrifugeren in Eppendorfbuizen. Na extractie met fenol en neerslaan met ethanol werd het DNA sequenced volgens de alkali-gedenatureerde plasmideketen terminatiemethode onder toepassing van T3 en T7 primers (Stratagene) en het sequenaseenzym (E.J. Chen en med., *DNA* 4 [1985] 165–170).

Van de zes klonen bevatten drie, dat wil zeggen de klonen 1, 2 en 6, de juiste NAF-volgorde. De andere drie klonen bevatten fouten: kloon 3 had een extra G rest opgenomen na de ATG begincodon, terwijl de volledige coderende volgorde niet in fase is. In kloon 5 is C vervangen door T op de 34-plaats waarbij een stopcodon na aminozuur no. 6 is gevormd. Tenslotte mist kloon 4 een G op de 13-plaats. Deze plaats bevindt zich niet in de coderende volgorde, doch in het gebied tussen het startcodon en de ribosoom bindingsplaats.

Het plasmide dat de juiste volgorde (kloon 6) bevatte werd met restrictieenzymen ClaI en BamHI geknipt en het 237 bp fragment werd uit een agarose gel geëluëerd door elutie op 3 MM papier, zoals hiervoor is beschreven. Dit fragment werd daarna door ligatie omgezet in een lineair DNA-fragment dat, van links naar rechts, bevatte:

- een BamHI restrictieendonucleaseplaats;
- een synthetische transcriptie terminator (CCCGGGCGATGAAT CGCCCGGG of CCCGGGCGATT-CATCGCCCGGG);
- een deel van plasmide pAT153, van de Sall plaats bij nucleotide no. 651 via het begin van de replicatie

en het gen resistent tegen ampicilline tot de EcoRI plaats bij nucleotide no. 0;

– de E.coli tryptofaanpromotor;

een ClaI-plaats die ongeveer 5 baseparen stroomafwaarts van de ribosoombindingsplaats in de promotor aanwezig is.

- 5 Het verkregen, tegen ampicilline resistente, expressieplasmide, aangeduid met p(NAF)-6T3 (figuur 14), werd getransformeerd in E.coli cellen van stam HB101.

De transcriptieterminator is niet essentieel voor de expressie van NAF in E.coli. Ze maakt een doeltreffende terminatie van het NAF-mRNA geproduceerd door het E.coli polymerase mogelijk en verhoogt dus de opbrengst bij de expressie. NAF kan eveneens in dezelfde vector tot expressie worden gebracht zonder de

- 10 transcriptieterminator, doch de opbrengst is dan echter 30–50% lager.

Dit synthetische gen coderend voor NAF evenals andere genen coderende voor dezelfde basispeptidevolgorde, doch met een andere nucleotidevolgorde of coderende voor peptiden met variërende lengten kan eveneens tot expressie worden gebracht in E.coli onder toepassing van andere promotors, bijvoorbeeld de

- 15 lambda PL of de E.coli Lac of Tac promotors. De genen kunnen eveneens worden ingebracht onder toepassing van andere vectoren en in andere organismen, bijvoorbeeld in gisten, schimmels, dierlijke cellen, bacteriële cellijnen, planten en in transgene hoge organismen, tot expressie worden gebracht.

d) Expressie

De expressie van p(NAF)-6T3 in E.coli HB 101 werd op de volgende wijze uitgevoerd:

Voorcultuur 1: men voegde 50 µl van een glycerolcultuur van de cellijn die op -20°C was gehouden toe aan

- 20 10 ml steriel LB medium (10 g/l trypton, 5 g/l gistextract, 10 g/l NaCl) bevattende 100 µg/ml ampicilline. De cultuur werd 8 uren in een incubator bij 37°C en 200 omw./min. geschud.

Voorcultuur 2: men entte 8 ml voorcultuur 1 medium in 1 l M9 medium (J.H. Miller Experiments in Molecular Genetics [1972] Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., blz. 431–433), bevattende 0,2% glucose, 0,5% casaminozuren (Difco), 25 mg/l tryptofaan en 100 µg/ml ampicilline. De cultuur werd 15–16 uren in een

- 25 incubator bij 37°C en 200 omw./min. geschud.

Fermentatie: de hoofdfermentatie werd uitgevoerd in een fermentator van 70 l en een werkvolume van 35 l. Hetzelfde medium werd toegepast als bij voorcultuur 2, behalve dat slechts 5 mg/l tryptofaan werd toegevoegd. Voorcultuur 2 werd in dit medium geënt en de fermentatie werd bij 37°C voortgezet tot een optische dichtheid van 2,8 bij 600 nm (OD_{600}). Indien OD_{600} 2,8 had bereikt, werd indoolacrylzuur in ethanol

- 30 toegevoegd tot een eindconcentratie van 20 mg per liter. Na 4 uren was de OD_{600} opgelopen tot 13,5; centrifugeren leverde een persstukje van 516 g op.

e) Zuivering van recombinant NAF

E.coli cellen, bevattende recombinant NAF, werden bij -20°C opgeslagen. Ladingen van 100 g werden

- 35 gewassen met 100 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, bevattende 50 mM NaCl, weer gesuspenseerd in 250 ml van dezelfde buffer en bij 2500 psi kapotgemaakt in een Franse pers (Aminco). Na 40 min. centrifugeren bij 47000 g werd het persstukje weer gesuspenseerd in dezelfde buffer, weer gecentrifugeerd en opgeslagen bij 20°C. Porties van 10 g werden gesuspenseerd in 100 ml 50 mM MES-NaOH, pH 6,5, 6M guanidine-HCl, 1 uur geroerd en gedialyseerd tegen 0,5%-ige azijnzuur. Het dialysaat werd geklaard door centrifugeren en in evenredige porties gebracht op een Mono-S kolom (HR 5/5, Pharmacia). De kolom werd gewassen met
- 40 50 mM MES-NaOH, pH 6,5, die 0,2 M natriumchloride bevatte en geëluëerd met een snelheid van 0,5 ml per min. met een lineaire gradiënt in dezelfde buffer (0,2 tot 0,5 M NaCl). De fracties met het hoogste NAF-gehalte werden samengevoegd en gechromatografeerd over een in omgekeerde fase werkende HPLC-kolom (0,46 x 125 mm Vydac C4TP) met grote poriën in 0,1%-ige trifluorazijnzuur en een 20–60%-ige acetonitrilgradiënt bij een stromingssnelheid van 1 ml/min.

45

Deel V: identiteit van natuurlijk en recombinant NAF

Voorbeeld 20: fysisch-chemische identiteit

NAF gewonnen door HPLC (zie voorbeeld 19) wordt op basis van twee criteria zuiver geacht: zilver-geklepte

SDS-polyacrylamidegelen vertonen een enkele band die samenvalt met natuurlijk NAF 1 µg recombinant

- 50 NAF uit de HPLC piekfractie in kanaal 2 tegen 1 µg natuurlijk NAF in kanaal 3, met als standards voor het molecuulgewicht cytochroom c [12,5 kd] en aprotinine [6,5 kd] in kanaal 1) en Edman ontleding van het met mierenzuur gesplitste peptide geeft amino- en carboxyterminale volgorden die overeenkomen met die van het uit 72 aminozuren bestaande natuurlijke NAF. De aminozuuranalyse is in overeenstemming met de van de volgorde te verwachten samenstelling. Er werd geen methionine aangetroffen, hetgeen erop wijst dat
- 55 deze rest waarschijnlijk door de bacteriën is verwijderd.

Voorbeeld 21: biochemische identiteit

Natuurlijk en recombinant NAF werden parallel onderzocht op humane neutrofielen. Ze wekken praktisch

identieke veranderingen in cytosolisch vrij Ca^{2+} op en geven een maximale verhoging bij een concentratie van slechts 3 nM (figuur 15). Een vrijwel identieke, concentratie-afhankelijke, respiratoire uitbarstingsrespons wordt met beide preparaten verkregen in het traject van 1–30 nM, zoals blijkt met chemiluminescentie. De gelijkwaardigheid van natuurlijk en recombinant NAF komt eveneens tot uiting met chemotaxis- en exocytosemetingen. Chemotactische migratie werd waargenomen tussen 0,1 en 10 nM met een maximaal effect bij 1 nM (tabel 6). Met elk peptide werd een significante afgifte van het vitamine B_{12} -bindende eiwit uit de specifieke granula bij 0,3 nM en van β -glucuronidase uit de azurofielgranula bij 1 nM waargenomen. Dit effect neemt met de stimulusconcentratie toe, zoals blijkt uit tabel 7.

10

TABEL 6
Door NAF geïnduceerde neutrofielchemotaxis

	NAF (nM)	nat	rec
15	0,1	98 ± 6	88 ± 6
	1,0	123 ± 6	124 ± 3
	10,0	127 ± 3	126 ± 4

20 De waarden geven gemiddelden ± SD van de vooraangaande migratie van het front in nm (n=3) aan. De willekeurige migratie in afwezigheid van een chemotactische stimulus is 61 ± 5 µm.
nat = natuurlijk NAF rec = recombinant NAF

25

TABEL 7
Door NAF-geïnduceerde exocytose

	NAF (nM)	Vit. B_{12} -bindend eiwit		β -glucuronidase	
		nat	rec	nat	rec
30	0,3	7,8 ± 3,6	5,4 ± 2,0	1,1 ± 0,8	0,8 ± 0,6
	3,0	21,9 ± 4,2	20,2 ± 3,7	8,2 ± 1,9	7,1 ± 1,7
	30,0	28,4 ± 3,7	28,1 ± 3,8	14,2 ± 2,1	12,9 ± 2,9

35 Het percentage afgifte uit met cytochalasine B voorbehandelde neutrofielen (4×10^6 cellen/ml) gedurende 10 min. gestimuleerd met natuurlijk (nat) of recombinant (rec) NAF. De vrijmaking uit de overeenkomstige niet gestimuleerde controles is afgetrokken. Gemiddelden ± SD (n=3).

40

Conclusies

1. Neutrofiel-activerende factor (NAF) in geïsoleerde vorm, afgeleid van humane monocytten, gekenmerkt door de volgende volledige aminozuurvolgorde:
- 45 X-Leu-Arg-Cys-Gln-Cys-Ile-Lys-Thr-Tyr-Ser-Lys-Pro-Phe-His-Pro-Lys-Phe-Ile-Lys-Glu-Leu-Arg-Val-Ile-Glu-Ser-Gly-Pro-His-Cys-Ala-Asn-Thr-Glu-Ile-Ile-Val-Lys-Leu-Ser-Asp-Gly-Arg-Glu-Leu-Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lys-Phe-Leu-Lys-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser, waarbij X = Ser-Ala-Lys-Glu.
2. NAF volgens conclusie 1 waarbij X = Lys-Glu.
- 50 3. NAF volgens conclusie 1 waarbij X = Glu.
4. NAF volgens een of meer der conclusies 1–3, welke verkregen is via een synthetische en/of recombinant DNA-werkwijze.
5. Werkwijze voor het bereiden van NAF volgens een of meer der conclusies 1–3, met het kenmerk, dat men de bovenstaande vloeistof van humane monocytcultures chromatografisch zuivert en wint.
- 55 6. Werkwijze voor het bereiden van NAF volgens een of meer der conclusies 1–3, gekenmerkt door tot expressie brengen in E.coli van een expressievector, bevattend een nucleotidesequentie coderend voor een polypeptide met de aminozuurvolgorde van conclusie 1, 2 of 3 en winnen ervan.

7. Expressievector p(NAF)-6T3 en equivalenten daarvan die geschikt zijn voor de werkwijze volgens conclusie 6.
8. Een farmaceutisch preparaat dat NAF volgens een der conclusies 1-3 tezamen met een farmaceutisch aanvaardbare drager of verdunningsmiddel bevat.
- 5 9. Een farmaceutisch preparaat, dat een NAF bevat met de volgende volledige aminozuurvolgorde:
X-Leu-Arg-Cys-Gln-Cys-Ile-Lys-Thr-Tyr-Ser-Lys-Pro-Phe-His-Pro-Lys-Phe-Ile-Lys-Glu-Leu-Arg-Val-Ile-
Glu-Ser-Gly-Pro-His-Cys-Ala-Asn-Thr-Glu-Ile-Ile-Val-Lys-Leu-Ser-Asp-Gly-Arg-Glu-Leu-Cys-Leu-Asp-
Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lys-Phe-Leu-Lys-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser, waarbij X =
Ala-Val-Leu-Pro-Arg-Ser-Ala-Lys-Glu-, geschikt voor gebruik bij de behandeling van aandoeningen die
10 gepaard gaan met of veroorzaakt worden door een modificatie van het aantal of activeringstoestand van
polymorfonucleaire celneutrofielen.

Hierbij 19 bladen tekening

FIG. 1

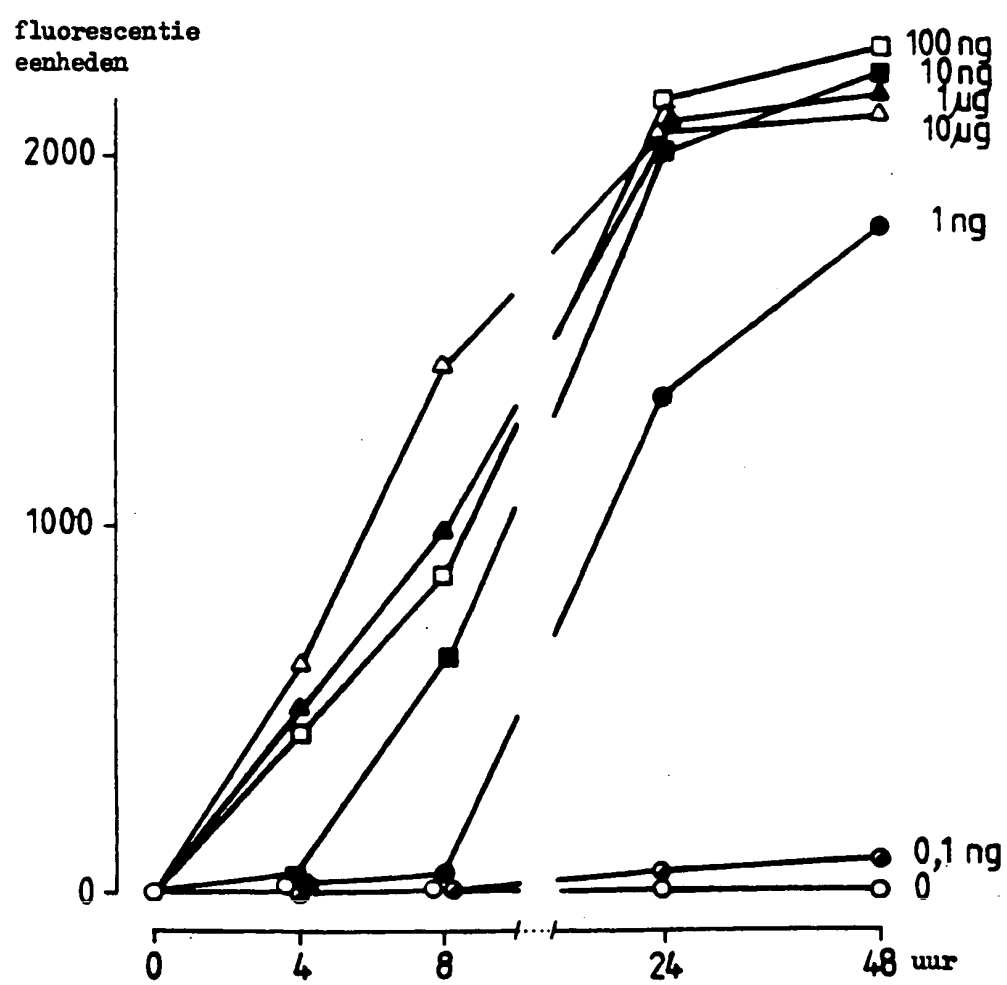


FIG. 2

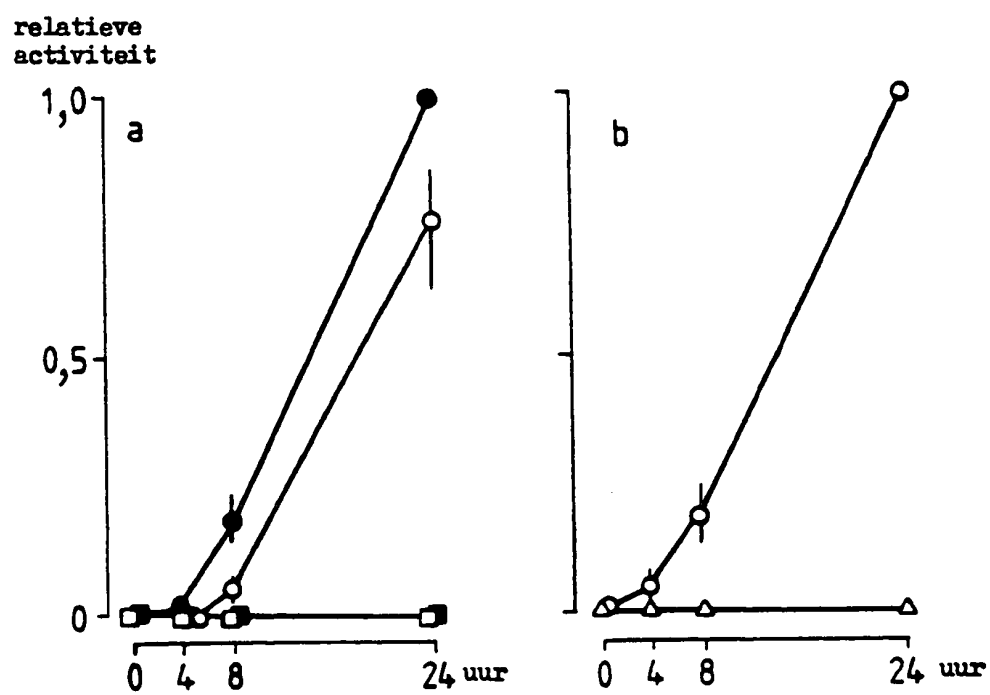


FIG. 3

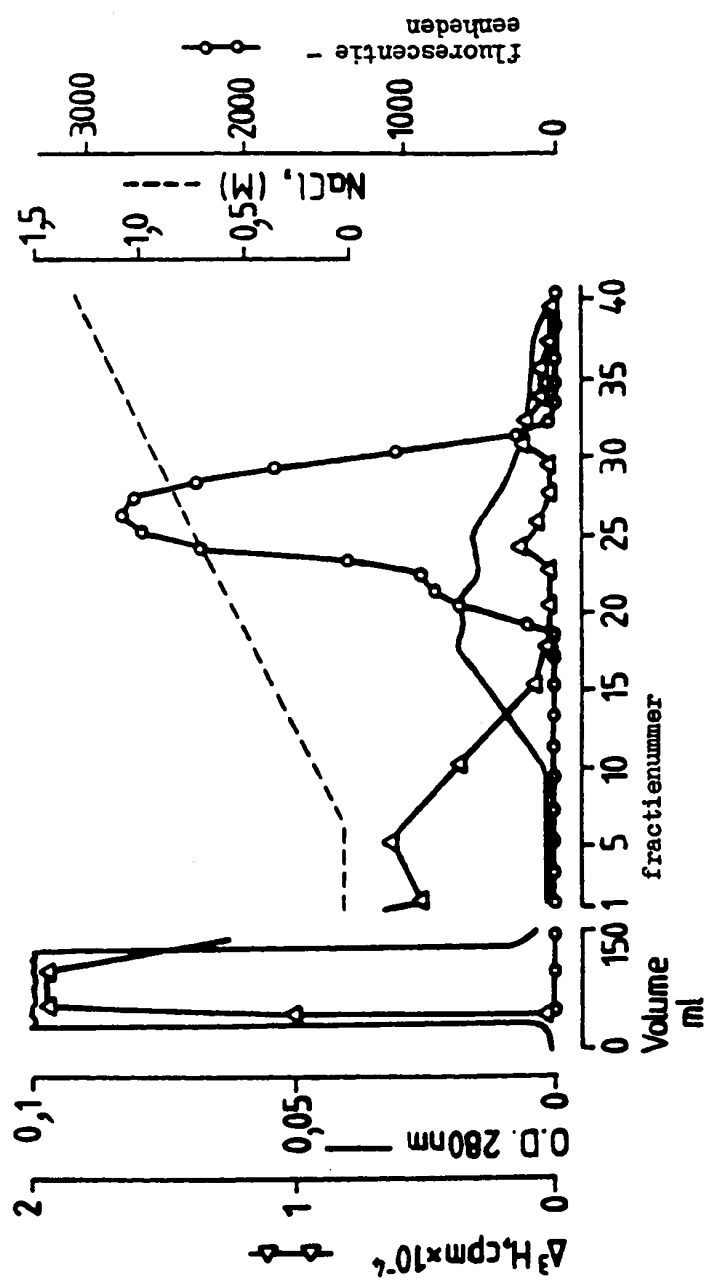


FIG. 4

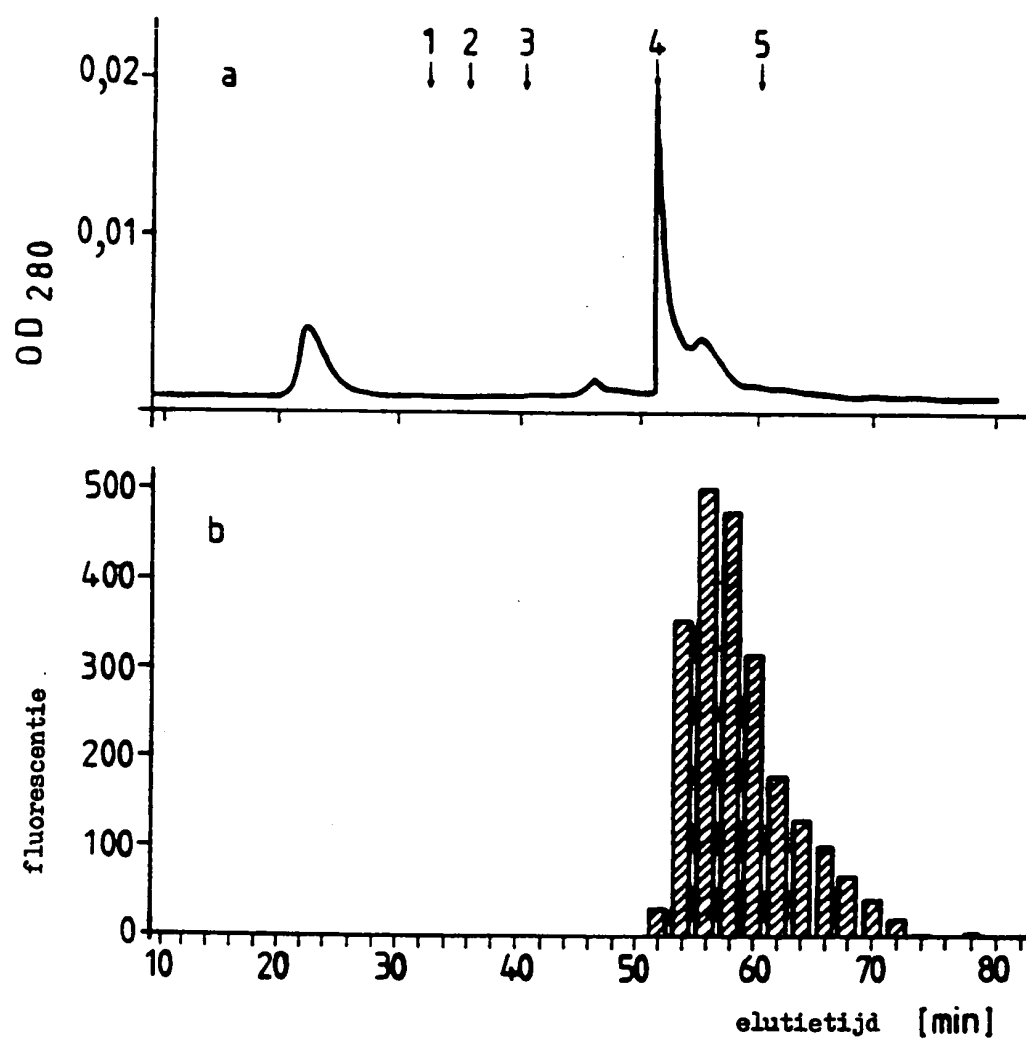


FIG. 5

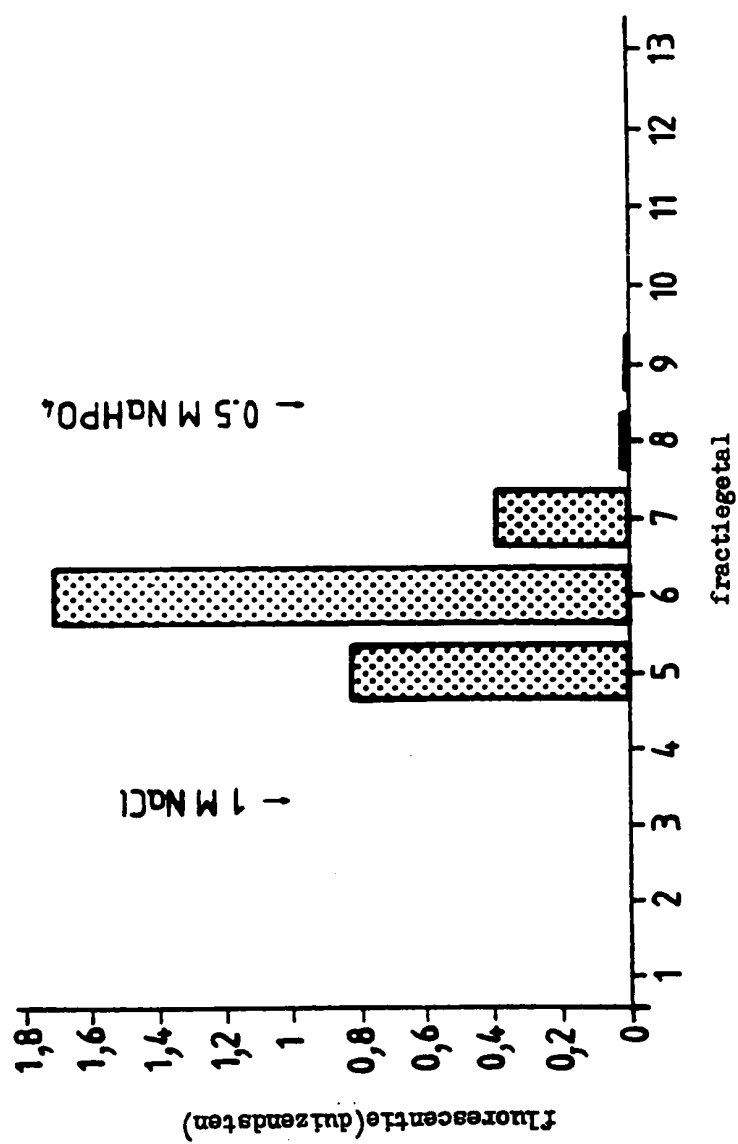


FIG. 6

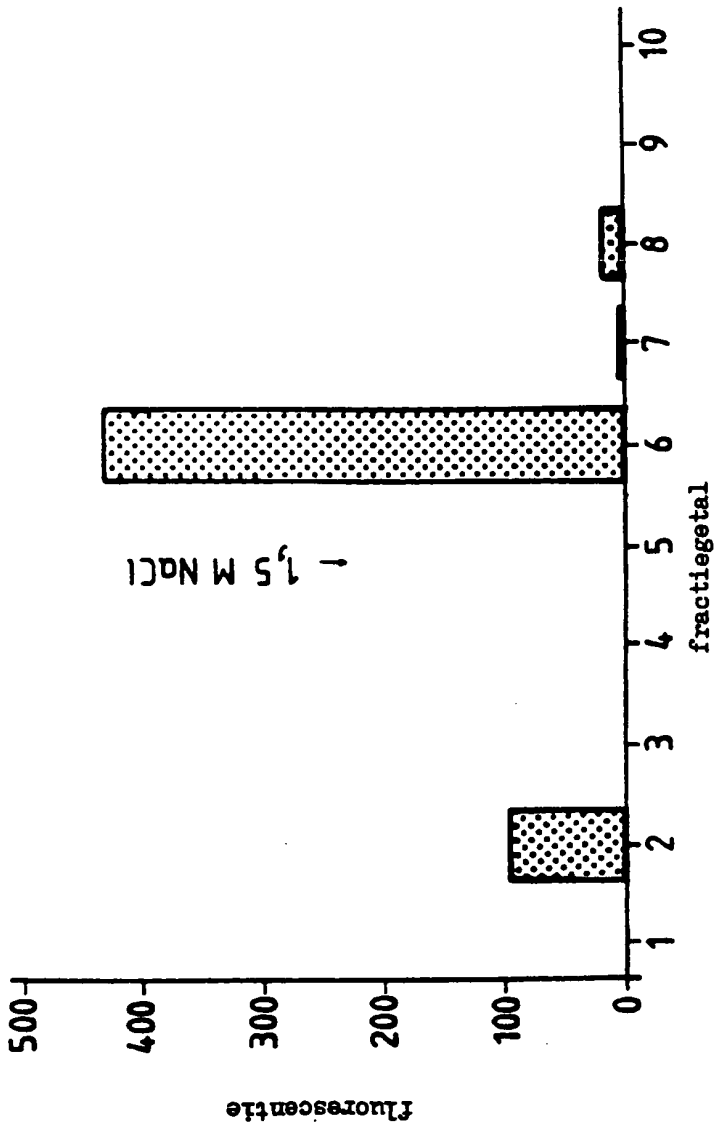


FIG. 7

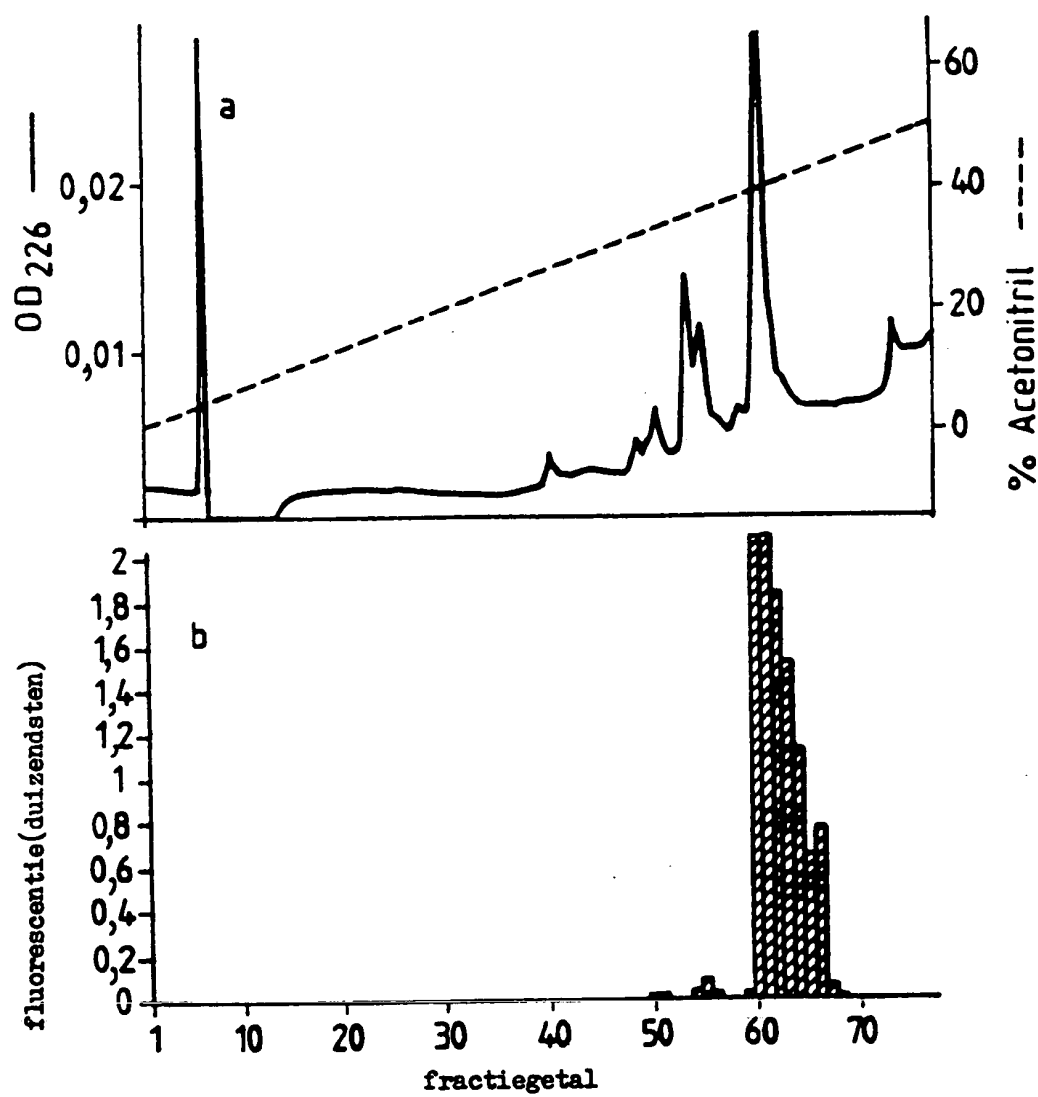


FIG. 8

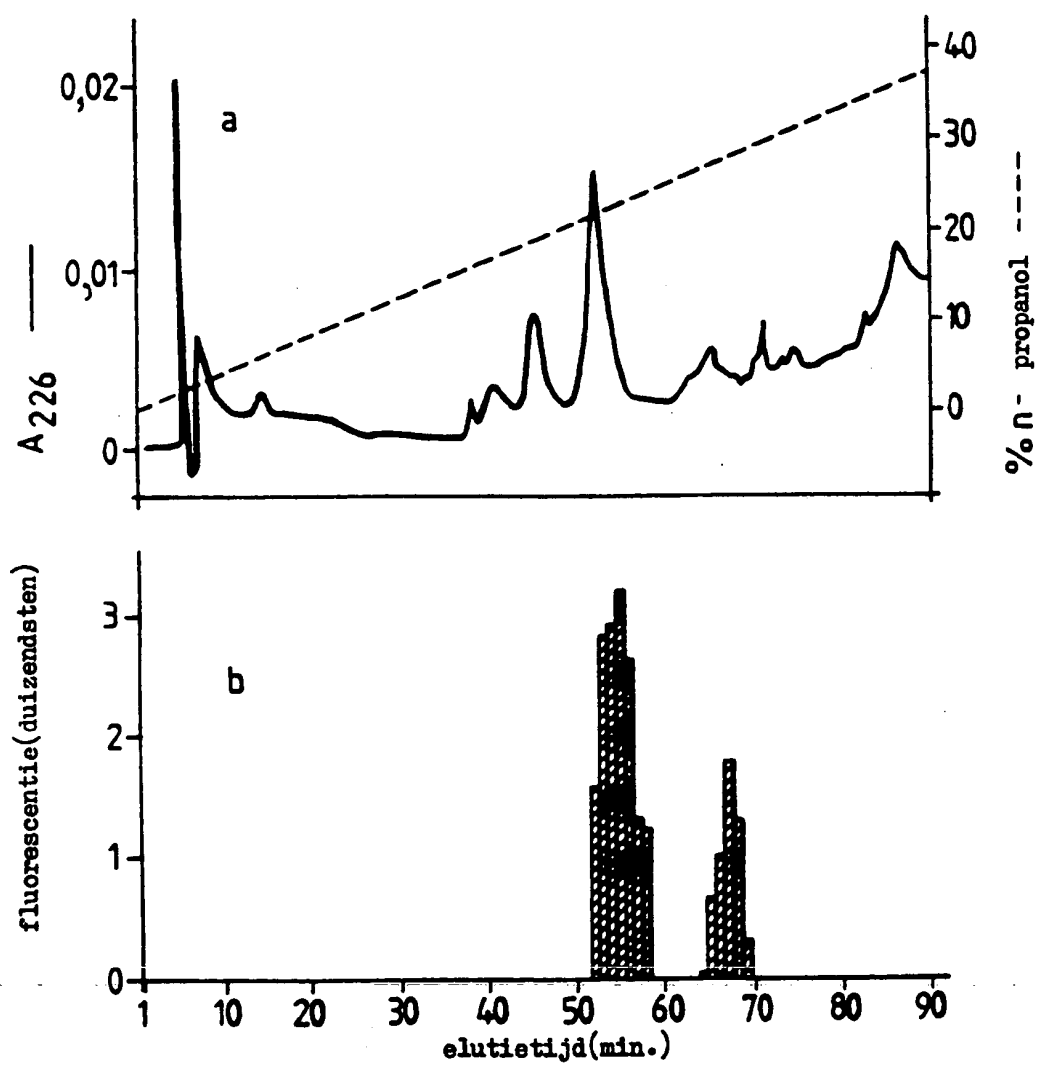


FIG. 9

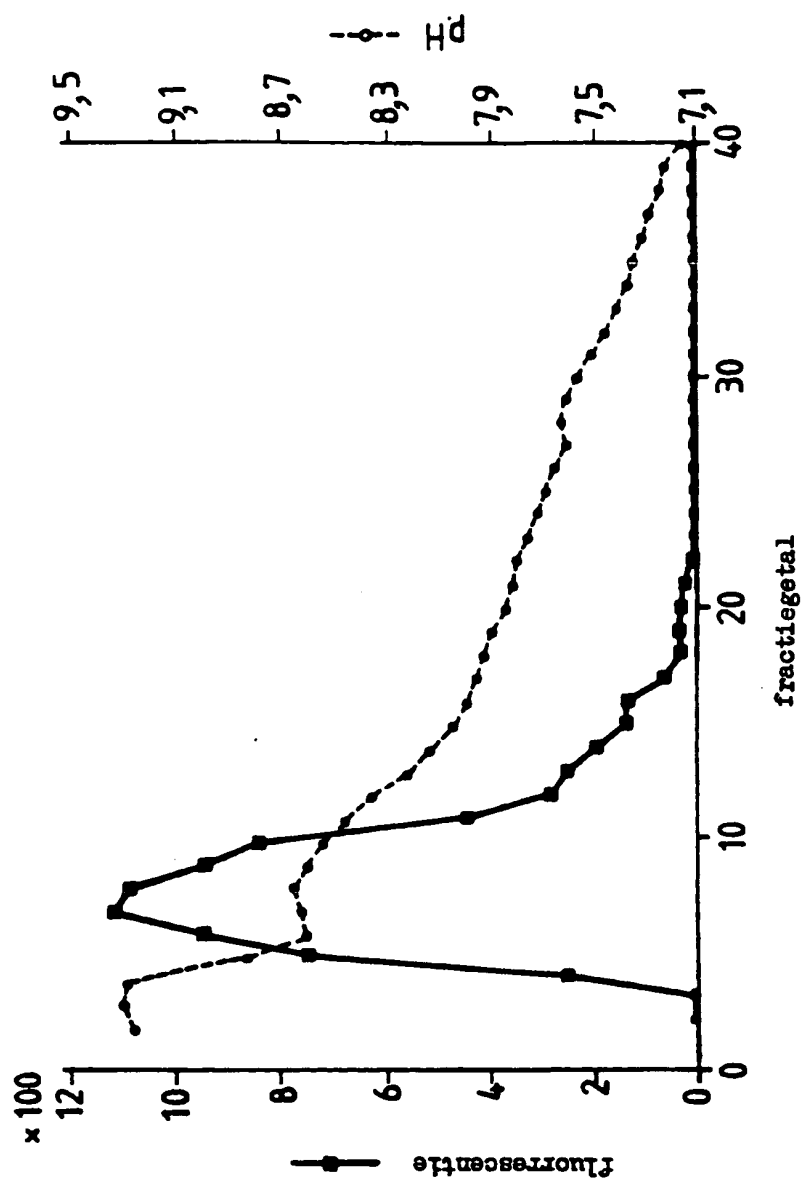


FIG. 10

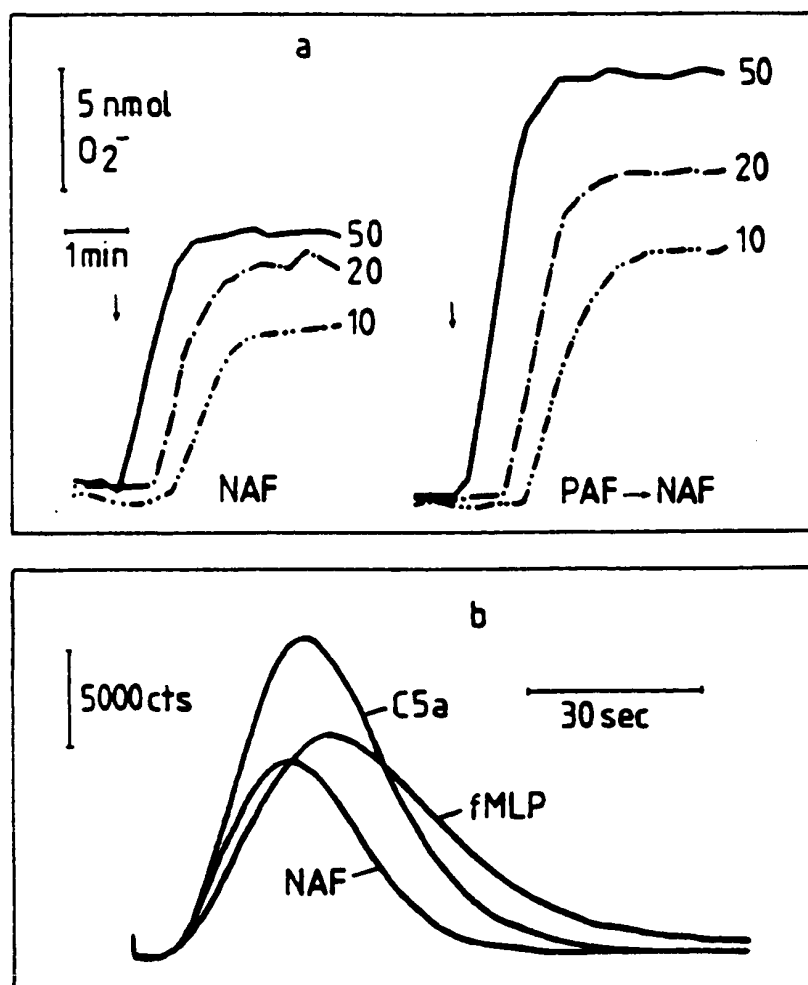


FIG. 11

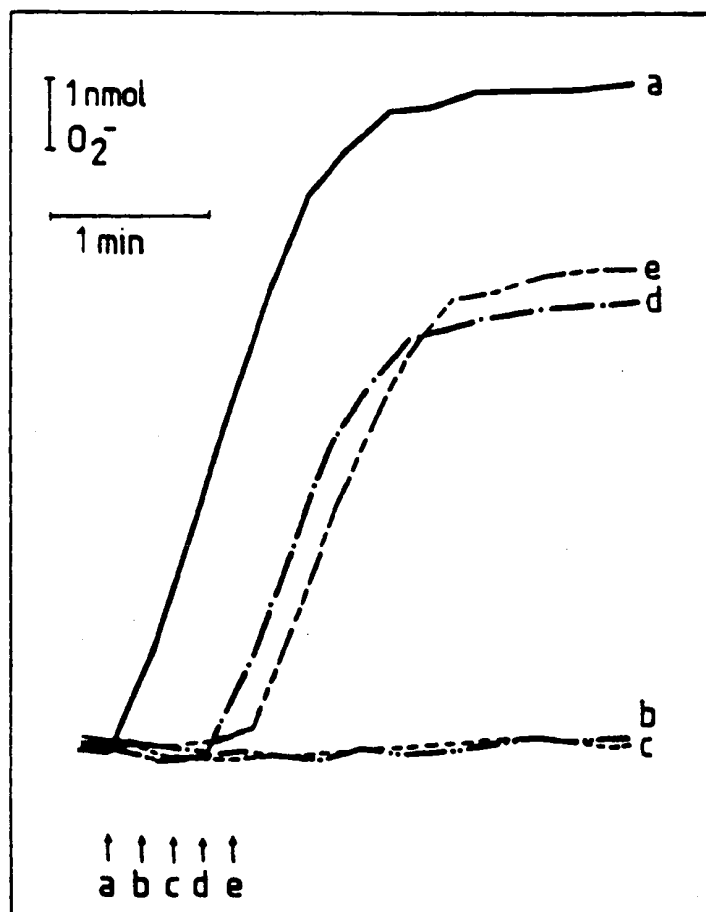
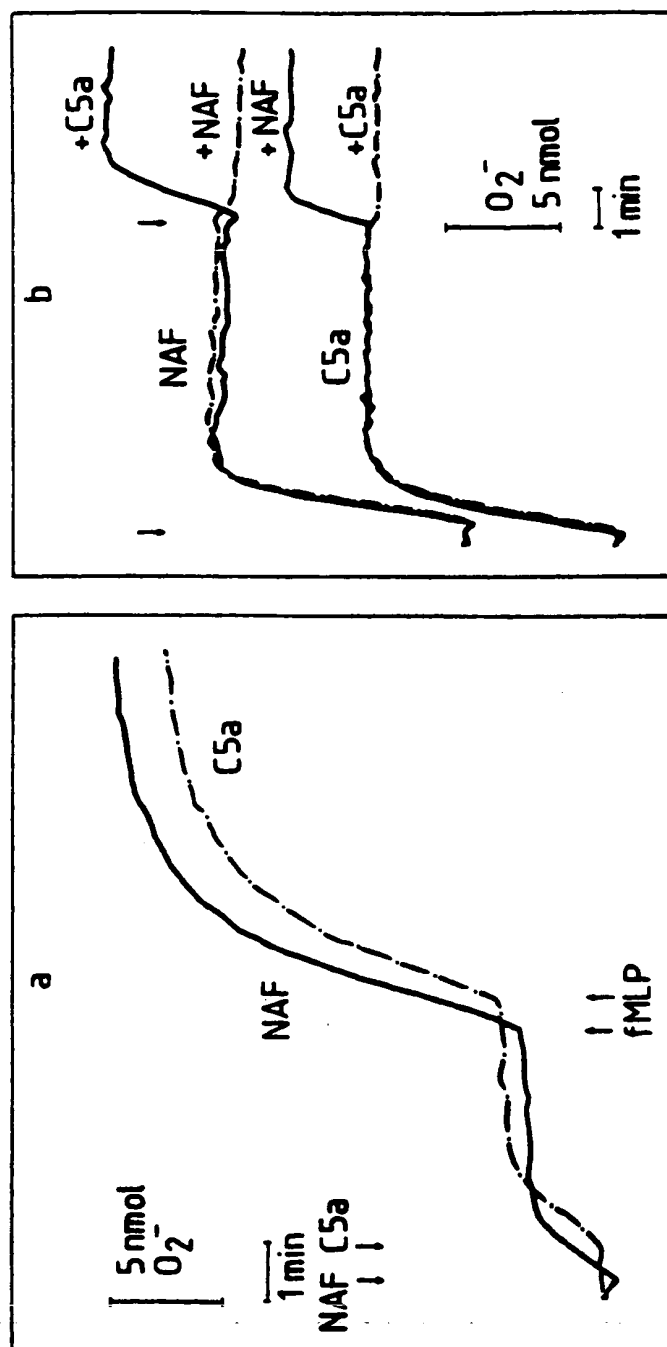


FIG. 12



· 230 BamHI

----- ON-5 ----->

AAC TGG GTG CAG AGG GTT GTG GAG AAG TTG TTG AAG AGG GCT GAG AAT TCA TAA TAA TGA G
TTG ACC CAC GTC TCC CAA CAC CTC TTC AAA AAC TTC TCC CGA CTC TTA AGT ATT ATT ACT CCTAG

----- ON-6 ----->

Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser * * *

60 70

FIG. 14

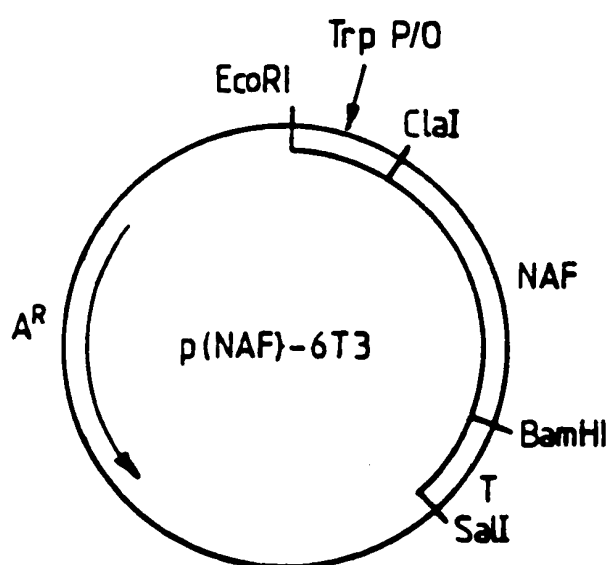


FIG. 15

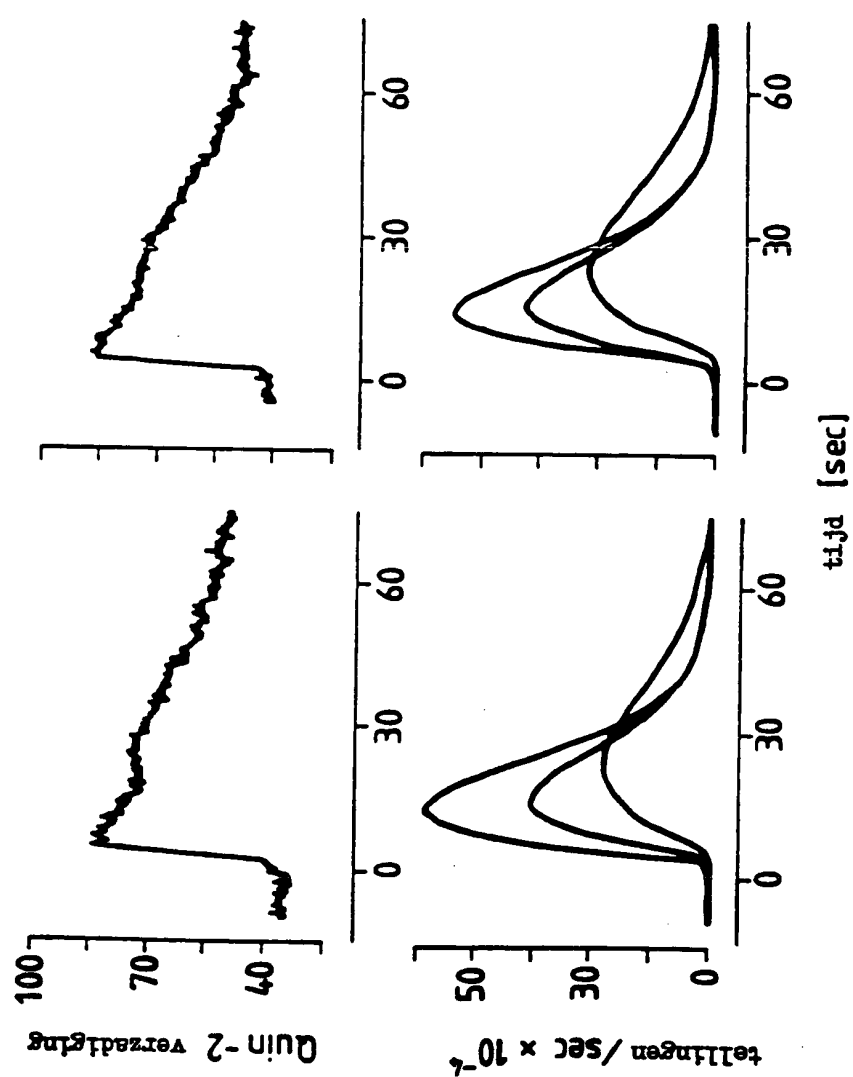
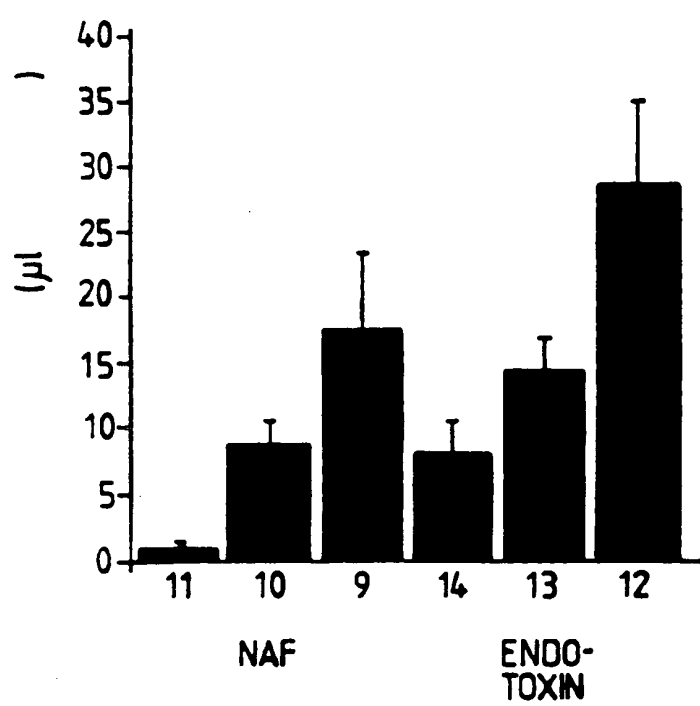


FIG. 16



behandeling (-log mol per plaats)

FIG. 17

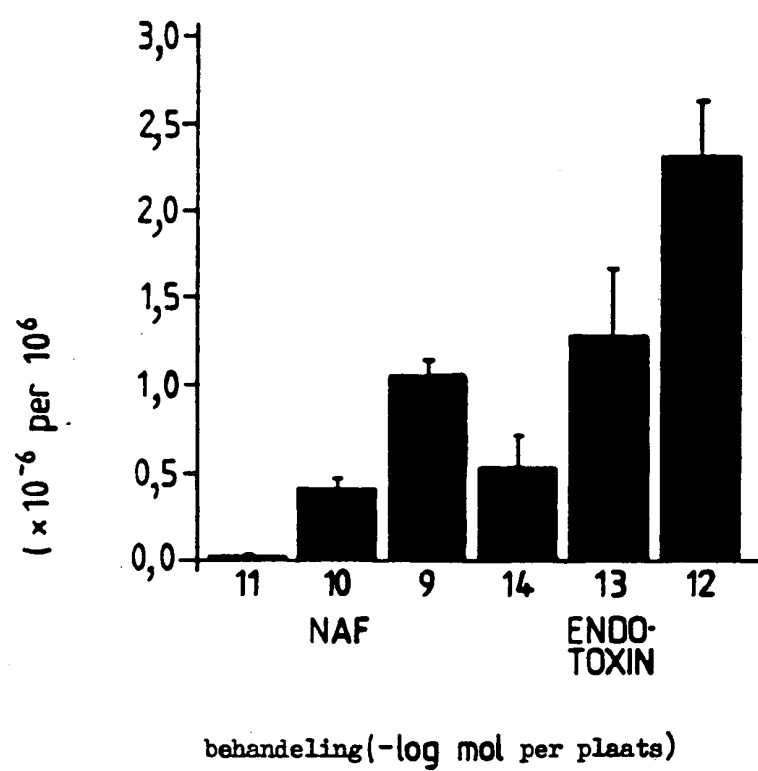


FIG. 18

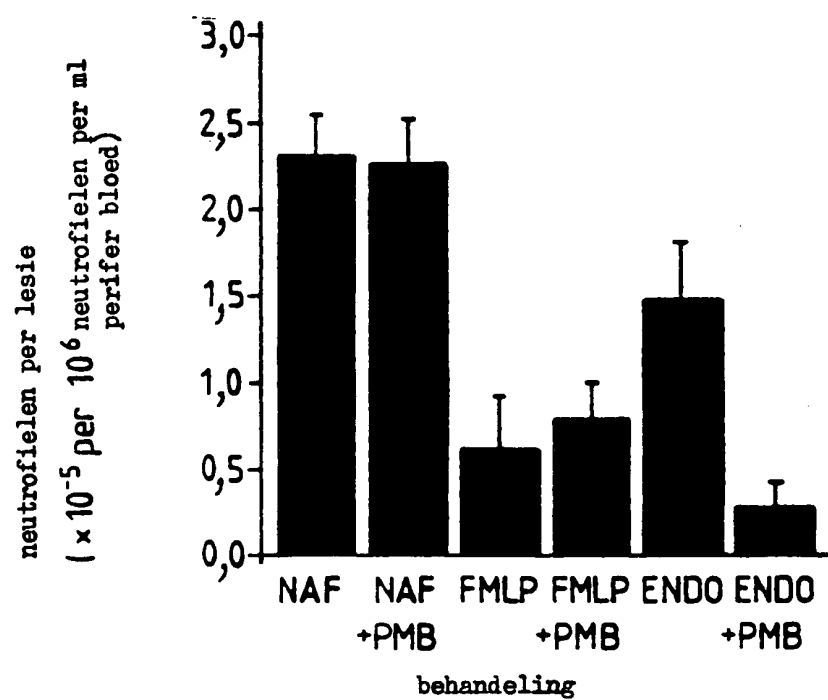


FIG. 19

