

Wifan

P. I. Nº 89026

MEMORIA DESCRITIVA DO INVENTO

para

" PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FACTOR
DE ACTIVAÇÃO DOS NEUTROFILOS "

que apresenta

SANDOZ, S.A., suíça, industrial, com sede em Basileia,
Suíça e THEODOR KOCHER INSTITUT, instituto suíço, com
sede em Freiestrasse 1, CH-3012 Berne, Suíça.

R E S U M O

A invenção refere-se ao processo para a preparação de factor de acti-
vação dos neutrófilos (FAN), puro biologicamente activo, que é isola-
do de monócitos humanos ou é obtido após a expressão de um gene FAN
sintético em Escherichia coli. Ele possui a seguinte sequência de
aminoácidos:

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

Existem mais três variantes menores, com sequências mais longas e mais
curtas.

Os FAN natural e sintéticos possuem propriedades biológicas e estru-
turas idênticas.



A presente invenção refere-se a uma substância imunomodulatória.

Refere-se particularmente a um factor imunoestimulante capaz de activar leucócitos neutrófilos humanos, a partir daqui designado apenas como factor de activação de neutrófilos (NAF).

1 ENQUADRAMENTO GERAL

Os leucócitos neutrófilos (neutrófilos são os leucócitos mais comuns e elevam-se a cerca de 2/3 dos glóbulos brancos existentes no sangue humano. Possuem uma função essencial, a de proteger o organismo hospedeiro contra infecções microbianas. Os neutrófilos são móveis, respondem a estímulo quimiotácticos gerados depois da infecção e têm a capacidade de se movimentarem para os tecidos infectados para matar os microorganismos. A eliminação dos microorganismos, depende da capacidade microorganismos e de libertarem radicais de oxigénio e enzimas microbianas. (B.M.Babior, New Eng. J. Med. 298-1978-659-668 e M. Baggiolini Experientia 40-1984-906-909). A libertação de tais produtos depende da activação de neutrófilos, poderiam ser usados com o fim de aumentar a activação dos neutrófilos, e portanto, melhorar o mecanismo de defesa anti-micróbios do corpo humano.

A requerente descobriu agora que os monócitos humanos segregam um factor que induz a exocitose e a eclosão respiratória (formação de radicais de oxigénio e libertação de enzimas) nos neutrófilos humanos e portanto possui propriedades de activação de neutrófilos, as quais são importantes na actividade anti-microbiana.

O factor pode ser obtido a partir do fluido da cultura de monócitos humanos estimulados e apresentam um peso molecular aparente de aproximação 6000, mais precisamente cerca de 6500, na electroferese em SDS-gel.

Os monócitos são células fagocíticas similares aos neutrófilos, Em contraste com os neutrófilos, apresentam, no entanto, uma longa vida.

Migram a partir do sangue para todos os sítios possíveis dos tecidos onde se transformam em macrófagos. A transformação de monócitos em macrófagos pode também ser observada em ensaios experimentais de cultura de células. Os macrófagos nos tecidos apresentam variadíssimas funções, principalmente a fagocitose de material indesejado e a produção de uma grande variedade de péptidos e proteínas, as quais são excretadas. Os macrófagos reúnem-se no local onde se verificam infecções persistentes e é nestes locais que a produção de NAF por parte destas células pode aumentar a capacidade de defesa dos neutrófilos do hospedeiro e, portanto, têm uma função patofisiologicamente relevante.

NAF é caracterizado pelas suas capacidades de activação de neutrófilos, isto é indução da referida eclosão respiratória com produção de radicais de oxigénio e a indução da libertação de enzimas. Em termos moleculares, NAF é caracterizado pelas seguintes propriedades: um peso molecular aparente de cerca de 6500 em gelectroforese em geral de SDS, um ponto isoelectrico de aproximadamente 8,6, resistência ao aquecimento até 80°C e a numerosos agentes desnaturantes mas sensíveis a proteases, as quais sugerem que o NAF é um polipéptido. A acção do NAF sobre os neutrófilos humanos é às dos dois estimulantes quimiotácticos conhecidos, o anafilatoxina C5a e o péptido bacteriano N-formil - L-leucil - L-fenil - alanina (f MLP) mas é medida por um receptor superficial de neutrófilos humanos a que o NAF se liga e que é diferente dos receptores de qualquer agonista conhecido de neutrófilos humanos. O NAF é produzido pelos monócitos humanos em cultura mas não por linfócitos humanos. A produção depende da presença de um estímulo como lipopolisacárido bacteriano (LPS), fito-hemaglutinina (PHA) ou concanavalina (ConA), e da concentração do estímulo e do tempo de incubação. É inibida pela ciclo-heximida, indicando de novo que está envolvida a síntese de proteínas.

Tal como já se referiu, os monócitos e macrófagos são fontes abundantes de uma variedade de proteínas e péptidos bioactivos (C.F. Nathan, J. Clin. Invest. 79 1987, 319-326). Foram identificados como produtores de três citocinas distintas: interleucina 1 (IL-1), factor de



necrose de tumores (TNF) e interferão-alfa (IFN- α). Foram publicados nulosos relatórios mostrando que os monócitos e os macrófagos produzem também factores que actuam sobre os neutrófilos, os quais são diferentes dos acima mencionados. Como se mostram activos sobre os neutrófilos, estes factores serão na presente memória descritiva apresentados com algum pormenor. Foi referido em variadas publicações que os macrófagos alveolares libertam factores que são quimiotácticos para os neutrófilos (J.A. Kazmierowski et al., J. Clin. Invest. 59 1977, 273-281; W.W. Merrill et al., J. Clin. Invest. 65 1980 268-270 e G. W. Hunninghake et al., J. Clin. Invest 66 1980 473-483) e os quais podem aumentar a defesa antimicrobiana no pulmão. Mostrou-se subseqüentemente que estes factores aumentam a actividade microbiana dos neutrófilos (J.E. Pennington et al., J. Infect. Dis. 148 1983 101-109 e J. Clin. Invest. 75 1985, 1230-1237). A purificação por filtração em gel e cromatografia conduz à identificação de um factor sensível à protease (denominado NAF) produzido por macrófagos alveolares, com um peso molecular igual a 6000 e um ponto isoeléctrico de 7,6. Este factor foi indicado como sendo fracamente quimiotáctico e aumentar a eliminação de bactérias que sofreram a fagocitose pelos neutrófilos sem, no entanto, induzir ele mesmo a produção de radicais de oxigénio nem a libertação de enzimas. Um mecanismo semelhante de aumento de actividade antimicrobiana foi descrito por outros investigadores (A. Ferrante et al., Clin. Exp. Immunol. 56 1984, 559-566), que mostraram que os neutrófilos humanos requerem a adição de um meio de cultura de monócitos ou macrófagos para provocarem a morte de Neigleria fowleri. Os mediadores da activação de granulócitos (GRAM) produzidos pelos monócitos humanos LPS-estimulados foram descritos por outros experimentadores (A. Kapp et al., J. Invest. Dermatol. 86 1986, 523-528 e F.E. Maly et al., Lymphokine Res. 5 1986, 21-33). Foram descritas duas espécies de GRAM, uma maioritária com um peso molecular aparente de 60 000 e outra minoritária com um peso molecular aparente de 10 000, que induziram um retardamento da resposta à eclosão respiratória por parte dos neutrófilos humanos, como se revelou por quimioluminescência. Estes factores são sensíveis ao aquecimento e à tripsina e a sua produção depende da

Wifama

— estimulação dos monócitos com LPS e, aparentemente, de novo da síntese proteica.

Variadíssimos relatórios descrevem factores derivados a partir de monócitos e/ou macrófagos com actividade quimiotáctica próxima dos neutrófilos. Foi descrito um factor denominado " Quimiotaxina derivada de células mononucleares " (MOC), que aparentemente é um péptido de peso molecular de 10000 e que difere de GRAM, (E. Kownatzki et al., Clin. Exp. Immunol. 64 [1986], 214-222). Um factor quimiotáctico de neutrófilos produzidos por monócitos de sangue humano estimulados com LPS, com um peso molecular de aproximadamente 10000 e um ponto isoeléctrico de 8-8,5 foi também descrito (T. Yoshimura et al., J. Immunol. 139 [1987], 788-793). Finalmente foi também relatado que macrófagos peritoneais de ratos estimulados em cultura com LPS, libertam um factor quimiotáctico neutrofilico (F.Q. Cunha et al., J. Med. Biol. Res. [1986] 775-777 e Eur. J. Pharmacol. 129 [1986] 65-76).

Devido à natureza preliminar da informação bioquímica contida nestes relatórios é impossível especular sobre as similaridades e diferenças estruturais entre os vários factores descritos.

Subsequentemente à (s) data (s) da (s) prioridade (s) que é (são) reclamadas para a presente invenção, a purificação de um péptido correspondente provavelmente a NAF foi descrita por Van Damme et al., (J. Van Damme et al., J. Exp. Med. 167 [1988] 1364-1376) e uma sequência idêntica à do NAF foi descrita por Gregory et al., (H. Gregory et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 151 1988 893-890) para um péptido que foi purificado a partir de sobrenadantes de linfócitos humanos estimulados com lectina. O cDNA que codifica para MDNCF (T. Yoshimura et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84 [1987], 9233-9237) foi recentemente clonado (K. Matsushima et al., J. Exp. Med. 167 [1988], 1883-1893) e descobriu-se que corresponde a 3-10C cDNA (J. Schmid e C. Weissmann, J. Immunol. 139 [1987] 250-256). Schmid e Weissmann demonstraram que o péptido codificado por 3-10 cDNA tem homologia estrutural com o factor de plaquetas 4, beta-tromboglobulina, péptido III activador de

6
Wifama

tecido conectivo (CTAP-III) e péptido indutível por interferção-gama (gamma-IP-10). Estas moléculas são também homólogas dum péptido com 73 resíduos (MGSA) com propriedades estimulantes do crescimento de melanoma (A. Richmond et al., EMBO J. 7 [1988], 2025-2033) cuja sequência se parece muito com a deduzida a partir do gro-cDNA isolado a partir de fibroblastos (A. Anisowicz et al., Proc. Nat. Acad. USA 84 1987 7188-7192). Uma proteína inflamatória derivada de macrófagos de murina (MIP) possivelmente relacionada com as proteínas descritas, foi também mencionada (G. Davatelis et al., J. Exp. Med. 167 [1988], 1939-1944) e parece ser um membro da família de péptidos incluindo RANTES, o produto 8 de kd dum cDNA isolado a partir de clone de células T humanas provocadas por antigénios dependentes de IL-2 T.J. Schall et al., J. Immunol. 141 [1988] 1018-1029). As funções destes péptidos são em grande parte desconhecidas. MGSA e CTAP-III (C.W. Castor et al., Pro. Nat. Acad. Sci. USA 80 1983, 765-769) foram descritas como sendo mitógenicas e o factor 4 de plaquetas demonstrou-se ter efeitos imunomodulatórios (A.D. Barone et al., J. Biol. Chem 263 1988, 8710-8715).

Os resultados obtidos sugerem que NAF activa selectivamente os neutrófilos através de um processo mediado por receptor semelhante ao iniciado pelos agonistas quimiotácticos.

2. SUMARIO DA INVENÇÃO

A Requerente descobriu que o NAF desta invenção induz a formação de radicais de oxigénio e a libertação de enzimas em neutrófilos humanos actuando através de um receptor selectivo, diferente de todos os outros receptores até agora descritos.

Determinou-se a sequência total de aminoácidos que constituem o NAF purificado a partir do monócitos humanos estimulados por LPS e um código genético para a espécie de NAF principal sintetizado e expresso como um péptido recombinante com as mesmas propriedades de activação de neutrófilos que o seu homólogo natural.

7
Wifama

A invenção consequentemente, refere-se a NAF e ao seu isolamento a partir de fontes naturais tais como monócitos humanos.

Refere-se também ao NAF especialmente recombinante sintético e à sua preparação e expressão.

3. DESCRIÇÃO PORMENORIZADA

A sequência completa de aminoácidos do NAF determinado por métodos de sequenciamento conhecidos:

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

A degradação de Edman da proteína completa e dos fragmentos típicos 7-26 e T 27-47 obtidos após quebra de ligações do NAF SH-metilado e do NAF amino-succini-lado origina a sequência até à posição 47. Por hidrólise com ácido fórmico a 75% e degradação de Edman, obtiveram-se duas sequências aproximadamente equimolares de 20 aminoácidos, seguidas por um único formato que corresponde à sequência aminoterminal do NAF para além da posição 20. A sequência dos péptidos carboxiterminais A 53-72 foi determinado por subtração e confirmada por análise do péptido típico T 61-72. As carboxipeptidases A e B originam produtos de clivagem detectáveis mas após o tratamento de 1 nanomole de NAF com carboxipeptidase Y libertam-se 120 picomoles de serina, indicativo da serina como a extremidade de carboxi.

Análises de vários lotes de NAF revelaram alguma heterogeneidade aminoterminal. A sequência acima descrita corresponde ao componente maioritário (70%), o qual se crê ser o principal responsável pelas activi-

— dados biológicas. Podem ainda identificar-se três outras variantes:

Sequência 1 (cerca de 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-Lys-Phe-Ile-Lys-Glu-Leu-Arg-Val-
Ile-Glu-Ser-Gly-Pro-

isto é a sequência completa acima descrita prolongada na N-extremida-
de por Ala-Val-Leu-Pro-Arg- (compreende a proteína completa então 77
aminoácidos)

Sequência 2 (cerca de 8%)

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-

isto é sequência completa acima descrita encurtada na N-extremidade
Ser-Ala- (a proteína completa compreende portanto 70 aminoácidos).

Sequência 3 (cerca de 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-Gli-Pro-.

isto é a sequência completa acima descrita, encurtada na N-extremida-
de de Ser-Ala-Lys- (a proteína compreende portanto 69 aminoácidos).

Todas estas frequências podem ser alinhadas com a sequência prevista
a partir do 3-10 cDNA, compreendendo 99 aminoácidos (J. Schind e C.
Weissman, J.Imunol. 139 /1987/: 250-254). O péptido maioritário de
NAF corresponde às posições 28 a 99 da sequência de aminoácidos 3-100,
— enquanto que as três variantes anteriores começam na posição 23 (sequên-
cia 1), 30 (sequência 2) e 31 (sequência 3).

Wifama

— A comparação entre a sequência 3-10C derivada de cDNA e as sequências anteriormente referidas sugere que os fagócitos mononucleares sintetizam um precursor de NAF o qual é processado intracelularmente. O péptido do resíduo 77 poderia representar a forma excretada maior do NAF porque corresponde à sequência derivada de cDNA menos o péptido de 22 aminoácidos de sinal previsto. A espécie principal de NAF com 72 resíduos e os análogos com 70 e 69 resíduos podem resultar de modificações trnaslacionais posteriores.

Todas as formas de NAF têm quatro resíduos de cisteína que se espera formarem pontes de dissulfureto dentro da cadeia as quais parecem importantes para a actividade visto que se verificou que o mercaptoetanol era inibidor (P.Peveri et al., J.Exp. Med. 167 [1988] 1547-1560). As pontes de dissulfureto é provável que liguem as posições 7-34 e 9-50 tal como na beta-tromboglobulina e no factor de plaquetas 4, que são parcialmente homólogas do NAF.

De acordo com a homologia com a beta-tromboglobulina, o NAF tem duas pontes de dissulfureto intramoleculares. Consequentemente, o seu peso molecular calculado é igual a 8384, 7, claramente mais elevado do que o peso molecular determinado por electroferese em SDS-gel.

A produção de NAF a partir de fontes naturais, tais como monócitos humanos, faz-se com baixos rendimentos e requiere operações de purificação extensas e complexas.

A fim de produzir NAF em quantidades mais elevadas e com processos sintéticos de maior rendimento, são indicados por exemplo processos de química ou processos de DNA recombinante. A produção de NAF sintético, por exemplo, por métodos de DNA recombinante, incluindo a expressão num sistema de expressão eucariótico ou procariótico, por exemplo, em E. Coli insere-se também no âmbito da invenção. O NAF sintético, por exemplo, o NAF recombinante isolado por exemplo a partir de bactérias, tem (s) mesma (s) sequência (s) de aminoácidos que o NAF natural e as mesmas propriedades e actividades. "NAF recombinante" significa NAF



obtido por meio de processos de DNA recombinante.

A preparação de NAF por métodos de DNA recombinante é realizado de acordo com técnicas conhecidas, nomeadamente, síntese, purificação e ligação de correspondentes oligonucleótidos, clonagem do gene de NAF sintético, expressão em *E. Coli* e finalmente recuperação e purificação do NAF recombinante. Por exemplo, um gene que codifica para aminoácido 72 do NAF é sintetizado, preferivelmente com optimização de codão, e posteriormente clonado e expresso em *E. Coli*.

A análise da mancha de Wester de extractos bacterianos brutos usando um antissoro desenvolvido contra o NAF natural revela uma única banda que comigra com o NAF natural. O NAF recombinante purificado até ser homogeneizado tem sequências amino terminais e carboxiterminais idênticas às do NAF natural com 72 aminoácidos. Ensaaiado em neutrófilos humanos, verificouse que tem a mesma actividade e potência que o NAF natural induzindo a quimiotaxia, um rápido aumento do Ca^{2+} citosólico livre, activação da eclosão respiratória e libertação dos conteúdos de grânulos específicos e azurófilos.

A Figura 13 mostra a configuração dum gene de NAF sintético. As alterações são evidentes em relação à sequência codificante do 3-LOC cDNA para facilitar a expressão em *E. Coli*. Na extremidade 3', o terminador TAA que ocorre normalmente é substituído pela terminação tripla TAA-TAATGA e um sítio de BamHI é adicionado imediatamente a jusante. Na extremidade 5', os sítios PphI e ClaI são adicionados a fim de permitir a inserção na colonagem e no vector de expressão, respectivamente. Na base 34, é criado um sítio de restrição TaqI para posteriores manipulações na extremidade 5' por mudança do codão Arg de AGA para CGA.

O fortalecimento por blocos (oligonucleótidos 1-2, 3-4, e 5-6) não tem vantagens relativamente à ligação simultânea de todos os 6 oligonucleótidos. A fosforilação 5' de todos os oligonucleótidos origina produtos de ligação de tamanha superior ao esperado, mas quando os oligonucleótidos terminais (1 e 6) não são fosforilados, o produto

Wifama

com o peso molecular mais elevado é o gene completo com 248/240 bases. O gene é ligado em pBS M¹³ cortado com SphI/BamHI e transformado em E. Coli. O plasmídeo DNA isolado a partir de 6 das colónias resistentes à ampicilina resultantes é cortado com ClaI/Bam HI, proporcionando em todos os casos uma banda de 237 bp em gel de agarose a 1,4%. O sequenciamento de DNA revela os clones compreendendo a sequência correcta. A cadeia ClaI/BamHI de um clone correcto é retirado do gel e clonado no vector promotor de Trp, pIL 402 (Termo). Como possível meio para aumentar a expressão, um terminador de transcrição sintético (ver exemplo 17) pode ser incorporado neste vector ligado à extremidade 3' do gene humano GM-CSF no local Bam/HI. O gene NAF é portanto inserido entre este local BamHI e o local ClaI a jusante do local da iniciação de transcrição no promotor, para substituir o gene GM-CSF. O plasmídeo de expressão NAF resultante, p(NAF)-6T3, é representado na Fig. 14.

As análises de mancha de prata ou por mancha de Western de extractos de E. Coli induzidos por ácido indol-acrílico compreendendo p(NAF)-6T3 demonstram a produção dependente do tempo dum péptido que comigra com o NAF natural e reage com um anti-soro contra o NAF natural.

O sistema de expressão acima mencionado pode também ser usado para a preparação das variantes de NAF, acima mencionadas, ou outros fragmentos de NAF biologicamente activos, tais como fragmentos NAF truncados com amino.

As propriedades biológicas do NAF são específicas em relação à espécie. A actividade em coelhos reflete praticamente a actividade nos seres humanos.

Os testes preliminares em ratos, ratazanas e porcos guinea não revelaram qualquer actividade nítida.

O NAF é indicado para uso no tratamento de condições que são acompanhadas ou causadas, localmente ou sistematicamente, por uma modificação do número ou do estado de activação das PMN (células polimorfonu-

Wifama

cleares-neutrófilos). O NAF modifica extensivamente estes parâmetros de PMN e é portanto indicado para uso no tratamento de condições nas quais um aumento no número ou do estado de activação das PMN conduz a melhoramentos clínicos, por exemplo, em infecções provocadas por bactérias, microplasmas, leveduras e fungos e virais. Além disso, o NAF está indicado para uso em doenças inflamatórias, tais como psoríase, condições artríticas e asma, ou em condições de contagens anormalmente baixas de neutrófilos e/ou nível de neutrófilos baixo generalizado, e na preparação de antagonistas para uso nestas condições.

3. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Produção de NAF induzida por LPS

Colocam-se células mononucleares separadas da forma como se descrevem no Exemplo 1 em placas de cultura com 24 reentrâncias (5×10^6 células em 1 ml) e estimulam-se com LPS à concentração indicada. Recolhe-se o meio em intervalos de tempo variados, clarifica-se por centrifugação (20 000 rpm durante 20 minutos a 4°C) e mede-se a actividade do NAF. Células de um único dador; meios de culturas duplas. Estes resultados são representativos de 4 experiências similares usando células de dadores diferentes.

Figura 2: Produção de NAF por fagócitos mononucleares mas não por linfócitos

a) A fracção total de células mononucleares (5×10^6 células /ml) e de células suas derivadas (●, □) são cultivadas na presença de 100 ng de LPS (●, ○) e na sua ausência (■, □) durante 24 horas.

Wifama

b) Monócitos ($0, 10^6$ células/ml) e linfócitos (Δ , 4×10^6 células/ml) purificados por elutriação são cultivadas na presença de 100 ng de LPS.

Os gráficos representam valores médios relativos para a libertação de elastase a partir de experiências separadas 5(a) e 6(b) realizadas cada uma delas em duplicado. Os dados são normalizados posicionando os de 24 horas do $\bullet$, no painel a e do $\bullet$ no painel b igual a 1,0 e calculando os outros valores (média $\pm$ desvio padrão) relativos a este. Este tipo de representação é escolhido no sentido de se entrar em linha de conta com a variação de produção de NAF por um lado, e a respossto dos neutrófilos usados para testar o NAF, por outro.

Figura 3: Purificação parcial do NAF por cromatografia em fotocelulose

A distribuição de proteína (absorvância a 28 nm, - - -), do NAF (O) e IL - 1 (Δ) é representada. As frações com as actividades mais elevadas do NAF são realçadas como se indica.

Figura 4: Purificação do NAF por filtração em gel de HPLC

a) Distribuição da proteína (absorvância a 280 nm) e tempo de eluição de marcadores de peso molecular (setas : 1= peso molecular 66200; 2= peso molecular 42 700; 3= peso molecular 21 500; 4= peso molecular 6 500 e 5= peso molecular 1 255)

b) Perfil da actividade do NAF.

Figura 5: Purificação do NAF por cromatografia em hidroxilapatite

O NAF parcialmente purificado é carregado na coluna com baixa concentração salina e então eluído por um tampão compreendendo NaCl 1 M. As barras representam a actividade de NAF.

Figura 6: Purificação do NAF por cromatografia em heparinasefarose

O NAF parcialmente purificado é carregado numa coluna com baixa concentração salina e então eluída com uma solução tampão compreendendo NaCl 1,5 M.

As barras representam a actividade do NAF.

Figura 7: Purificação do NAF por HPLC em fase inversa numa coluna C4

a) O NAF purificado é carregado numa coluna RP em ácido trifluoracético a 0,1 %. A coluna é desenvolvida com um gradiente linear de acetonitrilo em ácido trifluoracético a 0,1%.

b) As barras representam a actividade do NAF.

Figura 8: Purificação do NAF por HPLC em fase inversa, em coluna de CN-propilo

a) O NAF purificado é carregado numa coluna de CN- propilo Bakerbond. A coluna é desenvolvida com um gradiente linear de n-propanol em ácido trifluoracético a 0,1 %.

Wifama

b) As barras representam a actividade do NAF.

Figura 9: Purificação do NAF por cromatofocagem:

O NAF purificado parcialmente é carregado numa coluna de cromatofocagem. A coluna é desenvolvida numa solução politampão 96-HCL, pH 7,0. As fracções são testadas em relação à actividade do NAF (~~---~~) e pH (~~---~~).

Figura 10: Resposta da eclosão respiratória ao NAF purificado parcialmente

a) Produção de Superóxido: neutrófilos (3×10^6 /ml) são pré-incubados a 37° com ou sem $1 \mu\text{M}$ PAF durante 2 minutos e então estimulados com quantidades crescentes de NAF. Observam-se diminuições nos registos de citocromos c a seguir à adição de NAF.

b) Quimioluminescência dependente de H_2O_2 : São representadas à esquerda das curvas de evolução seguindo a estimulação com NAF parcialmente purificado e as concentrações aproximadamente equiactivas de C5a e fMLP. A fase inicial da resposta é detalhada à direita. Os estimulantes são adicionados em $50 \mu\text{l}$ de PBS-BSA.

Figura 11: Discriminação entre NAF e C5a

C5a e NAF são incubados durante 15 minutos com soro humano fresco ou com PBS e as actividades das preparações são determinadas (produção de superóxido).



- a) C5a em PBS,
- b) C5a em soro,
- c) só soro,
- d) NAF em PBS,
- e) NAF em soro.

Figura 12: Formação de superóxido em resposta à estimulação sequencial com NAF parcialmente purificado, C5a e fMLP

- a) São pré-incubados neutrófilos a 37°C durante 5 minutos e depois estimulados com diferentes agonistas como se indica (setas).
- b) Estimulação sequencial ou repetida com NAF e C5a. As condições são as indicadas na alínea a).

As setas representam a adição de agonistas como se indica. A concentração de C5a é de 0,5 nM em a) e de 0,2 nM em b), enquanto é de 20 nM de fMLP em ambas as experiências. Os agonistas são adicionados em 50 µl de PBS-BSA.

Figura 13: Sequência de nucleótidos do gene NAF sintético

Os nucleótidos simples, ON-1 a ON-6, usados na construção do gene são representados por linhas tracejadas. Os números dos nucleótidos (sublinhados) aparecem do lado direito acima da cadeia dupla. A sequência de péptido correspondente da forma mais importante é nomeada começando na extremidade aminoterminal (Ser). Os sítios da restrição com ClaI e BamI estão indicados acima da cadeia dupla. O sítio de TaqI criado por

Wifama

substituição de C pelo A no codão arginina é também representado.

Figura 14: Vector de Expressão p(NAF)-6T3

A^R = Gene resistente à ampicilina

Trp P/O = Promotor triptofano

T = terminador sintético de transcrição

Figura 15: Identificação do NAF natural e do recombinado:

Gráficos Superiores: Trocas de Ca²⁺ citosólico livre induzidas por NAF natural (esquerda) e recombinante (direita). Os neutrófilos (4 X 10⁶ células/ml) são carregados com quin-2/AM 0,1 nmolar e então estimulados com NAF (marcado) 3 nM. As trocas de saturação de quin-2 são calibradas como é descrito em V. Von Tscharner et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 10163-10168.

Gráficos inferiores: Eclosão respiratória induzida por NAF natural (esquerda) e NAF recombinante (direita). Os neutrófilos (10⁶ células/ml) são estimulados com NAF 3,10 e 30 nM no início da contagem dos tempos (t=0) e a produção de peróxido de hidrogénio é medida por quimioluminescência (M.P. Wyman et al., Anal. Biochem. 165 (1987) 371-378).

Figura 16: Derrame de plasma em zonas da pele

A seguir à injeção intradérmica de NAF ou de endotoxina;

Duração: 4 horas;

Média $\pm$ erros padrão da resposta média de 3 coelhos.

Wifama

Figura 17: Acumulação de neutrófilos em zonas da pele

Medido simultaneamente com as respostas representadas na Figura 16.

Figura 18: Efeito da Polimixina B na acumulação de neutrófilos:

A seguir à injeção intradérmica de NAF (10^{-9} moles/zona), fMLP (10^{-9} moles/zona) ou endotoxina (10^{-13} moles/zona);

duração: 2 horas;

Média $\pm$ erros padrão da resposta média de 3 coelhos.

5. EXEMPLOS

Os exemplos seguintes ilustram a invenção. Todas as temperaturas estão em graus centígrados expressas. Usam-se as seguintes abreviações:

PHA: Fito-hemaglotinina

ConA. Concanavalina

LPS: Lipopolissacárido de E. Coli

BSA: Albumina de soro de bovino

fMLP: N-Formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina

PAF 1-O-Hexadecil-2-O-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina
(factor activador de plaquetas)

MEM: Meio essencial mínimo de Eagle (Seromed GmbH, Munique, FRG), suplementado com 25 μ g/ml de neomicina, tamponizado a pH 7,4 com NaHCO_3 25 mM e HEPES 20mM.

Wifama

19

MEM-PPL:	Como o anterior, contendo em adição uma solução de proteínas de plasma pasteurizada (5% PPL-SRK, Swiss Red Cross Laboratory, Berna, Suíça) e 100 UI/ml de penicilina e estreptomicina (Gibco A.G., Basle, Suíça);
PBS:	Solução salina com tampão de fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM NaH_2PO_4 e 1,5 mM KH_2PO_4 , ajustado a pH 7,4)
PBS-BSA:	PBS complementado com 0,9 mM CaCl_2 , 0,49 mM MgCl_2 e 2,5 mg/ml BSA.
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico
PPL-SRK:	Solução de proteínas plasmáticas (Swiss Red Cross)
NAF:	Factor ou proteína de activação de neutrófilos
CX:	Ciclo-heximida
IL-1:	Interleucina-1
SOD:	Superóxido
C5a:	Anafilatoxina
CPG:	Vidro de poros controlados
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
GM-CSF:	Factor estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos
CB:	Citocalasina B (5 µg/ml)
MES:	Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico
HPLC:	Cromatografia em fase líquida sob alta pressão
SDS:	Dodecil-sulfato de sódio

Wifama

PARTE I: Produção de NAF por Monócitos Humanos

Exemplo 1: Produção de NAF por monócitos humanos estimulados com LPS

Os monócitos humanos são isolados a partir de camadas cor de couro de sangue de doadores (Swiss Red Cross Laboratory Berna, Suíça) por centrifugação através de um gradiente de Ficoll-Paque. Este método separa os neutrófilos das assim denominadas células mononucleares, uma mistura de monócitos (cerca de 20%) e linfócitos (cerca de 80%). São usadas três preparações de monócitos: (i) a fracção total de células mononucleares, (ii) monócitos enriquecidos a partir da fracção de células mononucleares por aderência, e (iii) 90% de monócitos puros separados a partir de linfócitos por elutrição centrífuga (G. Garotta et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. **140** (1986) 948-954 e K.J. Clementson et al., J. Exp. Med. **161** (1985) 972-983).

As células são cultivadas em MEM-PPL e estimuladas com concentrações crescentes (0,1 ng a 1 µg/ml) de LPS. Em tempos diferentes, alíquotas de meios de cultura são retiradas como amostras e nelas determina-se a actividade do NAF como a capacidade de induzir a libertação de elastase a partir de monócitos humanos pré-tratados com citocalasina B (B. Dewald et al., Biochem. Pharmacol. **36** (1987) 2505-2510).

Culturas de células mononucleares compreendendo monócitos e linfócitos numa proporção de 1:5 produzem NAF quando estimuladas com LPS (100 mg/ml). NAF acumula-se no meio durante 24 horas e os níveis de produção estacionam entre as 24 e as 48 horas. O NAF não se forma em ausência de estímulos. A Figura 1 representa a evolução com o tempo e a dependência em relação com a concentração dos efeitos de LPS o qual é já activo entre 0,1 ng/ml e 1 ng/ml.

A origem do NAF é estudada usando diferentes preparações de células mononucleares. A Figura 2a representa geração de NAF dependente de LPS pela fracção total de células mononucleares e os monócitos selec-

Wifana

cionados a partir dela por aderência. Estes resultados confirmam que a produção de NAF depende de LPS e indica que o NAF é produzido pelos monócitos. A presença de linfócitos não parece influenciar a quantidade de NAF produzida. São obtidos resultados semelhantes com monócitos e linfócitos purificados por elutriação. Como se mostra na Figura 2b, O NAF é produzido por monócitos mas não por linfócitos.

Exemplo 2: Produção de NAF por monócitos humanos estimulados com PHA ou ConA

A fracção de células mononucleares obtida a partir de camada cor de couro de sangue humano, separada como foi descrito no Exemplo 1, são cultivadas nas condições referidas no Exemplo 1, e estimuladas com PHA (5 μ g/ml) ou ConA (10 μ g/ml). A variação com o tempo da produção de NAF é semelhante às observadas com células mononucleares estimuladas com 100 ng/ml de LPS. Um máximo é obtido após cerca de 24 horas.

Exemplo 3: Inibição da produção do NAF pela Ciclo-heximida

O facto de o NAF não ser libertado imediatamente após estimulação dos monócitos, mas sim num intervalo de tempo de horas, dependendo da concentração do estímulo, sugere que é referida uma nova síntese de proteínas e que a produção do NAF é realmente induzida pelo estímulo. O requisito da síntese das proteínas é demonstrado por experiências nas quais a produção de NAF é inibida pela adição da ciclo-heximida. Os resultados de uma experiência representativa é apresentado na Tabela 1.



Tabela I

Inibição da produção de NAF pela cicloheximida

Tratamento	Produção média de NAF após		
	4h	8h	24h
(nenhum)	0	0	0
LPS	726	2042	2633
LPS+CX	0	0	0
LPS+CX at 4h	774	966	639
LPS+CX at 8h	752	1884	1854

A cicloeximida (CX, 10 μ g/ml) é adicionada 4 ou 8 horas após LPS (100 ng/ml). A actividade é apresentada em unidades de fluorescência, expresando a libertação de elastase.

PARTE II Purificação do NAF

Exemplo 4: Separação de NAF e IL-1 por cromatografia em fosfocelulose

As células mononucleares obtidas a partir de camadas cor de couro de sangue de doadores como se descreveu no Exemplo 1 são cultivadas em MEM-PPL durante 48 horas em presença de 100 ng/ml de LPS em frascos de cultura por agitador (1,5 litros 5×10^6 células/ml). Os sobrenadantes da cultura são então colectados, centrifugados a 20000 rpm durante 20 minutos a 4° no sentido de remover as partículas e são

Wifama

então carregados numa coluna de fosfocelulose (Whatman P11, 1,4 x 6 cm) equilibrada com uma solução de tampão de fosfato de potássio 20 mM, pH 7,2 compreendendo NaCl 20mM e glicerol 5%. A coluna é lavada com 30 ml de um gradiente de concentração de NaCl linear (0,02 M a 1,5 M) no mesmo tampão. Colectam-se fracções de 2 ml em polietilenoglicol a 0,1% e a actividade do NAF e de IL-1 ensaiada. A absorvância a 280 nm é monitorizada como uma medida de proteína.

A Figura 3 representa os perfis de distribuição de proteínas (absorvância a 280 nm) e duas actividades biológicas, a libertação de elastase como uma medida da actividade de NAF e a proliferação de timócitos como uma medida de actividade de IL-1. A maior da proteína bem como a actividade do IL-1 são recuperadas a partir do volume da corrente que a atravessou. A eluição com um gradiente linear de NaCl origina uma pequena actividade a baixa força iónica seguida de um pico de actividade de libertação de elastase correspondente ao NAF, o qual inicia a eluição a 0,5 M e atinge o seu máximo a NaCl 0,8 M. O pico é simétrico e é procedido por um pequeno patamar. Algum material absorvente de UV é eluído pelo gradiente salino; o seu perfil, no entanto, não coincide com as actividades biológicas determinadas. Como se indica na Figura 3, IL-1 e NAF podem ser completamente separados. Não ha actividade de libertação de elastase associada com IL-1 nem actividade de indução de proliferação de timócitos associada com NAF. A recuperação do NAF por fraccionamento é praticamente 100%, sugerindo que o meio não contém inibidores nem activadores.

Exemplo 5 Purificação do NAF por filtração através de gel

Uma amostra de 200 μ l de NAF parcialmente purificado por cromatografia em fosfocelulose (Exemplo 4) é aplicada a uma coluna HPLC TSK -G 2000 SW (7,5 x 600 mm) com uma pré coluna TSK-GSWP (75 x 75 mm). A coluna é percorrida por NaHPO_4 100 mM, pH 7,0 compreendendo NaCl 100 mM, à taxa de 0,5 ml/minuto. Como padrões de calibração usam-se albumina de



soro de bovino (peso molecular 66200), ovalbumina (peso molecular 42700), inibidor tripsina de soja (peso molecular 21500), aprotinina (peso molecular 6500) e actinomicina D (peso molecular 1255). O NAF é eluído com um pico levemente assimétrico logo após a aprotinina, e bem acima da actinomicina D. O peso molecular aparente do NAF é portanto aproximadamente 6500. Nenhuma actividade relativa ao NAF é eluída antes ou depois do pico descrito. (Fig. 4).

Exemplo 6: Purificação do NAF por hidroxilapatite

Um conjunto de fracções obtidas a partir de cromatografia em fosfoceleulose (Exemplo 4) com um volume total de 15 ml (correspondendo a aproximadamente 800 ml da cultura sobrenante não fraccionada) é diluída de 1:10 com uma solução tampão (fosfato de sódio 10 mM, pH 6,9 em polietileno-glicol 6000 0,1%) e carregada numa coluna com 3 ml de hidroxilapatite (Biogel HTP) equilibrado no tampão. A coluna é lavada com 3 x 3 ml do tampão do carregamento e em seguida eluída com tampão de carregamento suplementado com NaCl 1M. Através desta técnica o NAF é recuperado a partir da coluna. A subsequente eluição com o tampão de fosfato de sódio 0,5 M, pH 6,9 não origina qualquer actividade posterior de NAF (Fig. 5).

Exemplo 7: Purificação do NAF heparina-sefarose

Uma amostra de 1 ml de NAF parcialmente purificado por cromatografia com fosfoceleulose (Exemplo 4) é carregada numa coluna de 0,5 ml de heparina-sefarose 4B equilibrada em fosfato de sódio 10 mM, pH 7,3 suplementado com 0,1% de polietilenoglicol 6000 e NaCl 50 mM. A coluna é lavada com o mesmo tampão e então eluída com fosfato de sódio 10 mM, pH 7,3 suplementado com NaCl 1,5 M. Uma quantidade mínima de NAF é detectada no fluido que passa através da coluna depois da lavagem, mas a maior parte da actividade ligada à coluna é eluída com o

Wifama

tampão de maior força iónica (Fig. 6).

Exemplo 8: Purificação do NAF por cromatografia em fase líquida a alta pressão em fase inversa

Uma amostra de NAF purificado por cromatografia em fosfocelulose (Exemplo 4) seguida de purificação com hidroxilapatite (Exemplo 6) é aplicada numa coluna C_4 de fase inversa de poros largos (Biorad RP 304). A coluna é eluída com um gradiente de acetonitrilo de 0 a 80%, em ácido trifluoracético 0,1% com um aumento de 0,66% minuto. O caudal de passagem é de 0,5 ml/minuto. As fracções são recolhidas e secas sob vácuo. Os resíduos são re-suspensos em 100 μ l de PBS compreendendo polietileno-glicol 6000 0,1 % e é analisada a actividade do NAF. O NAF é eluído com um tempo de retenção de cerca de 60 minutos, correspondendo aproximadamente a acetonitrilo 40%, como um único pico agudo bem definido (Figura 7).

Exemplo 9: Purificação do NAF por cromatografia em fase líquida a alta pressão com inversão de fase numa coluna CN - propilo

Uma amostra de NAF purificado por cromatografia com inversão de fase como foi descrito no Exemplo 8, seca sob vácuo e re-suspensa em 100 μ l de PBS contendo polietileno-glicol 0,1% é diluída com um volume de ácido trifluoracético 0,1% e aplicada numa coluna Bakerbond de ciano (CN)-propilo de poros largos (Baker Research Products, Phillipsburg, NJ, USA). A coluna é eluída com um gradiente que se prolonga de 0 a 50% de n- propanol em ácido trifluoracético 0,1% com um aumento de 0,41%/minuto. O caudal de passagem é de 0,5 ml/minuto. As fracções são recolhidas e secas sob vácuo. Os resíduos são re-suspensos em 100 μ l de solução salina com tampão de fosfato compreendendo 0,1 % de polietileno-glicol 6000 e é analisada a actividade do NAF. O NAF é eluído em dois picos bem definidos, um maior com um tempo de retenção

de 53 minutos, correspondendo a 22% de n-propanol, e um menor responsável por menos de 30% de actividade total, com um tempo de retenção de 66 minutos, correspondendo a 27,5% de n-propanol (Fig. 8).

Exemplo 10: Cromatofocagem do NAF

Uma amostra de 4 ml de NAF parcialmente purificado por cromatografia em fosfocelulose (Exemplo 4) é submetida a diálise contra um tampão inicial constituído por: etanolamina - HCl 25 mM, pH 9,4 e 0,1 % de polietileno-glicol 6000, e é carregada numa coluna PBE 94 (0,7 x 19 cm, Pharmacia) equilibrada com o mesmo tampão. A coluna é então eluída com 200 ml do politampão 96 - HCl (diluído 1:10 em água), pH 7,0 compreendendo polietileno-glicol 0,1%. São recolhidas fracções com tempos de eluição de 10 minutos a um caudal de 10-14 ml/h e ensaiadas para a actividade do NAF. A maior parte da actividade é eluída na região de pH 8,8 (Figura 9).

PARTE LLL: Caracterização Biológica e Físico-química do NAF

Exemplo 11: Propriedades físico-químicas do NAF

O NAF parcialmente purificado obtido por cromatografia fosfocelulose (Exemplo 4) é usado nestas experiências.

Após a cromatografia em fosfocelulose, as fracções com a mais elevada actividade de NAF são submetida a diálise durante o período nocturno a 4° C contra PBS usando-se para tal uma membrana com o corte de peso molecular de cerca de 100 dalton.

A preparação obtida é então objecto dos seguintes tratamentos:

a) Incubação a 37° C com ou sem tripsina, quimotripsina ou proteinase K (100 µg/ml) seguida de adição de um excesso de BSA (2 mg/ml) para

Wifama

interromper a proteólise do NAF;

b) Aquecimento a 56°C, 80°C ou 95°C (em comparação com 22° C para controle);

c) Exposição a pH 2 ou 10 (a 22°) seguido de ajustamento a pH 7,4 (em comparação com pH 7,4 para controle);

d) Exposição a cloreto de lítio 2M, cloreto de guanidínio 6M, 2 mercaptoetanol a 1% ou dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,5 % durante 3 h a 22°, seguida de diálise durante 24 horas a 4° contra PBS. Após as adições, as amostras de NAF são tratadas da mesma forma e testadas para observação da possível influência sobre o ensaio de NAF.

Como se conclui a partir dos resultados apresentados na Tabela 2, o NAF é notoriamente resistente à inativação. A sua actividade é destruída após incubação com diferentes proteases, indicando que o NAF é um polipéptido como contraste, o NAF é facilmente inativado por aquecimento, condições de pH ácido ou alcalino, nem por exposição a SDS. E obtida alguma inativação com 2-mercaptoetanol, cloreto de guanidínio e cloreto de lítio.

Tabela 2.

Wifana

Tabela 2

Propriedades Fisicoquímicas do NAF

Tratamento	Condições	actividade re- lativa
Temperaturas	22°, 3h	100
	56°, 1h	82
	80°, 15 min	80
	95, 5 min	66
pH 2,0	22°, 3 h	76
pH 10,0	22° 3 h	90
SDS 0,5 %	22°, 3 h	100
2-mercaptoetanol 1,0%	22°, 3 h	30
Cloreto de lítio 2 M	22°, 3 h	52
Cloreto de guanidínio 6 M	22°, 3 h	68
Tripsina 100 µg/ml	37°, 4 h	100
	37°, 12 h	8
α-chimotripsina 100 µg/ml	37°, 4 h	80
	37°, 12 h	1
Proteinase K 100 µg/ml	37°, 12 h	0



Exemplo 12: Exocitose induzida por NAF (indução da libertação de
- grânulos pelo NAF de neutrófilos humanos)

Neutrófilos (5×10^6 /ml) em suspensão em PBS/BSA são pré-incubadas com ou sem citocalasina B (5 g/ml) a 37° durante 5 minutos.

A libertação de grânulos é então iniciada por adição de estímulo, por exemplo, NAF ou um estímulo padrão. A reação é interrompida após quinze minutos por rápido arrefecimento em gelo seguida de centrifugação para sedimentar as células. Determina-se o teor em vitamina B 12 - proteína ligante. β glucuramidase e lactato dehidrogenase no meio isento de células e nas peletes celulares, e a libertação destes constituintes é calculada em percentagem do conteúdo total celular (B. Dewalt e M. Baggiolini, Methods Enzymol. 132 - 1986 - 267).

Os efeitos do NAF sobre a libertação da vitamina B 12 - proteína ligante e β -glucuronidase - os quais são constituintes dos grânulos específicos e azurofílicos, respectivamente - estão sumarizados na Tabela 3:

Wifama

30

Tabela 3

Exocitose dependente de estímulo do conteúdo de grânulos pelos neutrófilos humanos

Estímulos		Percentagem de libertação de			
		CB	Vit. B12- proteína ligante	β -glucuronidase	dehidrogenase láctea
nenhum		-	6,0 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 2,5
NAF	50 ul	-	12,9 $\pm$ 1,6	2,7 $\pm$ 1,3	5,8 $\pm$ 0,7
NAF	100 ul	-	13,9 $\pm$ 2,1	3,0 $\pm$ 1,3	6,8 $\pm$ 2,2
FMLP	0,1uM	-	14,0 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 0,8	5,7 $\pm$ 1,1
Nenhum		+	10,0 $\pm$ 1,1	2,4 $\pm$ 0,2	7,0 $\pm$ 3,2
NAF	50 ul	+	25,6 $\pm$ 3,4	7,9 $\pm$ 2,0	6,7 $\pm$ 1,6
NAF	100 ul	+	26,8 $\pm$ 4,9	8,5 $\pm$ 1,7	7,3 $\pm$ 2,1
FMLP	0,1 uM	+	35,6 $\pm$ 5,5	12,1 $\pm$ 4,4	5,3 $\pm$ 1,6
valores médios $\pm$ desvio padrão					

Wifama

Em neutrófilos normais, O NAF induz apenas a exocitose de grânulos específicos. Quando as células são pré tratadas com citocalasina B, no entanto, é obtida uma intensa libertação dos dois tipos de grânulos. Sob as últimas condições, a libertação de β -glucuronidase é análoga à causada pela elastase, o marcador usado para ensaiar a actividade do NAF (Exemplo 1). Em termos quantitativos, as propriedades indutoras de exocitose do NAF são similares às do péptido quimidáctico fMLP. Nenhum estímulo induz a libertação da enzima citosolica lactato-desidrogenase, indicando que o prejuízo celular é desprezível.

Exemplo 13 : Eclosão respiratória induzida por NAF (indução da formação de superóxido pelo NAF de neutrófilos humanos).

A formação de superóxido é medida a 37° como a redução sensível SOD do ferricitocromo C (M. Market e al., Methods Enzymol. 132 - 1984 - 267). A mistura de ensaio (800 μ l) consiste em $0,75 \times 10^6$ células/ml de PBS - BSA contendo citocromo c 85 μ M. As alterações de absorvâncias são registadas num espectrofotómetro com uma série de díodos Hewlett-Pachrad 8 451A equipado com uma covete de permuta de 7 lugares termostatzada. A Tabela 4 documenta a capacidade do NAF em elicitar a eclosão respiratória em neutrófilos humanos.

Wifan

Tabela 4

Produção de superóxido dependente do NAF pelos neutrófilos humanos

Redução de citocromo C

NAF (μ l)	Taxa máxima (nmol/min)	Total em 3 minutos (nmol)
5	0, 81	0,89
10	1, 45 $\pm$ 0,63	1,45 $\pm$ 0,50
20	2, 32 $\pm$ 0,56	2,16 $\pm$ 0,39
30	2, 51 $\pm$ 0,55	2,30 $\pm$ 0,55
50	3, 51 $\pm$ 0,69	3,10 $\pm$ 0,55
100	3, 69	3,69

+ todos os valores são expressos por 10^6 células
Valores médios $\pm$ desvio padrão

É obtido um aumento gradual da taxa máxima e da quantidade total de formação de superóxido com o aumento da quantidade do NAF. Tal como se pode mostrar por experiências comparativas, as quantidades de NAF originadoras de níveis máximos de produção de superóxido correspondem às de indução máxima de exocitose.

Wifana

Exemplo 14: Formação de H_2O_2 (comparação com fMLP e C5a como estímulos de eclosão respiratória em neutrófilos humanos)

As propriedades do NAF, fMLP e C5a com estímulos da eclosão respiratória são comparadas determinando a produção de superóxido ou de peróxido de hidrogénio pelas células estimuladas. A formação do superóxido é determinada da forma referida no Exemplo 13. A formação do peróxido de hidrogénio é determinada por quimioluminescência (M. P. Wymann e al., Anal. Biochem. 165 - 1987 - 371/378). A mistura a ensaiar consiste em PBS-BSA compreendendo azida de sódio 0,1 M, luminol 0,01 mM, peroxidase de rábano silvestre 9 U/ml e 10^6 neutrófilos e é pré-incubada durante 10 minutos a 37° , a reacção é iniciada pela adição do estímulo usando uma microseringa.

A Figura 10 representa a formação de superóxido induzida por quantidades crescentes de NAF. Devido ao seu rápido começo, à sua elevada velocidade e prematuro nível, a resposta ao NAF parece-se muito com a provocada fMLP ou C5a. A resposta a NAF é acentuadamente intensificada por pré-tratamento das células com PAF (Figura 10) que também intensifica a produção de superóxido provocada por fMLP ou C5a. Uma comparação directa das respostas a NAF, fMLP e C5a é apresentada na Figura 9. Os registos de quimioluminescência da velocidade de formação de H_2O_2 em função do tempo realçam a similaridade das respostas. Estas medidas, bem como outras, mostram ainda que os tempos entre a adição do estímulo e o começo da produção de H_2O_2 induzida pelo NAF, fMLP e C5a são idênticos e elevam-se a cerca de 2 segundos, como previamente se registou para fMLP, C5a, PAF e leucotrieno B4 (M.P. Wymann e al. J. Biol. Chem. 262 - 1987 - 12 048). A semelhança quantitativa e qualitativa de resposta dos neutrófilos a NAF, a fMLP e a C5a indica que o NAF activa os neutrófilos ligando-se a um receptor superficial e comporta-se então como um receptor agonista.

Wifama

Exemplo 15: Discriminação entre NAF e C5a

Tal como se referiu no Exemplo 14, o perfil de actividade do NAF em relação aos neutrófilos humanos é similar ao da de C5a. As similaridades entre estes dois péptidos estendem-se às propriedades físico-químicas que os distinguem tal como a resistência ao calor e à acidez.

Considerando que C5a e o NAF têm efeitos semelhantes sobre os neutrófilos, devem realizar-se experiências posteriores no sentido de obter uma total discriminação entre estes dois factores. Expõem-se amostras de NAF e de C5a a soro humano fresco. Este tratamento sabe-se que transforma C5a no seu derivado desarginilado reactivamente inactivo por clivagem por meio de uma carboxipeptidase. Como se mostra na Figura 11, o tratamento com o soro elimina completamente a actividade do C5a, não afectando no entanto a actividade do NAF, demonstrando pois que estes dois agentes são estruturalmente diferentes

Exemplo 16: Evidência de que NAF tem o seu receptor específico nos neutrófilos

Quando neutrófilos são estimulados duas vezes com a mesma quantidade do mesmo receptor agonista (por exemplo, fMLP) e a produção de superóxido é registada como medida de resposta dos neutrófilos, a segunda estimulação é virtualmente inactiva. Por outro lado, quando se usam agonistas que actuam sobre diferentes receptores em sequência (por exemplo, fMLP seguido de C5a) estas estimulações originam uma resposta normal. Experiências deste tipo são portanto usadas no sentido de se verificar se o NAF actua por meio de um seu próprio receptor ou por meio de um receptor também usado por outros agonistas.

A Figura 12a mostra que os neutrófilos respondem normalmente a fMLP a seguir a primeiro tratamento NAF ou C5a. Na Figura 12b são representados os resultados de repetidas estimulações com NAF e C5a a concentrações que originam a formação de aproximadamente a mesma quanti-

Wifama

—dade de superóxido e depois uma segunda vez com o mesmo estímulo ou com estímulos alternados. Quando o mesmo agonista é aplicado pela segunda vez, as células não respondem à segunda estimulação. Pelo contrário, obtém-se uma resposta normal a C5a em células estimuladas primeiro com NAF e ao NAF em células primeiramente estimuladas com C5a. Como os neutrófilos mostram uma completa des-sensibilização a qualquer dos estímulos mas não des-sensibilização cruzada, o NAF e o C5a parecem exercer os seus efeitos estimulatórios por intermédio de receptores não relacionados, indicando que são estruturalmente diferentes. As combinações de NAF com PAF, fMLP e leucotrieno B₄ também não apresentam des-sensibilização cruzada. NAF actua, portanto, através de um receptor selectivo até agora desconhecido.

Exemplo 17: Acumulação de neutrófilos e derrame de plasma induzido pelo

NAF em coelhos

São examinadas respostas inflamatórias na pele de coelhos albinos New Zeland conscientes de 2,0 a 2,5 kg. Sedimentam-se os eritrócitos do sangue dos coelhos dadores com hidroxietil celulose (Polysciences, Warrington, Pa.) e purificam-se os neutrófilos no plasma resultante rico em leucócitos (>94% de neutrófilos) por centrifugação com gradiente de densidade em Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden). As células são re-suspensas em solução de Tyrod isenta de Ca²⁺ e Mg²⁺ compreendendo 10% de plasma pobre em plaquetas, até se obter uma concentração de 10⁶ leucócitos/ml e marcam-se durante 15 minutos à temperatura ambiente com μ Ci de ¹¹¹índio-oxina (amersham) 10⁶ células. As células marcadas são então lavadas por centrifugação com plasma pobre em plaquetas a 10% e misturam-se aproximadamente 10⁶ células por recipiente com albumina de soro humano (Amersham) com 10 μ Ci de ¹²⁵iodo e é injectado intravenosamente através da veia lateral da orelha dos coelhos com lesões inflamatórias em estudo. Fazem-se então injeção intradermais de agente inflamatórios e os animais são mortos duas horas após nos estudos com actinomicina D e polixina B, 4h depois em experiencias de res-

— posta à dose. A meio do período em que as células radio-identificadas estão em circulação, uma amostra de sangue é recolhida e são determinadas as actividades específicas dos neutrófilos e do plasma no sangue. É determinada ao fim de cada experiência a radioactividade nas lesões inflamatórias com um contador gamma de canais múltiplos, a actividade nos pontos de controlo da pele é subtraída e é calculado o número absoluto de neutrófilos e o volume de plasma acumulados nas lesões inflamatórias a partir das actividades específicas. O número de neutrófilos em lesões inflamatórias são padronizadas entre animais exprimindo os resultados como número de células/ 10^6 neutrófilos que circulam/ ml de sangue periférico, de acordo com o método de Cybulky e al., Am. J. Pathol. 124 - 1986 - 367.

O NAF recombinante obtido como se descreve no Exemplo 19, é dissolvido a $400 \mu\text{g/ml}$ em meio essencial mínimo (50mM) com 0,45 M de NaCl (ph 6,5). A endotoxina (E. Coli sorotipo O55:BS, Sigma, St. Louis, Mo.) é dissolvida numa solução salina normal isenta de pirogenes fMLP é dissolvido em dimetil a 10^{-2} M e diluído para concentrações de trabalho em PFS. Polimixina B e actinomicina D são dissolvidas em 1 ml de etanol e diluída a 20 vezes por mistura com NAF, endotoxina ou fMLP em PFS. Em estudos sobre a inibição de respostas inflamatórias são injectadas $40 \mu\text{g}$ de polimixina B e 10^{-7} moles de actinomicina D por zona de pele com 10^{-6} moles de endotoxina. Em todas as experiências são injectadas intradermicamente por zona através de agulhas do tamanho 26, com 5 réplicas de cada tratamento em cada animal.

O NAF induz um derrame do plasma dependente da dose (Figura 16) e acumulação de neutrófilos (Figura 17) no intervalo de doses testadas (10^{-11} a 10^{-9} moles por zona). Em comparação a endotoxina causa o derrame do plasma (figura 16) e a acumulação neutrófila (Figura 17) de intensidade 10^{-13} moles por zona. Em cinco coelhos o NAF é 3 a 10 vezes mais potente do que fMLP como estímulo para o derrame do plasma e a acumulação de neutrófilos. A acumulação de neutrófilos induzida por diluição do tampão usado para dissolver o NAF até à concentração presente nas soluções originando 10^{-9} moles por zona, não difere das

Wifama

respostas nas zonas que recebem somente PFS. A possibilidade de que a actividade da preparação de NAF possa ser devida a um contaminante de endotoxina é examinada por injeção de polimixina B ($40 \mu\text{g}/\text{zona}$) juntamente com NAF, fMLP ou endotoxina. A polimixina B causa 84% da inibição da resposta à endotoxina (10^{-13} moles) mas não afecta a acumulação de neutrófilos induzida por NAF (10^{-9} moles) ou fMLP (10^{-9} moles) (Figura 18). A injeção de um inibidor não-reversível da transcrição do RNA, actinomicina D (10^{-7} moles/zona) conjuntamente com 10^{-13} moles de endotoxina causa 90% de inibição dos neutrófilos (figura 19). Em contraste, a actinomicina D produz efeito sobre a acumulação de neutrófilos induzida pelo NAF (10^{-9} moles) (figura 19).

Os resultados mostram que o NAF é activo e induz a acumulação de neutrófilos dependendo da dose e o derrame do plasma em lesões inflamatórias. A potência molar do NAF é comparável à quimiotáctica clássica C5a e LTB_4 e 3 a 5 mais elevada do que fMLP. A acumulação de neutrófilos induzida pelo NAF não é inibida pela injeção intradérmica simultânea de um inibidor de síntese das proteínas (actinomicina D). Assim, NAF actua directamente, como um agonista quimiotáctica tal como fMLP e não como endotoxina.

Exemplo 18: Exocitose induzida por NAF (efeitos sobre os neutrófilos de coelhos)

Isolam-se neutrófilos de coelhos a partir de sangue periférico (obtido na veia ou na artéria do ouvido por sedimentação com dextrano seguida pela centrifugação com gradiente de densidade Hypaque-Ficoll. Usa-se NAF natural purificado.

Condições de exocitose: $0,6 \times 10^6$ células (num volume total de $0,15 \text{ ml}$) pré tratadas com titocalasina B durante 5 minutos a 37° , são estimuladas com NAF ($0,1 - 100 \text{ nM}$) ou fMLP (100 nM) durante 15 minutos. Determina-se a N - acetil - β - glucosaminidase um marcador granular azurófilo, no meio isento de células. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Wifanna

38

Tabela 5

Exocitose induzida por NAF

Estímulo	Concentração (nM)	N-aceti-B-glucosaminidase (pmol/min)
(nenhum)		41
NAF	0,1	53
	1,0	99
	10,0	139
	100,0	157
fMLP	100,0	181

PARTE IV: NAF Recombinante

Exemplo 19: Síntese e expressão do NAF em E. Coli.

a) Síntese e purificação de oligonúcleotídeos

Os oligonucleótidos ON- 1 a ON-6 (ver Figura 13) são sintetizados num sintetizador automático de DNA usando os métodos químicos usuais, com 3' - β - cianoetil - N,N - diisopropilfosfoamidina nucleósidos como monômeros , num suporte sólido tal como gel de sílica Fractosil ou vidro poroso controlado (CPG) (S. L. Beaucage e M.H. Caruthers, Tetr. Letters 22 - [1981] - 1859; N. D. Sinha e al., Nucleic Acids Res. 12

-[1984]- 4539).

Os materiais destritilados são separados a partir do suporte por um tratamento de duas horas com amónia a 25% à temperatura ambiente todos os grupos protectores são eliminados por aquecimento da solução amoniacal durante 20 horas a 55 graus centígrados e os produtos são liofilizados.

A separação das matérias primas é efectuada por electroferese em gel de poliacrilamida (PAGE) com acrilamida 12%, bisacrilamida 0,3%, ureia 7M, tris-borato 0,089 M, ácido bórico 0,089 M₂, EDTA 0,002M à 20V/cm. Oligonucleótidos de comprimento inteiro são localizados por sombra de UV em placas de gel de sílica fluorescente; as porções de gel são cortadas e electroeluídas numa câmara de eluição. As soluções concentradas são des-salinizadas numa coluna de Biogel P2 (30 x 0,9 cm) por eluição com etanol a 10% e liofilizadas.

Amostras de ON-1 a ON-6 são marcadas radioactivamente com ³²P-γ-ATP e polinucleótidos quinase. Análises por PAGE autorradiografia confirmam que estes são homogêneos. As sequências correctas são confirmadas por sequenciamento de Maxam-Gilbert dos oligonucleótidos imobilizados num papel de filtro modificado (A. Rosen-thal et al., Nucleic Acids Res. 13 - [1985]- 1173-1184).

b) Recozimento e ligação

A fim de recozer e ligar, porções de 250 pmoles de oligonucleótidos são fosforilados com 4 μCi de ³²P-ATP (5000 μCi/mmol) e 9 unidades de polinucleótido-quinase em 20 μl de tampão de quinase (T. Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1982), Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.) durante 40 minutos a 37°, seguido por um tratamento durante 20 minutos com 5 mmoles de ATP não marcado. A reacção é interrompida com 1 μl de EDTA 0,5 M a 70°. Os oligonucleótidos são purificados por absorção em cartuchos NENSORB 20 (Du Pont) e eluição com etanol a 20% e o rendimento é aproximadamente 90%. 0

Wifama

recozimento a ligação simultâneos de iguais quantidades de 30 a 100 pmoles de ON-2 a ON-5 5'-fosforilado e ON-1 e ON-6 não fosforilados são feitos em 25 μ l de tampão (Tris-HCl 125 mM, pH 7,6) compreendendo $MgCl_2$ 25 mM. A mistura é aquecida durante 4 minutos a 90°, arrefecida a 14° em 3 horas e incubado durante mais 14 horas a 14°. O volume é ajustado a 60 μ l com Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 $MgCl_2$ 10 mM ditiotretol 10 mM, ATP 1 mM, 0,1 mg/ml de albumina de soro de bovino contendo 1600 a 2600 unidades de T4-ligase. A ligação é levada a cabo durante 14 horas a 14° e interrompida pela adição de 1 μ l de EDTA 0,5M e aquecimento a 70°. Após a extração com fenol, a solução aquosa é levada a acetato de sódio 0,3 M e acetato de magnésio 0,01 M, o ADN é precipitado com etanol e os produtos são purificados por PAGE (8% acrilamida, ureia 7 M) com uma carga máxima de 10 pmoles de ADN por uma ranhura de 1,5 cm em camadas de gel com a espessura de 0,5 mm. O produto de comprimento correcto é identificado por autorradiografia, o segmento do gel cortado e o ADN é electroeluído durante 6 horas a 200V em Bio-trap BT100 e precipitado com etanol, originando um rendimento final de 5 a 8 pmoles de ADN de dupla-camada purificado por 100 pmoles de oligonucleótidos.

c) Clones de genes sintéticos

Uma amostra de 110 ng de gene de NAF sintético isolado é ligado com 260 ng de plasmídeo de DNA pBS com SphI/BamHI-corte purificado em gel de agarose (Stratagene). Um décimo desta mistura de ligação é usada para transformar 200 μ l de células da espécie *E. Coli* estirpe 5K tornada competente pelo método de D. Hanahan, J. Mol. Biol. 166 (1983) 557-580, e aproximadamente 320 colónias resistentes à ampicilina são produzidas por ng de ADN introduzido. Seis clones são picados e desenvolvem-se durante a noite em caldo/ampicilina. O plasmídeo de ADN é preparado (H.C. Birnboim e J. Doly, Nucleic Acids Res. 7 (1979) 1513-1523) e experimentado em gel de agarose a 1%. O ADN puro superhélice é isolado por electroferese das bandas em papel 3 MM (Whatman) e centrifugado em tubos de Eppendorf. Depois da extração com fenol e a

Wifana

precipitação com etanol, o DNA é sequenciado pelo método de terminação de cadeias de plásmidos desnaturados com alcalis usando os iniciadores T3 e T7 (Stratgene) e a enzima sequenase (E.J. Chen et al., DNA 4 (1985) 165-170).

Dos seis clones, três, isto é, clones 1, 2 e 6, continham a sequência de NAF correcta. Os outros três clones tinham erros: o clone 3 tinha um resíduo G extra inserido após o codão de iniciação ATG, pelo que a sequência de código completa fica posta fora da fase. No clone 5, C é substituído por T na posição 34, pelo que se forma um código de interrupção após o aminoácido Nº 6. Finalmente, no clone 4 falta um G na posição 13. Esta posição não está na sequência do código mas na região entre o codão de iniciação e o sítio de ligação do ribossoma.

O plasmídeo contém a sequência correcta (Clone 6) é cortado com enzimas de restrição ClaI e BamHI e o fragmento de 237 pares de bases é isolado a partir de um gel de agarose por eluição para um papel 3MM como acima se descreve. Este fragmento é então ligado a um fragmento de DNA linear que contém, da esquerda para a direita:

- um sítio de endonuclease de restrição BamHI;
- um terminador de transcrição sintético (CCGGGCGGATGAATCGCCCGGG ou CCGGGGGCGGATTCATCGCCCGGG);
- uma secção da plasmídeo pAT153, do sítio de SalI no nucleótido nº 651 através da origem da replicação e de gene de resistência à ampicilina até ao sítio EcoRI no nucleótido nº 0;
- o promotor triplofano E. Coli;
- um sítio ClaI situado aproximadamente 5 pares de bases a jusante do sítio de ligação do ribossoma no promotor.

O plasmídeo de expressão resistente à ampicilina resultante, designado por p(NAF)-6T3 (Figura 14), é transformado em células de *E. Coli* da estirpe HB101.

O terminador de transcrição não é essencial para a expressão de NAF em *E. Coli*. Isso permite uma terminação eficiente do NAF-mRNA produzido pela polimerase de *E. Coli* e assim aumenta a rendimento da expressão. O NAF pode no entanto ser expresso no mesmo vector sem o terminador de transcrição, mas o rendimento é então, no entanto, 30 a 50% inferior.

Este código genético sintético para NAF bem como outros genes que codificam para a mesma sequência de péptidos básicos mas que têm uma sequência de nucleótidos diferente ou codificam para péptidos de diferentes comprimentos pode também ser expresso em *E. Coli* usando outros promotores, por exemplo, os promotores lambda PL ou Lac ou T_{ac} de *E. Coli*. Os genes podem também ser introduzidos usando outros vectores e expressos noutros organismos, por exemplo, leveduras, fungos, células animais, linhas de células bacterianas, plantas e organismos superiores transgénicos.

c) Expressão

A expressão de p(NAF)-6T3 em *E. Coli* HB 101 é levado a cabo da seguinte forma:

Pré-cultura 1: 50 µl de uma cultura em glicerol da linha de células mantida a -20° são adicionados a 10 ml do meio LB estéril (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levedura e 10 g/l de NaCl) contendo 100 µg/ml de ampicilina. A cultura é agitada num incubador durante 8 horas a 37° e 200 rpm.

Pré-cultura 2: 8 ml do meio da pré-cultura 1 são inoculados em 1 litro de meio M9 (J. H. Miller Experiments in Molecular Genetics (1972) Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. ,p431-433) contendo glucose 0,2%, ácidos caseínicos (Difco) 0,5%, 25 mg/l de triptofano e 100 µg/ml de

Wifana

ampicilina. Esta cultura é agitada num incubador durante 15-16 horas a 37° e a 200 rpm.

Fermentação: a fermentação principal é levada a cabo num fermentador de 70 litros com um volume de trabalho de 35 l. Emprega-se o mesmo meio que para a pré-cultura 2 com a excepção de que apenas são adicionados 5 mg/l de triptofano. A pré-cultura 2 é inoculada neste meio e a fermentação é continuada a 37° até se obter uma densidade óptica de 2,8 a 600 nm (DO_{600}). Quando a DO_{600} atinge 2,8, é adicionado ácido indol-acrílico em etanol até à concentração final de 20 mg/l. Depois de quatro horas, a DO_{600} tinha aumentado até 13,5; a centrifugação produz uma pelete de 516 g.

d) Purificação de NAF recombinante

As células de E. Coli contendo NAF recombinante são armazenadas a -20°. Lotes de 100 g são lavados com 100 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 contendo NaCl 50 mM, ressuspendem-se em 250 ml do mesmo tampão e são desfeitas a 175 Kg/cm² (2500 psi) numa prensa Francesa (Aminco). Depois da centrifugação a 47000 g durante 40 minutos, a pelete é ressuspendida no mesmo tampão, recentrifugada e armazenada a -20°. Porções de 10 g são suspensas em 100 ml de MES-NaOH 50 mM, pH 6,5, guanidina-HCl 6 M, agitadas durante 1 hora e submetidas à diálise contra ácido acético a 0,5%. O produto resultante da diálise é clarificado por centrifugação e carregado em alíquotas numa coluna Mono-S (HR 5/5, Pharmacia). A coluna é lavada com MES-NaOH 50 mM, pH 6,5, contendo NaCl 0,2 M e eluída com um caudal de 0,5 ml/minuto com um gradiente linear no mesmo tampão (0,2 a 0,5 M de NaCl). As fracções com um maior teor de NAF são reunidas e cromatografadas numa coluna de poros largos de inversão de fase de HPLC (0,46 x 125 mm Vydac C4TP) em ácido trifluoracético a 0,1% e um gradiente de acetonitrilo de 20 a 60% a um caudal de passagem de 1 ml/minuto.

Wifama

PARTE V: Identificação de NAF Natural e Recombinante

Exemplo 20: Identificação físico-química

O NAF recuperado por cromatografia em fase líquida a alta pressão (ver Exemplo 19) é considerado puro com base em dois critérios: os geles de SDS-poliacrilamida manchados com prata apresentam apenas uma única banda que coincide com NAF natural (1 μg de NAF recombinante da fração do pico de HPLC na pista 2 em comparação com um μg de NAF na pista 3 com citocromo c de padrões de peso molecular (12,5 kd) e apor-tinina (6,5 kd) na pista 1) e a degradação de Edman de péptido clivado com ácido fórmico origina sequências das extremidades de amino e de carboxi que correspondem à do NAF natural com 72 aminoácidos. A análise dos aminoácidos está de acordo com a composição que é esperada a partir da sequência. Não se encontra metionina indicando que este resíduo é provavelmente removido pelas bactérias.

Exemplo 21: Identificação Bioquímica

Ensaia-se NAF natural e recombinante em paralelo em neutrófilos humanos. Eles provocam alterações virtualmente idênticas em Ca^{2+} citosólico livre, originando um aumento máximo a uma concentração tão pequena como 3 nM (Figura 15). Obtém-se uma resposta de explosão respiratória dependente da concentração quase idêntica com as duas preparações no intervalo de 1 a 30 nM como se detecta por quimioluminescência. A equivalência entre NAF natural e recombinante também se reflecte nas medições de quimiotaxia e exocitose. A migração quimiotáctica observa-se entre 0,1 e 10 nM com um efeito máximo de 1 nM (Tabela 6). Com ambos os péptidos, se observa uma significativa libertação de proteína de ligação de vitamina B_{12} dos grânulos específicos a 0,3 nM e de beta-glucuronidase de grânulos azurófilos a 1 nM. Este efeito aumenta com a concentração do estímulo como se mostra na Tabela 7.

Wifana

45

Tabela 6

Quimiotaxia dos neutrófilos induzida por NAF

NAF (nM)	nat	rec
0,1	98 $\pm$ 6	88 $\pm$ 6
1,0	123 $\pm$ 6	124 $\pm$ 3
10,0	127 $\pm$ 3	126 $\pm$ 4

Os valores representam médias $\pm$ desvios padrão da migração frontal principal em μ m (n=3). A migração aliatória em ausência de um estímulo quimiotático é 61 $\pm$ 5 μ m. Nat=NAF natural rec=NAF recombinante

Tabela 7

Exocitose

NAF (nM)	proteína ligante da Vit. B ₁₂		beta-glucuronidase	
	nat	rec	nat	rec
0,3	7,8 $\pm$ 3,6	5,4 $\pm$ 2,0	1,1 $\pm$ 0,8	
3,0	21,9 $\pm$ 4,2	20,2 $\pm$ 3,7	8,2 $\pm$ 1,9	
30,0	28,4 $\pm$ 3,7	28,1 $\pm$ 3,8	14,2 $\pm$ 2,1	

Porcentagem de libertação de neutrófilos pré-tratados com citocalasina B (4×10^6 células/ml) estimulados com NAF natural (nat) ou NAF recombinante (rec). A libertação dos correspondentes controlos não tratados é deduzida. Média = desvio padrão (n=3).

*Wifama*REIVINDICAÇÕES

1ª- Processo para a preparação de factor de activação dos neutrófilos (FAN), caracterizado pelo facto de compreender a purificação por meio da cromatografia, da parte sobrenadante de culturas de monócitos humanos e sua recuperação, ou pelo facto de compreender a síntese, a purificação e a ligação dos correspondentes oligonucleótidos, a clonação do gene de FAN sintético resultante, a sua expressão, recuperação e purificação.

2ª- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender a cromatografia em fosfato de celulose, hidroxila, heporina-sefarose ou a cromatografia em fase líquida sob alta pressão inversa numa coluna C4 ou de CN-propilo.

3ª- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender uma purificação mediante o enfoque cromático.

4ª- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender a expressão em *Escherichia coli*.

5ª- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender a utilização de qualquer dos oligonucleótidos ON-1 até ON-6.

6ª- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender a utilização do vector de expressão p(FAN)-6T3.

Lisboa, 17/11/88

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

Américo da Silva Carvalho
Américo da Silva Carvalho
Agente Oficial da Propriedade Industrial
R. Castilho, 201-3. E.-1000 LISBOA
Telefs. 65.13 39 - 65 46 13

FIG. 1

Wifama

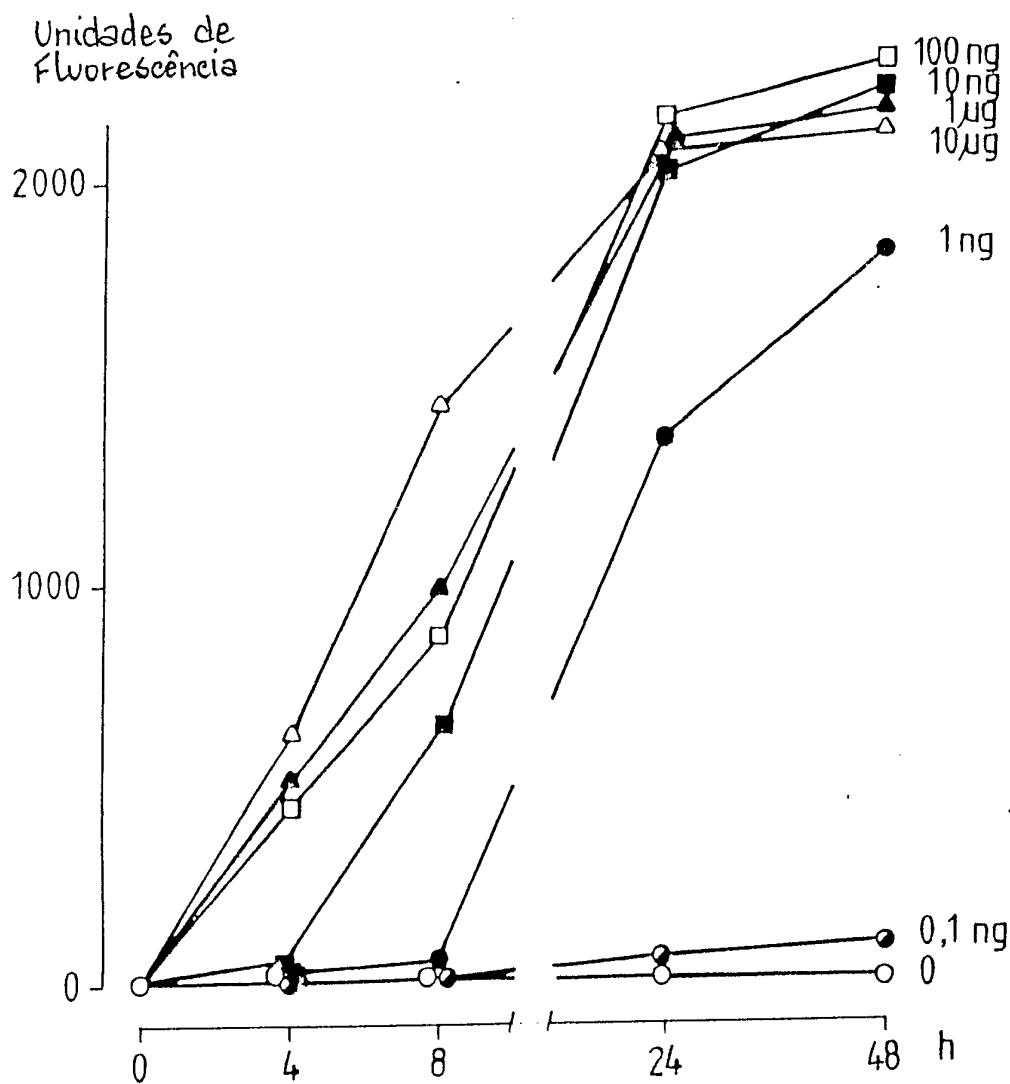
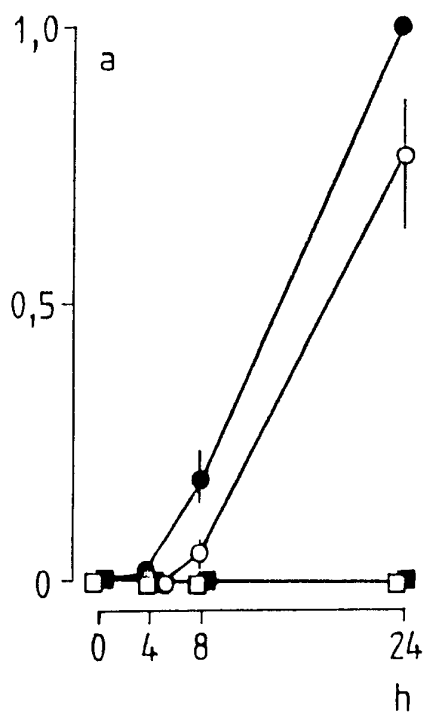
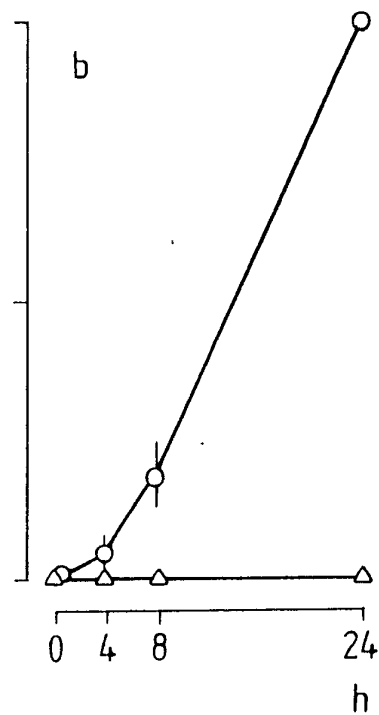


FIG. 2

Wifama

Atividade
Relativa



Wifarras

FIG. 3

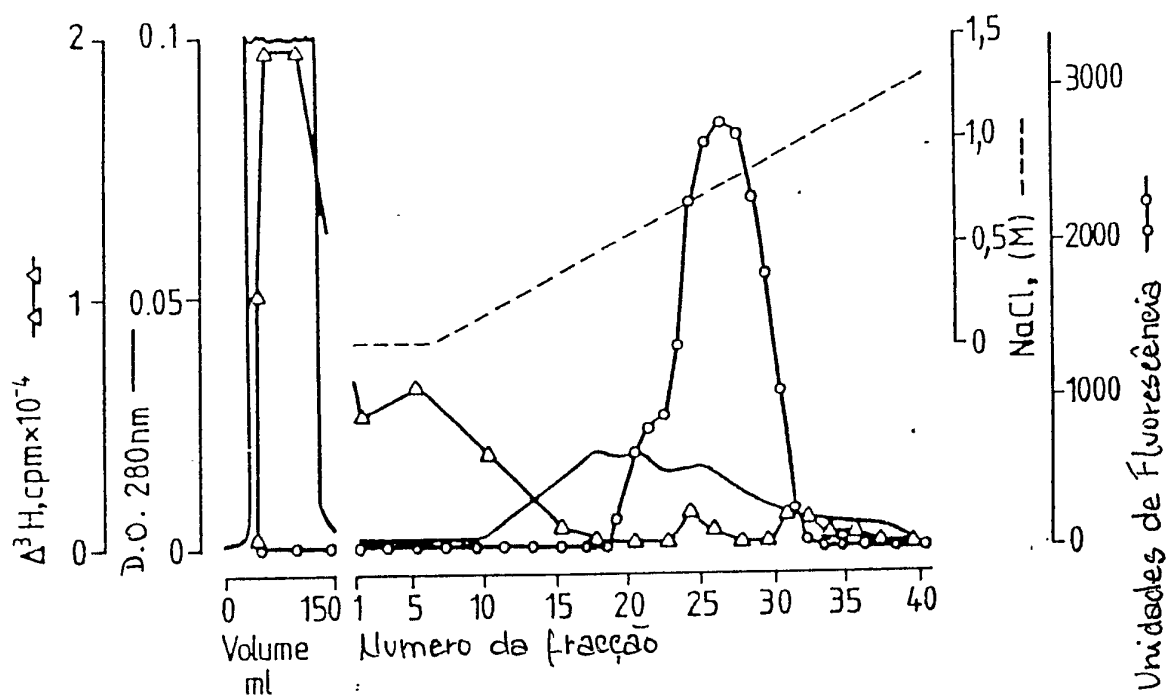
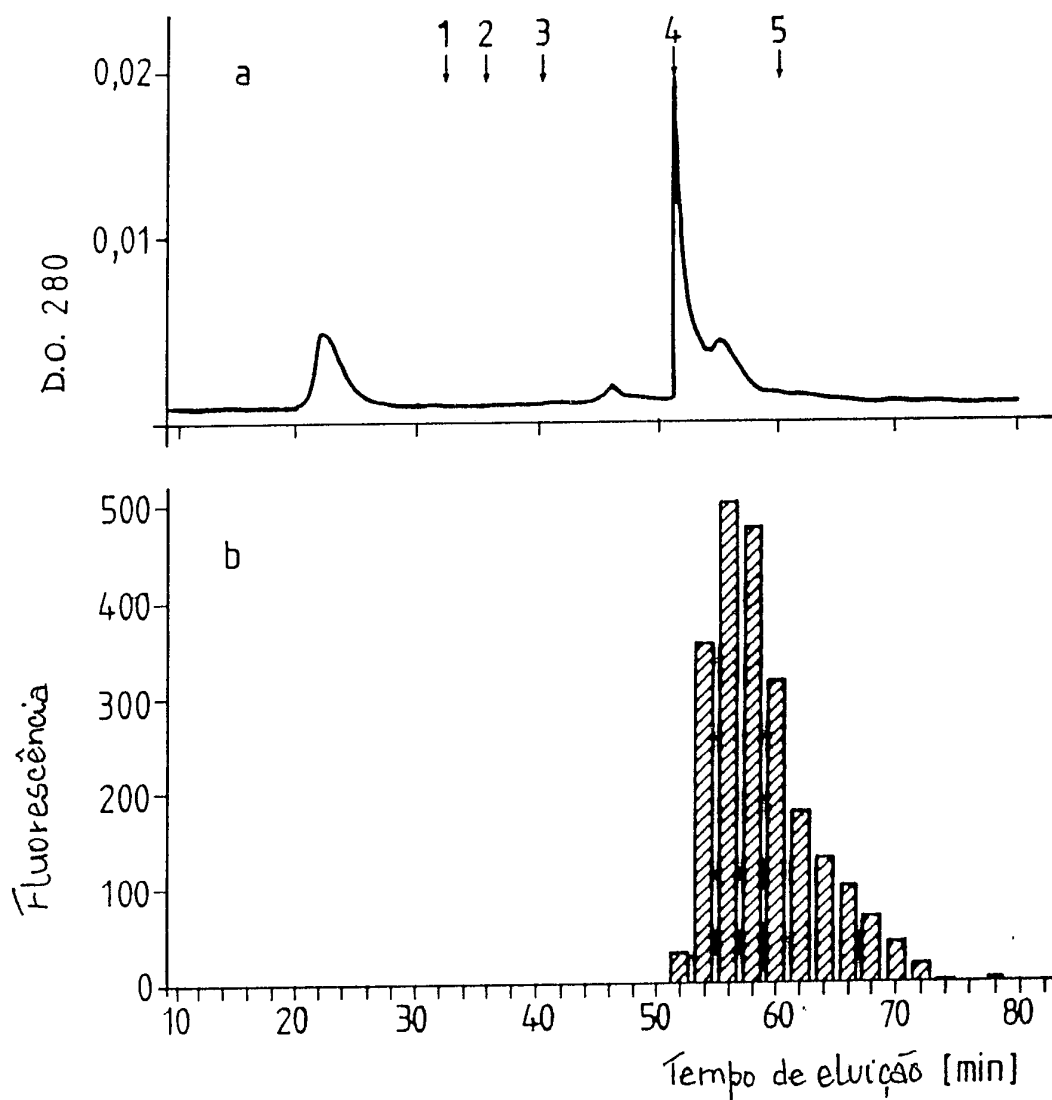


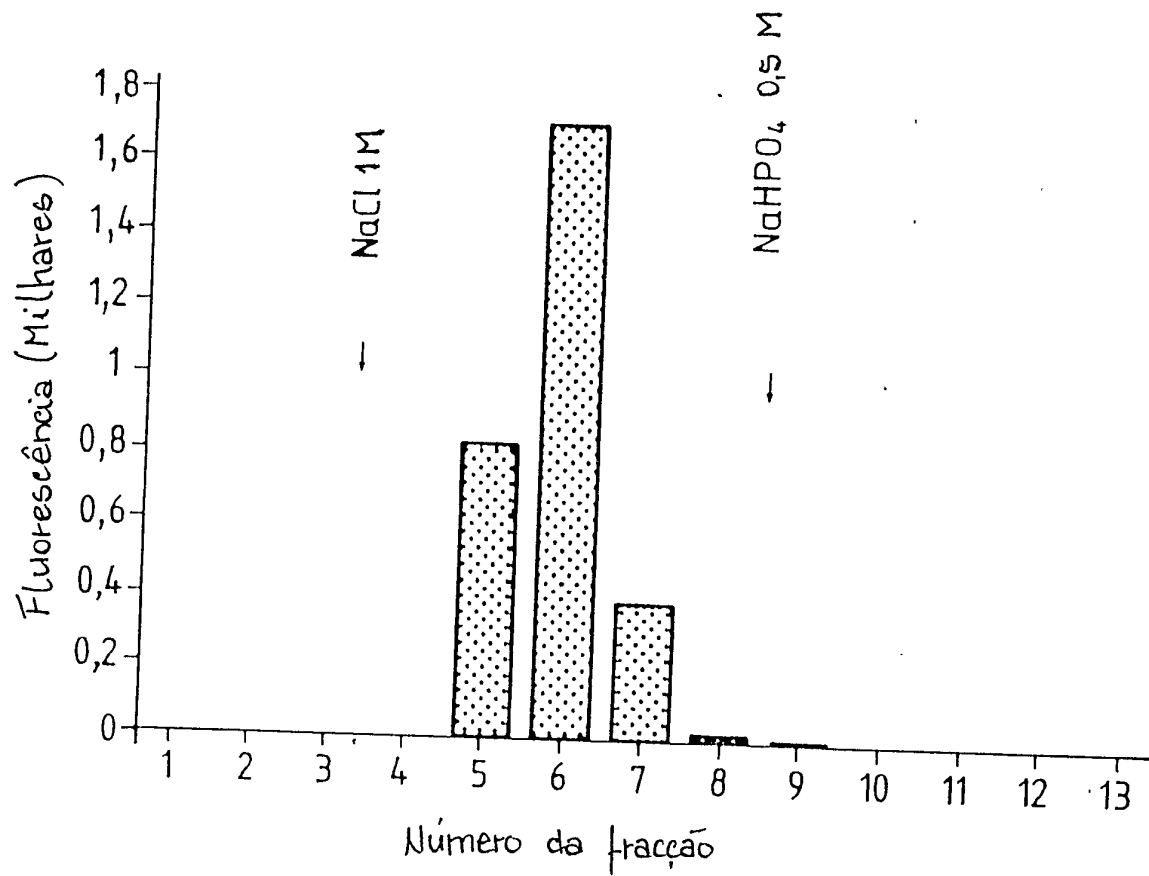
FIG. 4

Wifama



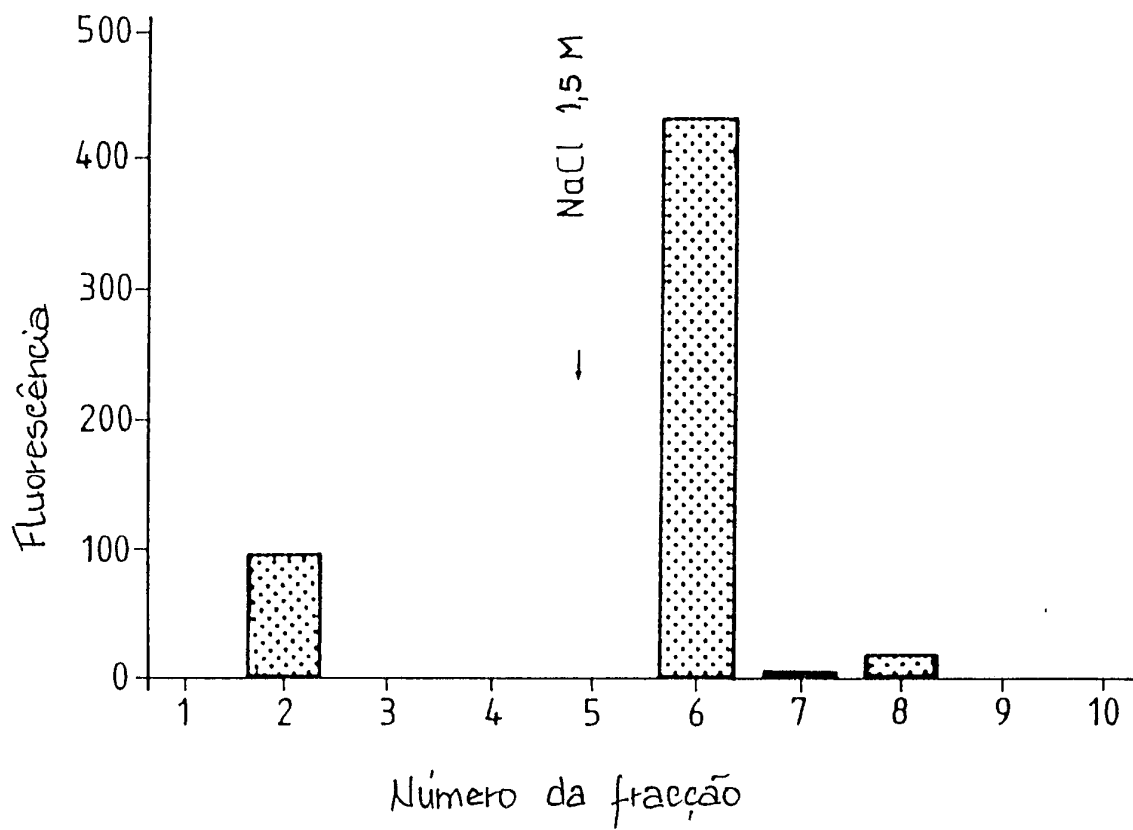
Vifama

FIG. 5



Wifama

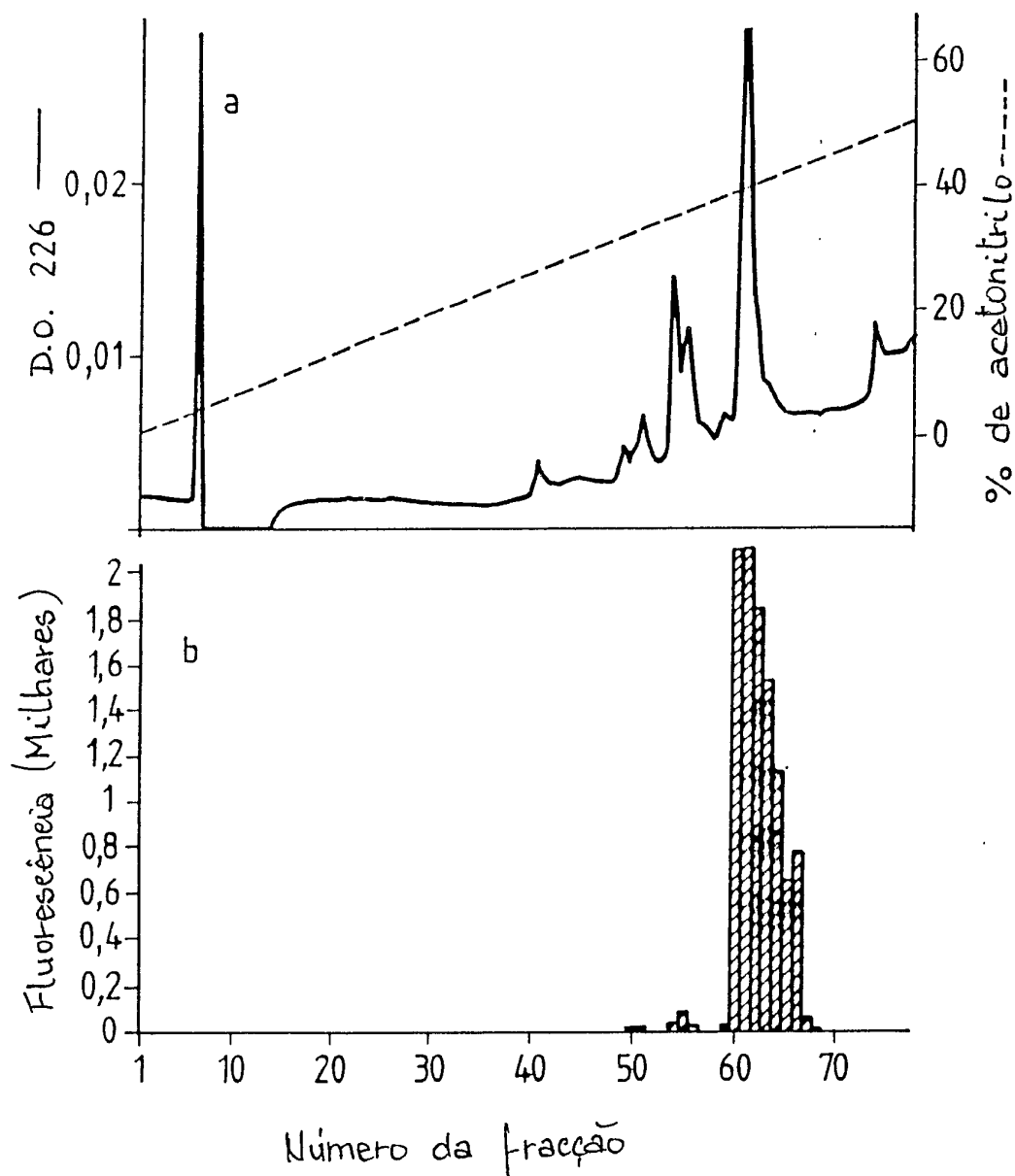
FIG. 6



DESENHOS 19-Nº7

FIG. 7

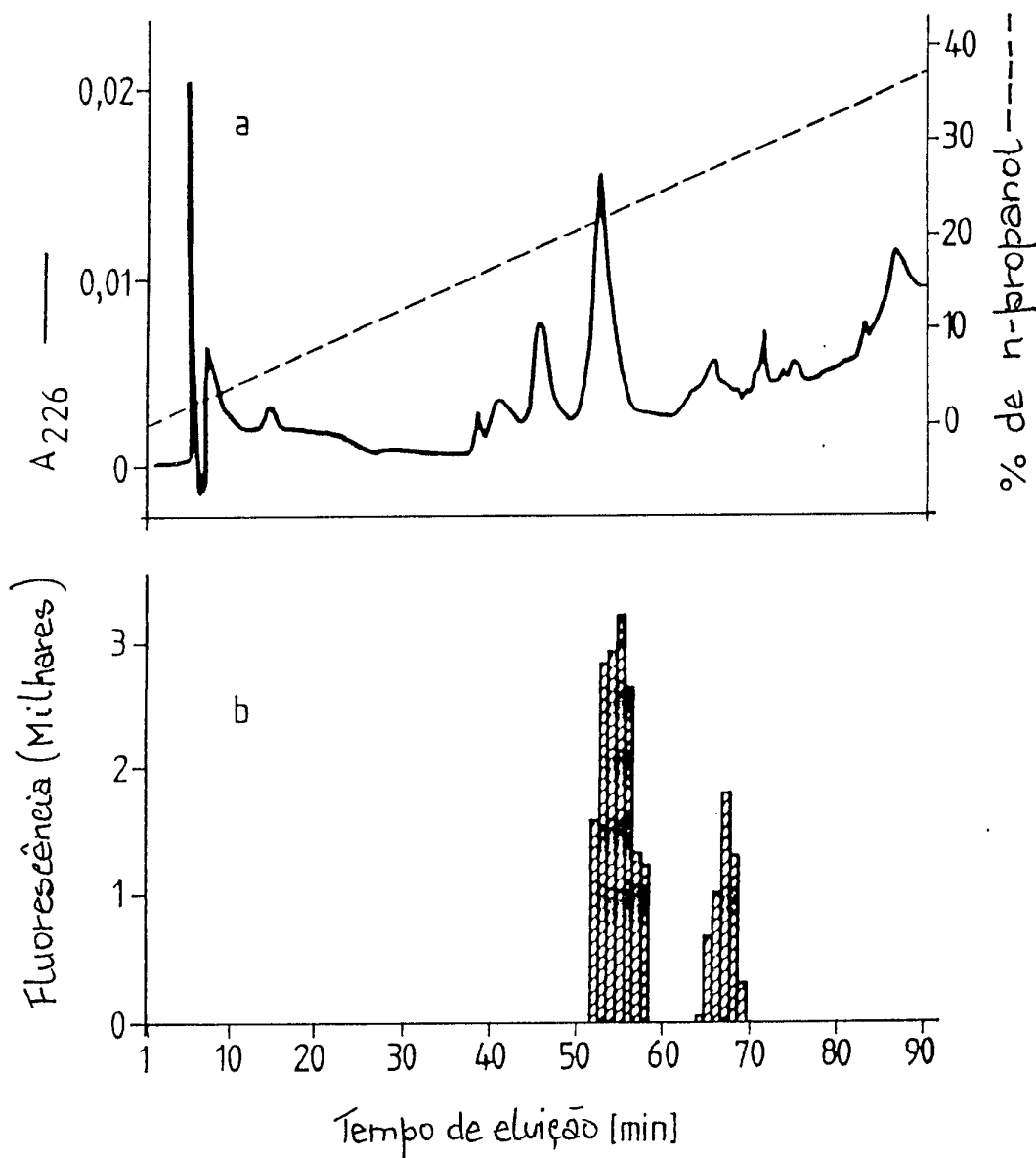
Wifama



Sandoz S.A.

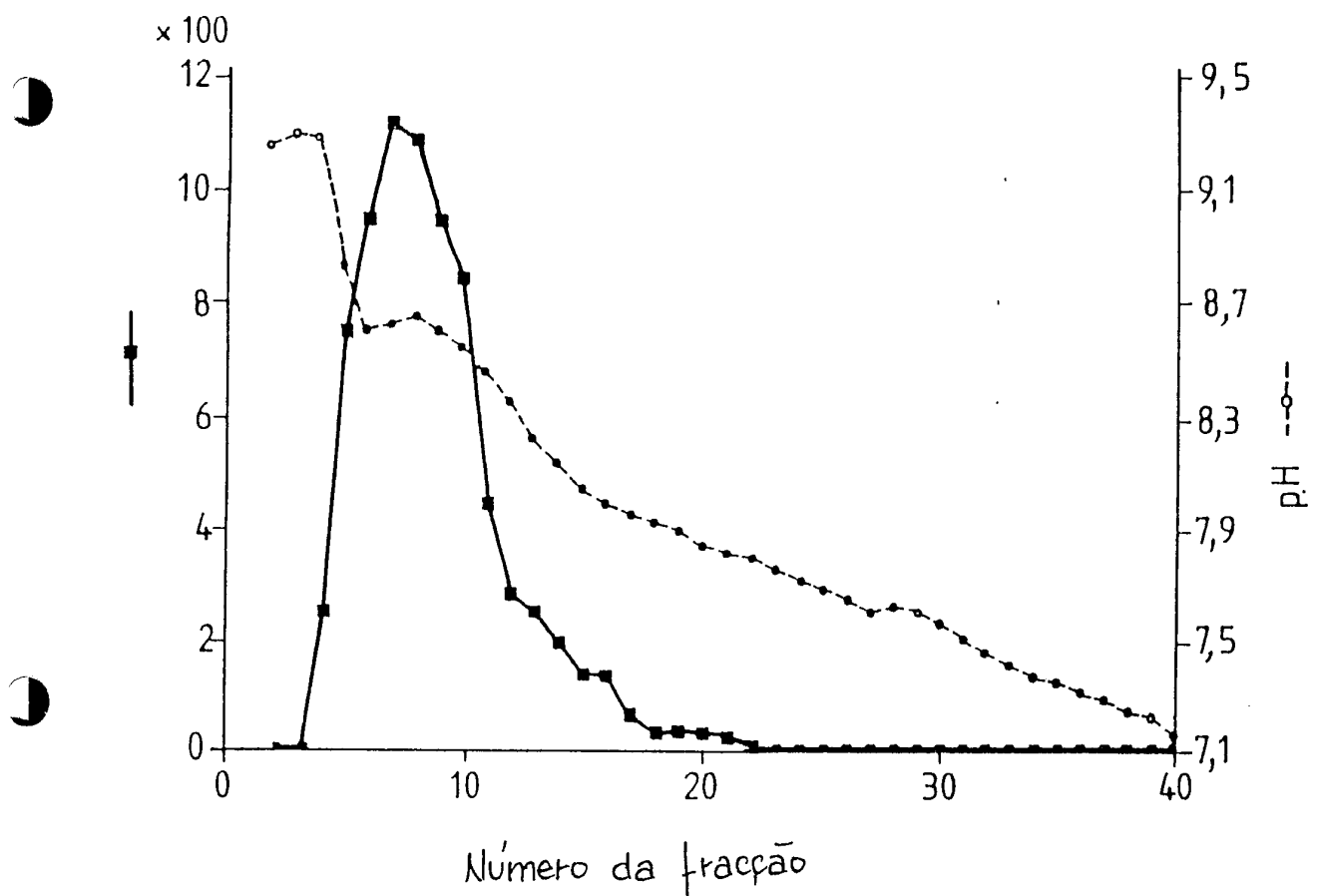
FIG. 8

Wifama



Vifanor

FIG. 9



Sandoz, S.A.

FIG. 10

Wifama

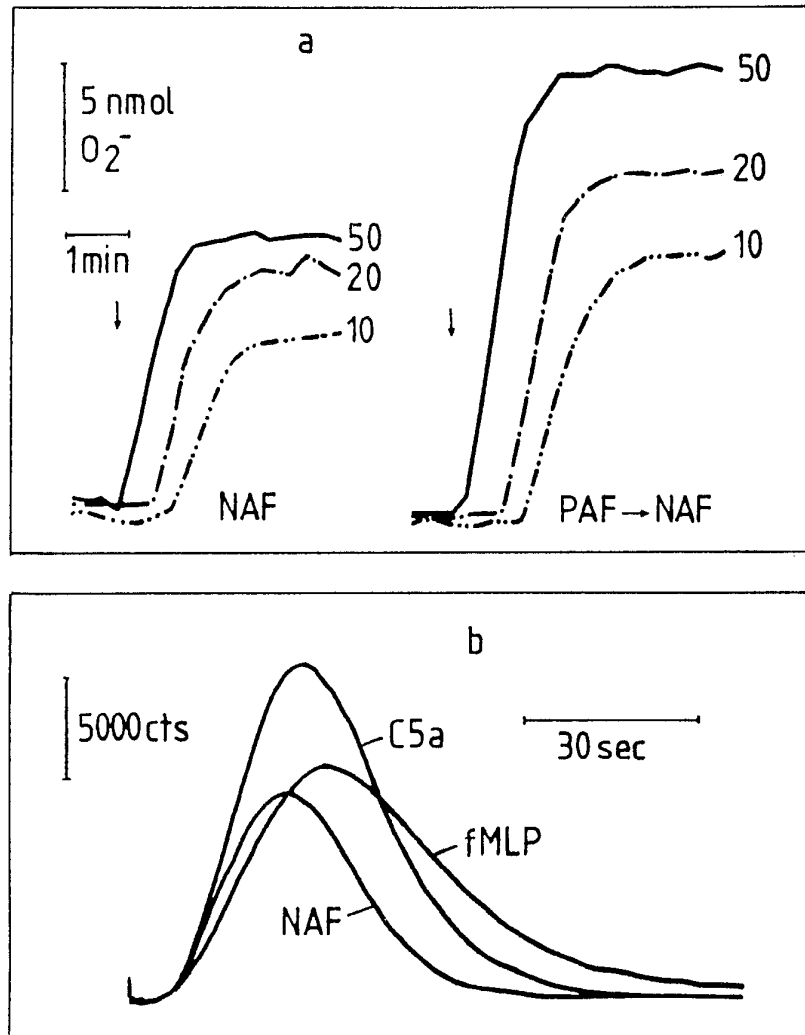
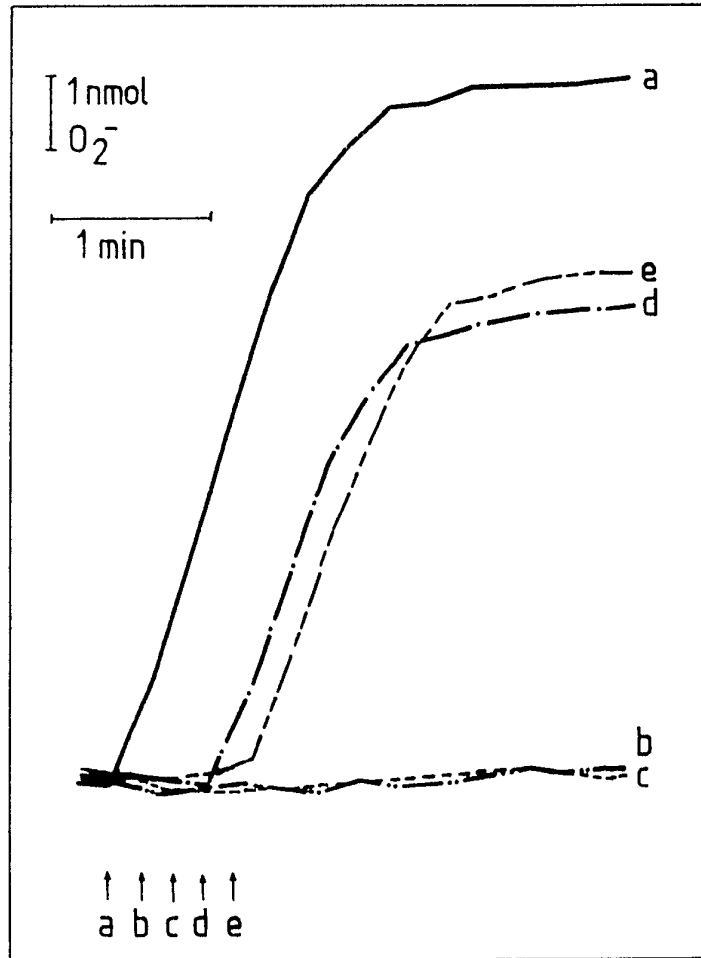


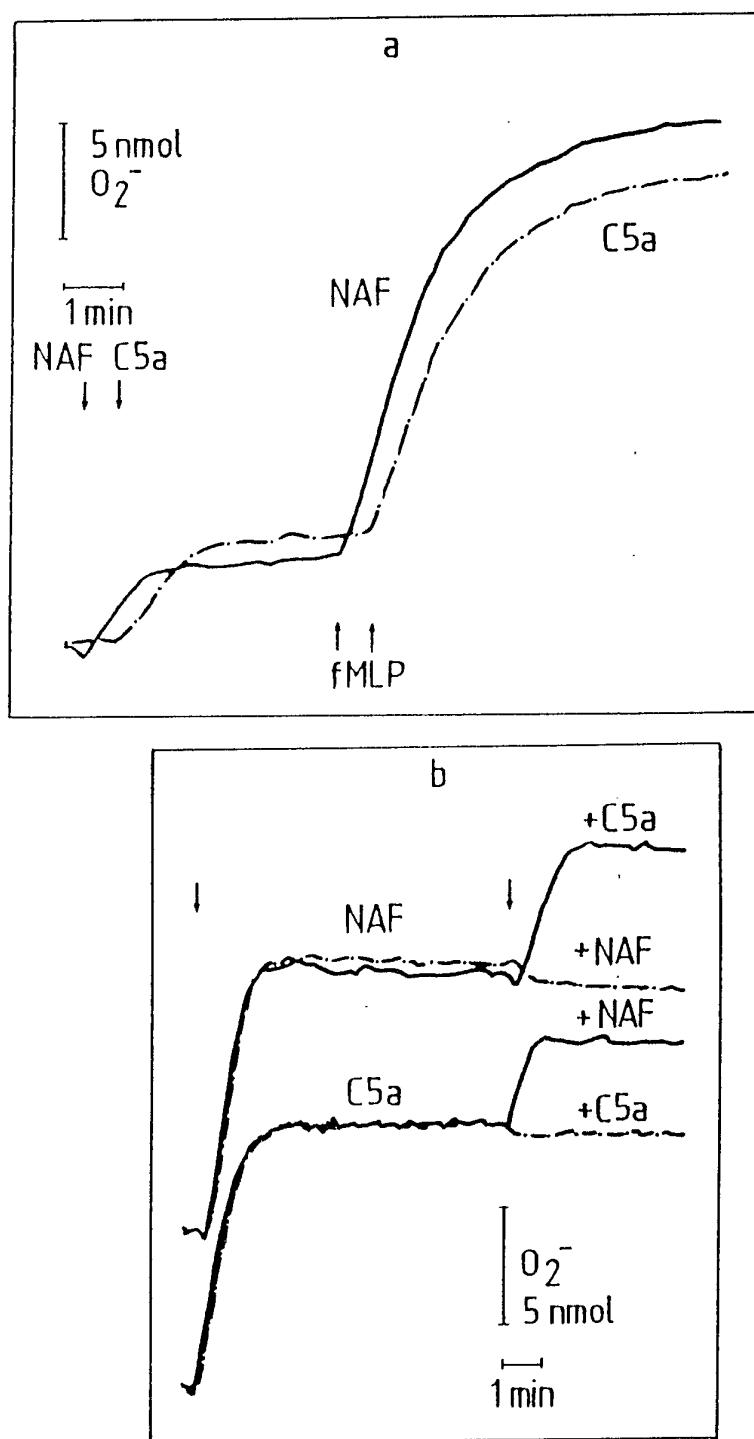
FIG. 11

Wifama



Wifama

FIG. 12



Wifama

FIG 13

Clai TagI ON-1 ON-2 ON-3 ON-4 ON-5 ON-6 BamHI

59

CATCGATAGCT ATG AGT GCT AAA GAA CTT CGA TGT CAG TGC ATA AAG ACA TAC AGC AAA
 GTACGTAGCTATCGA TAC TCA CGA TTT CTT GAA GCT ACA GTC ACG TAT TTC TGT ATG TCG TTT

Met Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys
 1 10

119

CCT TTC CAC CCC AAA TTT ATC AAA GAA CTG AGA GTG ATT GAG AGT GGA CCA CAC TGC GCC
 GGA AAG GTG GGG TTT AAA TAG TTT CTT GAC TCT CAC TAA CTC TCA CCT GGT GTG ACG CGG

Pro Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala
 20 30

179

AAC ACA GAA ATT ATT GTA AAG CTT TCT GAT GGA AGA GAG CTC TGT CTG GAC CCC AAG GAA
 TTG TGT CTT TAA TAA CAT TTC GAA AGA CTA CCT TCT CTC GAG ACA GAC CTG GGG TTC CTT

Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu
 40 50

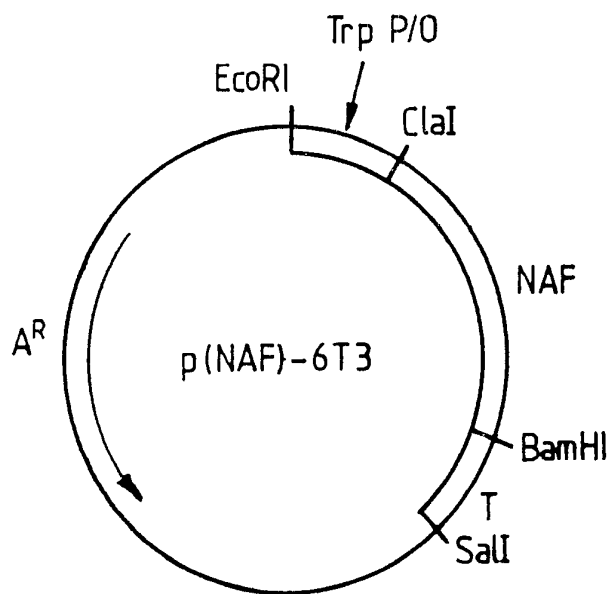
230 BamHI

AAC TGG GTG CAG AGG GTT GTG GAG AAG TTT 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

Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser * * *
 60 70

FIG. 14

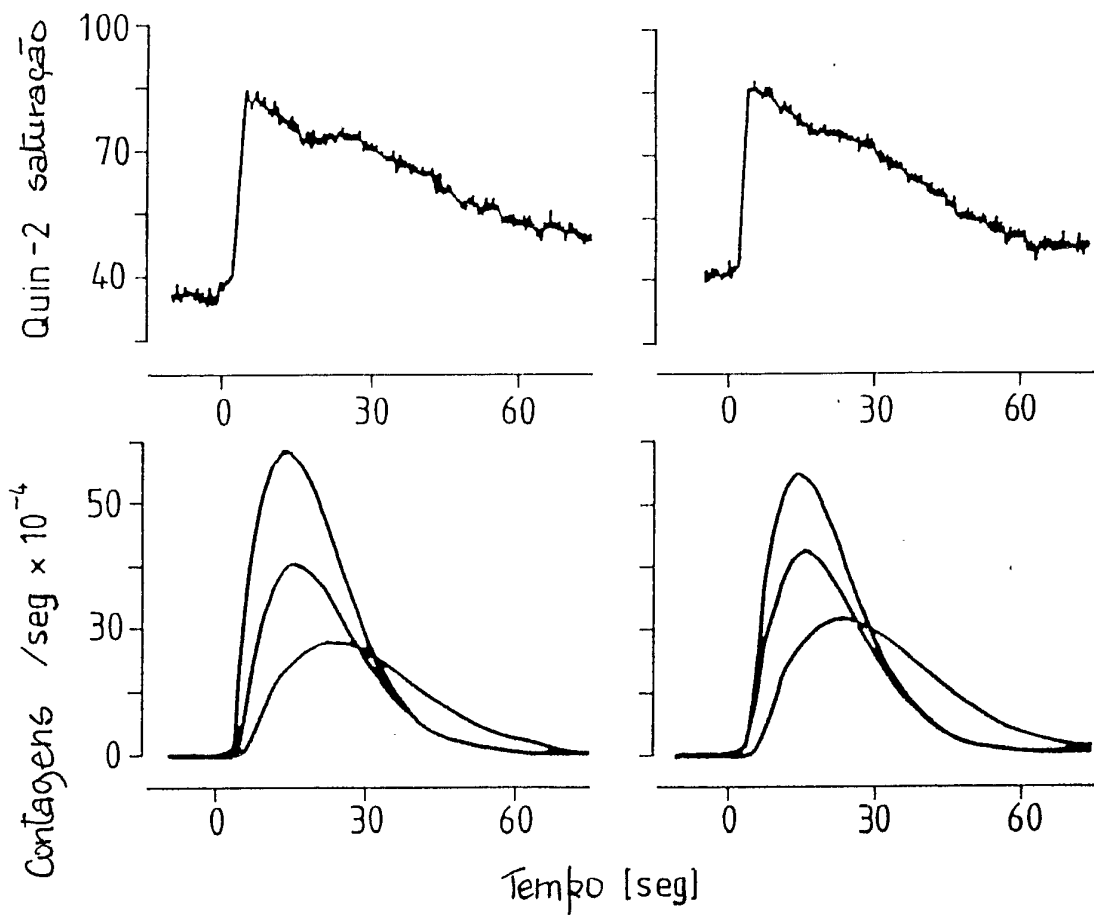
Wifama



DESENHOS 19-Nº15

Wifarras

FIG. 15



Sandoz S.A.

FIG. 16

Wifama

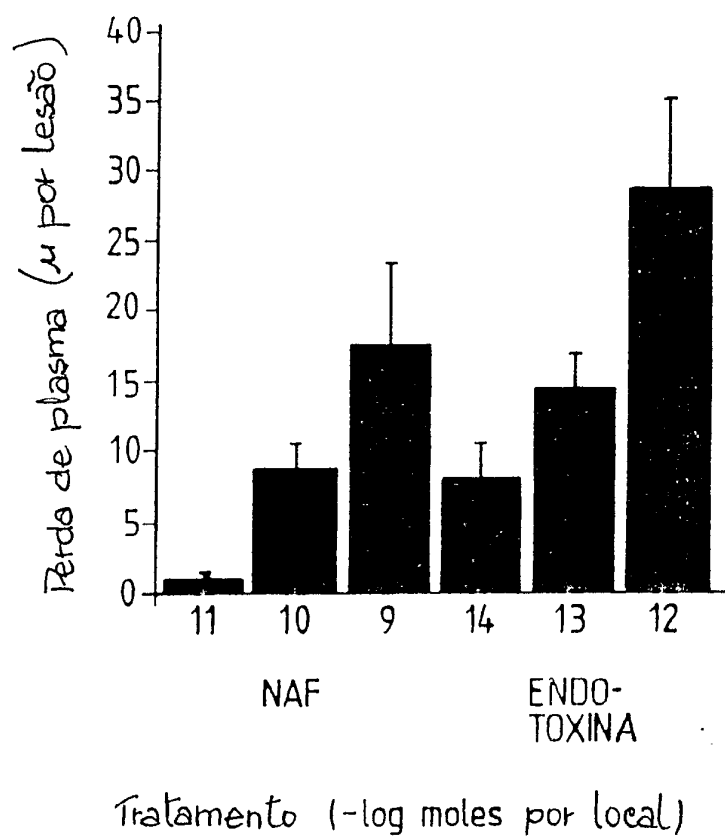


FIG. 17

Trifam

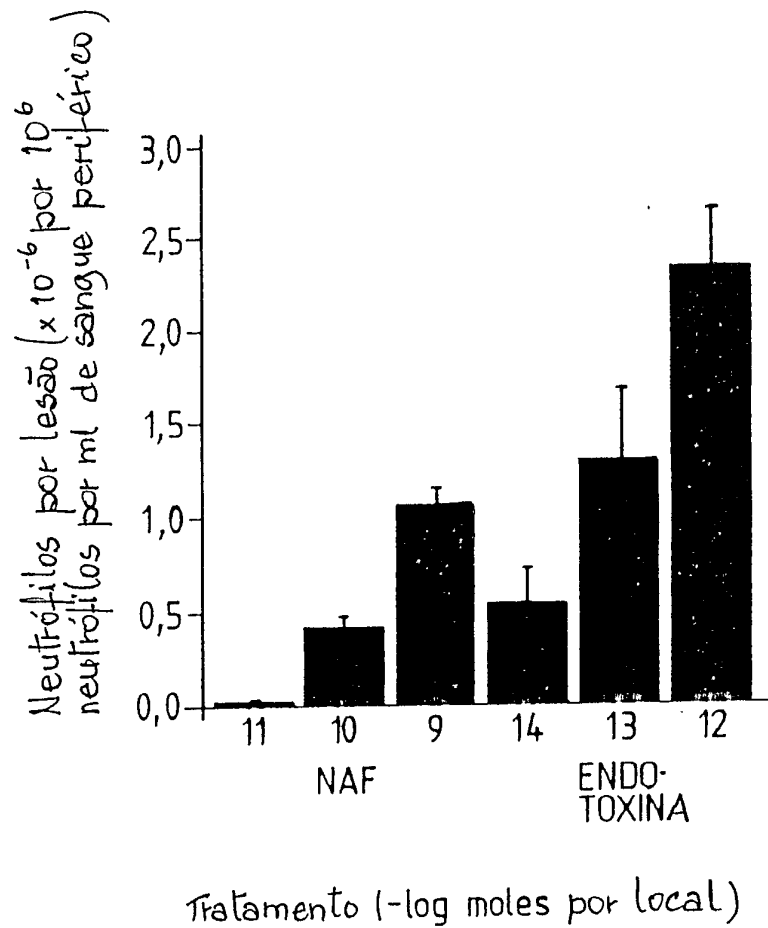


FIG. 18

Wifama

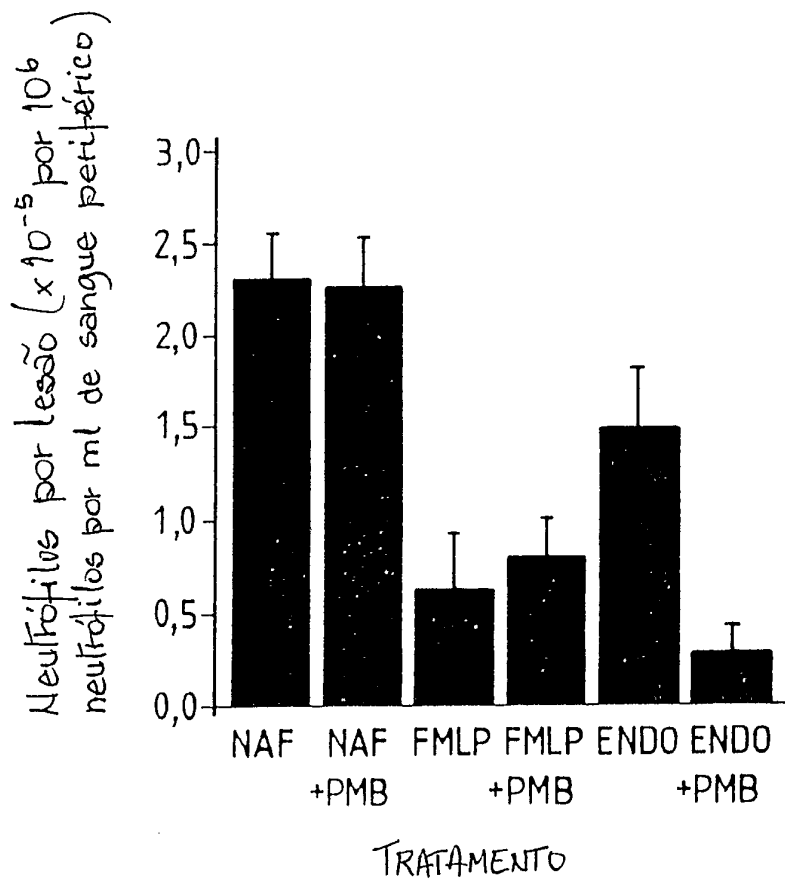


FIG. 19

Wifarms

