

ROYAUME DE BELGIQUE

BREVET D'INVENTION



NUMERO DE PUBLICATION : 1001817A5

NUMERO DE DEPOT : 8801310

Classif. Internat.: C07K C12P C12N

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Date de délivrance : 13 Mars 1990

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 18 Novembre 1988 à 14h20
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SANDOZ S.A.; THEODOR KOCHER INSTITUT
Lichtstr. 35, 4002 BASLE(SUISSE); Freiestr. 1, 3012 BERNE (SUISSE)

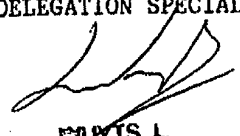
représenté(e)(s) par : PLUCKER Guy, OFFICE KIRKPATRICK, Square de Meeus, 4
- 1040 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : FACTEUR D'ACTIVATION DES NEUTROPHILES.

Priorité(s) 19.11.87 GB GBA 8727053 03.03.88 GB GBA 8805070 28.10.88 GB GBA 8825258

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 13 Mars 1990
PAR DELEGATION SPECIALE :


CLUYTS L.
Directeur.

FACTEUR D'ACTIVATION DES NEUTROPHILES

La présente invention concerne une substance immunomodulatrice.

5 Elle concerne plus particulièrement un facteur immunostimulant capable d'activer les leucocytes neutrophiles humains, désigné dans la suite par facteur d'activation des neutrophiles (NAF).

1. ARRIERE-PLAN

10 Les leucocytes neutrophiles (neutrophiles) sont les leucocytes les plus courants et représentent environ 2/3 des globules blancs dans le sang humain. Ils ont une fonction principale, qui est de protéger l'organisme hôte contre les infections microbiennes. Les neutrophiles sont mobiles, sont
15 sensibles aux stimulations chimiotactiques produites par une infection et sont capables d'entrer dans des tissus infectés pour tuer les microorganismes. Cette capacité à tuer dépend de l'aptitude des neutrophiles à englober les microorganismes et à libérer des radicaux oxygène et des enzymes microbicides (B.M. Babior, New Engl. J. Med. 298 [1978] 659-
20 668, et M. Baggiolini, Experientia 40 [1984] 906-909). La libération de ces produits dépend de l'activation des neutrophiles. On pourrait ainsi employer des substances, comme le facteur d'activation des neutrophiles décrit ici, pour
25 améliorer l'activation des neutrophiles et donc le mécanisme de défense anti-microbienne du corps humain.

On a maintenant découvert que les monocytes humains secrètent un facteur qui induit l'exocytose et l'éclatement respiratoire (formation de radicaux oxygène et libération
30 d'enzymes) dans les neutrophiles humains et présente ainsi des propriétés d'activation des neutrophiles qui sont importantes dans l'activité anti-microbienne.

Le facteur peut être obtenu à partir du fluide de culture de monocytes humains stimulés et a une masse moléculaire apparente d'environ 6000, plus précisément d'environ
35 6500 en électrophorèse sur SDS-gel.

On a maintenant découvert que les monocytes humains secrètent un facteur qui induit l'exocytose et l'éclatement respiratoire (formation de radicaux oxygène et libération d'enzymes) dans les neutrophiles humains et présente ainsi
5 des propriétés d'activation des neutrophiles qui sont importantes dans l'activité anti-microbienne.

Le facteur peut être obtenu à partir du fluide de culture de monocytes humains stimulés et a une masse moléculaire apparente d'environ 6000, plus précisément d'environ
10 6500 en électrophorèse sur SDS-gel.

Les monocytes sont des cellules phagocytaires analogues aux neutrophiles. Toutefois, contrairement aux neutrophiles, les monocytes ont une durée de vie prolongée. Ils migrent depuis le sang dans tous les sites tissulaires possibles où
15 ils se transforment en macrophages. La transformation des monocytes en macrophages peut également s'observer dans des expériences en culture cellulaire. Les macrophages dans les tissus ont une variété de fonctions, principalement la phagocytose des matières indésirables et la production d'une
20 grande variété de peptides et de protéines qui sont secrétés. Les macrophages se rassemblent au site de l'infection persistante et c'est en ces lieux que la production de NAF par ces cellules pourrait améliorer les possibilités de défense de l'hôte des neutrophiles et avoir ainsi un rôle applicable en pathophysiologie.
25

Le NAF est caractérisé par ses propriétés d'activation des neutrophiles, c'est-à-dire l'induction de ce que l'on appelle l'éclatement respiratoire avec production de radicaux oxygène et induction de la libération d'enzymes. En
30 termes moléculaires, le NAF est caractérisé par les propriétés suivantes : une masse moléculaire apparente d'environ 6500 en électrophorèse sur SDS-gel, un point isoélectrique d'environ 8,6, une résistance à la chaleur jusqu'à 80°C et à un nombre d'agents dénaturants mais une sensibilité aux protéases, ce qui suggère que le NAF est un polypeptide. L'ac-
35

(ConA) et de la concentration du stimulus et de la durée d'incubation. Elle est inhibée par la cycloheximide, ce qui indique une fois encore que la synthèse protéinique est mise en jeu.

5 Comme on l'a déjà indiqué, les monocytes et les macrophages sont des sources abondantes d'une variété de peptides bioactifs et de protéines (C.F. Nathan, J. Clin. Invest. 79 [1987] 319-326). Ils ont été identifiés comme étant les producteurs de trois cytokines distinctes : l'interleukine 1
10 (IL-1), le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interféron-alpha (IFN- α). Un certain nombre de rapports ont été publiés qui montrent que les monocytes et les macrophages produisent aussi des facteurs agissant sur les neutrophiles qui sont différents de ceux mentionnés ci-dessus. Comme ils sont
15 actifs sur les neutrophiles, ces facteurs sont présentés dans la suite en détail. Diverses publications ont rapporté que les macrophages alvéolaires libèrent des facteurs qui sont chimiotactiques pour les neutrophiles (J. A. Kazmierowski et coll. J. Clin. Invest. 59 [1977] 273-281;
20 W.W. Merrill et coll., J. Clin. Invest. 65 [1980] 268-270 et G.W. Hunninghake et coll., J. Clin. Invest. 66 [1980] 473-483) et qui peuvent améliorer la défense anti-microbienne dans le poumon. Il a été ensuite montré que ces facteurs améliorent l'activité microbicide des neutrophiles (J.E. Pennington et coll., J. Infect. Dis. 148 [1983] 101-109 et
25 J. Clin. Invest. 75 [1985] 1230-1237). Une purification par filtration sur gel et chromatofocalisation a conduit à l'identification d'un facteur sensible aux protéases (nommé NAF) produit par des macrophages alvéolaires, d'une masse
30 moléculaire de 6000 et d'un poids isoélectrique de 7,6. On a rapporté que ce facteur était faiblement chimiotactique et améliorait l'aptitude des neutrophiles à tuer les bactéries phagocytosées sans toutefois induire en lui-même la production de radicaux oxygène ni la libération d'enzymes. Un mécanisme
35 similaire d'activité anti-microbienne améliorée a

été décrit par d'autres chercheurs (A. Ferrante et coll.,
clin. Exp. Immunol. 56 [1984] 559-566), qui ont montré que
les neutrophiles humains nécessitent l'addition de milieux
de culture provenant de monocytes et de macrophages pour in-
duire l'aptitude à tuer Neigleria fowleri. Les médiateurs de
l'activation des granulocytes (GRAM) produits par des mono-
cytes humains stimulés par LPS ont été décrits par d'autres
laboratoires (A. Kapp et coll., J. Invest. Dermatol. 86
[1986] 523-528 et F.E. Maly et coll., Lymphokine Res. 5
[1986] 21-33). Deux espèces de GRAM ont été décrites, une
espèce majeure ayant une masse moléculaire apparente de
60 000 et une espèce mineure ayant une masse moléculaire ap-
parente de 10 000 qui induisaient une réponse d'éclatement
respiratoire retardé dans les neutrophiles humains, mise en
évidence par chimioluminescence. Ces facteurs sont sensibles
à la chaleur et la trypsine et leur production dépend de la
stimulation des monocytes avec LPS et, apparemment, à nou-
veau de la synthèse protéinique.

Plusieurs rapports décrivent des facteurs dérivés de
monocytes et/ou de macrophages ayant une activité chimiotac-
tique vis-à-vis des neutrophiles. Un facteur nommé "chimio-
taxine dérivée de cellules mononucléaires" (MOC), qui est
apparemment un peptide de masse moléculaire 10 000, qui dif-
fère d'un GRAM, a été rapporté (E. Kownatzki et coll., Clin.
Exp. Immunol. 64 [1986] 214-222). Un facteur chimiotactique
neutrophile produit par les monocytes de sang humain stimu-
lés avec LPS, de masse moléculaire environ 10 000 et de
point isoélectrique 8-8,5, a également été indiqué (T.
Yoshimura et coll., J. Immunol. 139 [1987] 788-793). Enfin,
on a également rapporté que des macrophages péritonéaux de
rats stimulés en culture avec LPS libèrent un facteur chi-
miotactique neutrophile sélectif (F.Q. Cunha et coll., J.
Med. Biol. Res. 19 [1986] 775-777 et Eur. J. Pharmacol. 129
[1986] 65-76).

Du fait de la nature préliminaire de l'information bio-

neutrophile produit par les monocytes de sang humain stimulés avec LPS, de masse moléculaire environ 10 000 et de point isoélectrique 8-8,5, a également été indiqué (T. Yoshimura et coll., J. Immunol. 139 [1987] 788-793). Enfin, on a également rapporté que des macrophages péritonéaux de rats stimulés en culture avec LPS libèrent un facteur chiotactique neutrophile sélectif (F.Q. Cunha et coll., J. Med. Biol. Res. 19 [1986] 775-777 et Eur. J. Pharmacol. 129 [1986] 65-76).

Du fait de la nature préliminaire de l'information biochimique contenue dans ces rapports, il est impossible de spéculer sur des similarités et des différences de structure parmi les divers facteurs décrits.

Après la (les) date(s) de priorité qui est (sont) revendiquée(s) pour la présente invention, la purification d'un peptide correspondant probablement au NAF a été décrite par van Damme et coll. (J. Van Damme et coll., J. Exp. Med. 167 [1988] 1364-1376) et une séquence identique à celle du NAF a été rapportée par Gregory et coll., (H. Gregory et coll., Biochem. Biophys. Res. Commun. 151 [1988] 893-890) pour un peptide ayant été purifié à partir de surnageants de lymphocytes humains stimulés à la lectine. L'ADNc codant pour MDNCF (T. Yoshimura et coll., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84 [1987] 9233-9237) a été récemment cloné (K. Matsushima et coll., J. Exp. Med. 167 [1988] 1883-1893) et s'est révélé correspondre à l'ADNc 3-10C (J. Schmid et C. Weissmann, J. Immunol. 139 [1987] 250-256). Schmid et Weissmann ont montré que le peptide codé par l'ADNc 3-10C a une homologie de structure avec le facteur plaquettaire 4, la β -thromboglobuline, le peptide III activateur de tissu conjonctif (CTAP-III) et le peptide inductible par l'interféron-gamma (γ -IP-10). Ces molécules sont également homologues à un peptide à 73 résidus (MGSA) ayant des propriétés de stimulation de la croissance des mélanomes (A. Richmond et coll., EMBO J. 7 [1988] 2025-2033), dont la séquence ressemble étroitement à

tides sont largement inconnues. On a rapporté que MGSA et CTAP-III (C.W. Castor et coll., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80 [1983] 765-769) sont mitogènes et on a montré que le facteur plaquettaire 4 a des effets immunomodulateurs (A.D. Barone et coll., J. Biol. Chem. 263 [1988] 8710-8715).

Les résultats obtenus suggèrent que le NAF active sélectivement les neutrophiles par un procédé à médiation par récepteur analogue à celui initié par les agonistes chimiotactiques.

10 2. RESUME DE L'INVENTION

On a découvert que le NAF de cette invention induit la formation de radicaux oxygène et la libération d'enzymes dans les neutrophiles humains en agissant par l'intermédiaire d'un récepteur sélectif, différent de tous les récepteurs décrits jusqu'à présent.

La séquence totale d'acides aminés du NAF purifié provenant de monocytes humains stimulés par LPS a été déterminée et un gène codant pour l'espèce de NAF principale a été synthétisé et exprimé sous forme d'un peptide recombinant ayant les mêmes propriétés d'activation des neutrophiles que son homologue naturel.

L'invention concerne donc le NAF et son isolement de sources naturelles comme les monocytes humains.

Elle concerne également un NAF synthétique, en particulier recombinant, et sa préparation et son expression.

25 3. DESCRIPTION DETAILLEE

La séquence complète des acides aminés du NAF a été déterminée par des méthodes de séquençage connues :

30 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.

35 La dégradation d'Edman de la protéine entière et des

fragments typtiques T 7-26 et T 27-47 obtenus après élimination de NAF SH-méthylé et amino-succinylé a donné la séquence jusqu'à la position 47. Par hydrolyse avec de l'acide formique à 75% et dégradation d'Edman, on a obtenu deux séquences approximativement équimolaires de 20 acides aminés, suivies d'un simple motif correspondant à la séquence aminoterminal de NAF au-delà de la position 20. La séquence du peptide carboxyterminal A 53-72 a été déterminée par soustraction et confirmée par l'analyse du peptide typtique T 61-72. Les carboxypeptidases A et B ne donnent pas de produit de segmentation décelable mais, après traitement de 1 nmole de NAF avec la carboxypeptidase Y, on constate la libération de 120 pmoles de sérine, ce qui indique que la sérine est carboxyterminale.

L'analyse de divers lots de NAF a révélé une certaine hétérogénéité aminoterminal. La séquence ci-dessus concerne le constituant majeur (environ 70%) que l'on pense être largement responsable des activités biologiques. On pourrait identifier trois autres variants :

Séquence 1 (environ 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-

c'est-à-dire la séquence entière ci-dessus prolongée encore, à l'extrémité N, par Ala-Val-Leu-Pro-Arg- (la protéine entière a ainsi 77 acides aminés).

Séquence 2 (environ 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-

c'est-à-dire la séquence entière ci-dessus raccourcie, à l'extrémité N, de Ser-Ala- (la protéine entière a ainsi 70 acides aminés).

Séquence 3 (environ 5%) :

à l'extrémité N, par Ala-Val-Leu-Pro-Arg- (la protéine entière a ainsi 77 acides aminés).

Séquence 2 (environ 8%) :

5 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-

c'est-à-dire la séquence entière ci-dessus raccourcie, à l'extrémité N, de Ser-Ala- (la protéine entière a ainsi 70 acides aminés).

10 Séquence 3 (environ 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-.

15 c'est-à-dire la séquence entière ci-dessus raccourcie, à l'extrémité N, de Ser-Ala-Lys- (la protéine entière a ainsi 69 acides aminés).

20 Toutes ces séquences peuvent être alignées pour former la séquence prévue à partir de l'ADNc 3-10C, constitué par 99 acides aminés (J. Schmid et C. Weissmann, J. Immunol. 139 [1987] 250-254). Le peptide NAF majeur correspond aux positions 28 à 99 de la séquence d'acides aminés 3-10C, tandis que les trois variants ci-dessus commencent aux positions 23 (séquence 1), 30 (séquence 2) et 31 (séquence 3) de celui-ci.

25 La comparaison de la séquence dérivée d'ADNc 3-10C avec les données de la séquence ci-dessus suggère que les phagocytes mononucléaires synthétisent un précurseur de NAF qui est traité au sein de la cellule. Le peptide à 77 résidus pourrait représenter la forme sécrétée la plus grande de NAF
30 car il correspond à la séquence dérivée d'ADNc moins le peptide de signal prévu de 22 acides aminés. L'espèce principale de NAF à 72 résidus et les analogues à 70 et 69 résidus peuvent résulter d'autres modifications post-translationnelles.

35 Toutes les formes de NAF possèdent quatre résidus cys-

rieure à la masse moléculaire apparente trouvée par électrophorèse sur SDS-gel.

La production de NAF à partir de sources naturelles, comme les monocytes humains, conduit à de faibles rendements et nécessite des étapes de purification importantes et compliquées.

Afin de produire du NAF en grandes quantités et avec des procédés de synthèse à meilleur rendement, on indique par exemple une synthèse chimique totale ou des procédés à l'ADN recombinant. La production de NAF de synthèse, par exemple par des méthodes à l'ADN recombinant, comprenant l'expression dans un système d'expression procaryote ou eucaryote, par exemple dans *E. coli*, font également partie de l'invention. Un NAF de synthèse, c'est-à-dire un NAF produit par des procédés de synthèse comme des procédés à l'ADN recombinant, fait également partie de l'invention. Un NAF de synthèse, par exemple le NAF recombinant isolé, par exemple, à partir de bactéries, a la ou les mêmes séquences d'acides aminés que le NAF naturel et les mêmes propriétés et activités biologiques. L'expression "NAF recombinant" signifie un NAF obtenu par des procédés à l'ADN recombinant.

La préparation de NAF par des procédés à l'ADN recombinant s'effectue selon des techniques connues, à savoir par synthèse, purification et ligature des oligonucléotides correspondants, clonage du gène de NAF synthétique, expression dans *E. coli* par exemple et enfin récupération et purification du NAF recombinant. Par exemple, un gène codant pour le NAF à 72 acides aminés est synthétisé, de préférence avec optimisation du codon, puis cloné et exprimé dans *E. coli*.

L'analyse par "western blot" des extraits bactériens bruts, au moyen d'un anti-sérum sensibilisé à un NAF naturel, révèle une seule bande qui migre en même temps que le NAF naturel. Le NAF recombinant purifié jusqu'à l'homogénéité possède des séquences aminoterminales et carboxyterminales identiques à celles du NAF naturel à 72 acides aminés.

dans *E. coli* par exemple et enfin récupération et purification du NAF recombinant. Par exemple, un gène codant pour le NAF à 72 acides aminés est synthétisé, de préférence avec optimisation du codon, puis cloné et exprimé dans *E. coli*.

5 L'analyse par "western blot" des extraits bactériens bruts, au moyen d'un anti-sérum sensibilisé à un NAF naturel, révèle une seule bande qui migre en même temps que le NAF naturel. Le NAF recombinant purifié jusqu'à l'homogénéité possède des séquences aminoterminales et carboxyterminales identiques à celles du NAF naturel à 72 acides aminés. 10 Si on le teste sur des neutrophiles humains, on constate qu'il a la même activité et la même efficacité que le NAF naturel pour induire le chimiotactisme, une élévation rapide de Ca^{2+} libre cytosolique, l'activation de l'éclatement respiratoire et la libération des granulations spécifiques et 15 azurophiles.

La figure 13 représente le dessin d'un gène de NAF synthétique. Des changements sont apparents sur la séquence codante de l'ADNc 3-10C pour faciliter l'expression dans *E. coli*. A l'extrémité 3', la séquence de terminaison naturelle 20 TAA est remplacée par une triple séquence de terminaison TAATAATGA et un site BamHI est ajouté immédiatement en aval. A l'extrémité 5', les sites SphI et ClaI sont ajoutés pour permettre l'insertion dans le clonage et dans le vecteur 25 d'expression, respectivement. A la base 34, est créé un site de restriction TaqI pour des manipulations ultérieures sur l'extrémité 5' par changement du codon Arg de AGA en CGA.

Le recuit en blocs (oligonucléotides 1-2, 3-4 et 5-6) ne présente aucun avantage par rapport à la ligature simultanée des six oligonucléotides. La 5'-phosphorylation de 30 tous les oligonucléotides donne naissance à des produits de ligature plus grands que la taille attendue mais, lorsque les oligonucléotides terminaux (1 et 6) ne sont pas phosphorylés, le produit ayant la masse moléculaire la plus élevée 35 est le gène complet avec 248/240 bases. Le gène est ligaturé

dans pBS M13⁻ coupé par SphI/BamHI et transformé dans E. coli. L'ADN plasmide isolé de 6 des colonies résistantes à l'ampicilline résultantes est découpé avec ClaI/BamHI, donnant dans tous les cas une bande de 237 bp sur un gel d'agarose à 1,4%. Le séquençage de l'ADN montre les clones contenant la séquence correcte. La bande ClaI/BamHI provenant d'un clone correct est retirée du gène et clonée dans le vecteur promoteur de Trp pIL402 (Term). Comme moyen possible d'augmenter l'expression, on peut incorporer une séquence de terminaison de transcription synthétique (voir exemple 17) dans ce vecteur, fixée à l'extrémité 3' du gène GM-CSF humain au site BamHI. Le gène de NAF est donc inséré entre ce site BamHI et le site ClaI en aval du site d'initiation de la transcription dans le promoteur, pour remplacer le gène GM-CSF. Le plasmide d'expression de NAF résultant, p(NAF)-6T3, est représenté sur la figure 14.

L'analyse par coloration à l'argent et "western blot" d'extraits de E. coli contenant p(NAF)-6T3 induit par l'acide indole-acrylique démontre la chronoproduction d'un peptide qui migre en même temps qu'un NAF naturel et réagit avec un anti-sérum contre le NAF naturel.

Le système d'expression ci-dessus peut également être utilisé pour préparer les variants de NAF mentionnés ci-dessus ou d'autres fragments de NAF biologiquement actifs comme des fragments de NAF ayant perdu le groupe amino.

Les propriétés biologiques du NAF sont spécifiques à une espèce. L'activité chez le lapin reflète très étroitement l'activité chez l'homme. Des essais préliminaires chez la souris, le rat et le cobaye n'ont pas montré d'activité claire.

L'utilisation du NAF est indiquée dans le traitement des troubles qui sont accompagnés ou provoqués, localement ou systémiquement, par une modification du nombre ou de l'état d'activation des PMN (cellules polymorphonucléaires-neutrophiles). Le NAF modifie de manière importante ces pa-

ramètres PMN et son utilisation est donc indiquée dans le traitement des troubles dans lesquels une élévation du nombre ou de l'état d'activation des PMN conduit à une amélioration clinique, par exemple dans les infections bactériennes, mycoplasmiques, par les levures et les champignons et dans les infections virales. En outre, l'utilisation du NAF est indiquée dans les maladies inflammatoires comme la psoriasis, les affections arthritiques et l'asthme, ou dans les troubles présentant une numération des neutrophiles anormalement faible et/ou un faible taux généralisé des neutrophiles, et dans la préparation d'antagonistes utilisables dans ces indications.

3. DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : production de NAF induite par LPS :

Des cellules mononucléaires séparées comme le décrit l'exemple 1 ont été ensemencées dans des plaques de culture à 24 puits (5×10^6 cellules dans 1 ml) et stimulées avec LPS aux concentrations indiquées. A différents intervalles de temps, les milieux ont été recueillis, éclaircis par centrifugation (20 000 t/min pendant 20 min à 4°C) et on a mesuré l'activité du NAF. Les cellules utilisées provenaient d'un seul donneur; on a rapporté les moyennes de cultures faites en double exemplaire. Ces résultats sont représentatifs de 4 expériences analogues utilisant des cellules de donneurs différents.

Figure 2 : production de NAF par des phagocytes mononucléaires mais pas par des lymphocytes :

a) La fraction totale de cellules mononucléaires ($\bullet, \blacksquare, 5 \times 10^6$ cellules/ml) et les cellules adhérentes en dérivant ($\circ, \square$) sont cultivées en présence ($\bullet, \circ$) et en l'absence ($\blacksquare, \square$) de 100 ng de LPS pendant 24 heures.

b) Des monocytes ($\circ, 10^6$ cellules/ml) et des lymphocytes ($\Delta, 4 \times 10^6$ cellules/ml) purifiés par élutriation sont cultivés en présence de 100 ng de LPS.

Les graphiques représentent les valeurs moyennes rela-

Figure 3 : purification partielle du NAF par chromatographie sur phosphocellulose :

5 On y voit la distribution des protéines (absorbance à 280 nm, ---), de NAF (o) et de IL-1 (Δ). Les fractions présentant les activités de NAF les plus élevées sont regroupées comme il est indiqué.

Figure 4 : purification du NAF par filtration sur gel en CLHP :

10 a) Distribution des protéines (absorbance à 280 nm) et temps d'élution des marqueurs de masse moléculaire (MM) (flèches : 1 = MM 66200; 2 = MM 42700; 3 = MM 21500; 4 = MM 6500 et 5 = MM 1255).

b) Profil d'activité du NAF.

15 Figure 5 : purification de NAF par chromatographie sur hydroxylapatite :

Du NAF partiellement purifié est chargé sur la colonne à une faible concentration saline, puis élué par un tampon contenant NaCl 1M. Les blocs montrent l'activité du NAF.

20 Figure 6 : purification du NAF par chromatographie sur héparine-Sepharose :

Du NAF partiellement purifié est chargé sur la colonne à une faible concentration saline, puis élué avec un tampon contenant NaCl 1,5M. Les blocs montrent l'activité du NAF.

25 Figure 7 : purification du NAF par CLHP en phase inverse sur colonne de C4 :

a) Du NAF purifié est chargé sur une colonne en phase inverse dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1%. La colonne est développée avec un gradient linéaire d'acétonitrile dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1%.

30 b) Les blocs montrent l'activité du NAF.

Figure 8 : purification du NAF par CLHP en phase inverse sur colonne de CN-propyle :

35 a) Du NAF purifié est chargé sur une colonne de CN-propyle Bakerbond dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1%. La colonne est développée avec un gradient linéaire de n-propa-

nal dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1%.

b) Les blocs montrent l'activité du NAF.

Figure 9 : purification du NAF par chromatofocalisation :

5 Du NAF partiellement purifié est chargé sur une colonne de chromatofocalisation. La colonne est développée avec du polytampon 96-HCl, pH 7,0. On teste les fractions pour déterminer l'activité du NAF (—■—) et le pH (--■--).

Figure 10 : réponse de l'éclatement respiratoire au NAF partiellement purifié :

10 a) Production de superoxyde : des neutrophiles ($3 \times 10^6/\text{ml}$) sont préincubés à 37° avec ou sans $1 \mu\text{m}$ de PAF, pendant 2 minutes, puis stimulés avec des quantités croissantes de NAF. La figure montre les enregistrements de la réduction des cytochromes c après l'addition de NAF.

15 b) Chimiluminescence dépendant de H_2O_2 : les courbes d'évolution après stimulation avec un NAF partiellement purifié et des concentrations quasiéquiactives de C5a et fMLP sont indiquées sur la gauche. La phase initiale de la réponse est détaillée sur la droite. Les stimulants sont ajoutés dans 50 μl de PBS-BSA.

20 Figure 11 : distinction entre NAF et C5a :

C5a et NAF sont incubés pendant 15 minutes avec du sérum humain frais ou avec du PBS et l'activité des préparations est déterminée (production de superoxyde).

- 25 a) C5a dans PBS,
b) C5a dans sérum,
c) sérum seul,
d) NAF dans PBS,
e) NAF dans sérum.

30 Figure 12 : formation de superoxyde en réponse à une stimulation séquentielle avec un NAF partiellement purifié, C5a et fMLP :

35 a) Des neutrophiles ($3 \times 10^6/\text{ml}$) sont préincubés à 37°C pendant 5 minutes, puis stimulés avec différents agonistes comme il est indiqué (flèches).

b) Stimulation séquentielle ou répétée avec NAF et C5a. Les conditions sont les mêmes qu'en a).

Les flèches représentent l'addition des agonistes selon les indications. La concentration de C5a et de 0,5 nM en a) est de 0,2 nM en b), celle de fMLP est de 20 nM dans les deux expériences. Les agonistes sont ajoutés dans 50 µl de PBS-BSA.

Figure 13 : séquence nucléotidique d'un gène de NAF synthétique :

Les oligonucléotides simples, ON-1 à ON-6, utilisés pour construire le gène, sont indiqués en traits pointillés. Les numéros (soulignés) des nucléotides apparaissent du côté droit au-dessus du double brin. La séquence peptidique correspondante de la forme majeure est numérotée en partant de l'extrémité aminoterminal (Ser). Les sites de restriction ClaI et BamHI sont indiqués au-dessus du double brin. Le site TaqI créé en remplaçant le A par un C dans le codon d'arginine est également indiqué.

Figure 14 : vecteur d'expression p(NAF)-6T3 :

AR = gène de résistance à l'ampicilline
Trp P/O = promoteur de tryptophane
T = terminaison de transcription synthétique

Figure 15 : identité du NAF naturel et du NAF recombinant

Graphiques du haut : changements de Ca^{2+} libre cytosolique induits par un NAF naturel (à gauche) et recombinant (à droite). Les neutrophiles (4×10^6 cellules/ml) sont chargés avec 0,1 nmole de quin-2/AM, puis stimulés avec 3 nM de NAF (marque). Les changements de saturation de quin-2 sont étalonnés comme le décrivent V. Von Tscharner et coll., J. Biol. Chem. 261 (1986) 10163-10168.

Graphiques du bas : éclatement respiratoire induit par un NAF naturel (gauche) et recombinant (droite). Les neutrophiles (10^6 cellules/ml) sont stimulés avec 3, 10 et 30 nM de NAF à l'instant 0 et la production de peroxyde d'hydrogène est mesurée par chimioluminescence (M. P. Wymann et coll.,

gés avec 0,1 nmole de quin-2/AM, puis stimulés avec 3 nM de NAF (marque). Les changements de saturation de quin-2 sont étalonnés comme le décrivent V. Von Tscharner et coll., J. Biol. Chem. 261 (1986) 10163-10168.

- 5 Graphiques du bas : éclatement respiratoire induit par un NAF naturel (gauche) et recombinant (droite). Les neutrophiles (10^6 cellules/ml) sont stimulés avec 3, 10 et 30nM de NAF à l'instant 0 et la production de peroxyde d'hydrogène est mesurée par chimioluminescence (M. P. Wymann et coll., Anal. Biochem. 165 [1987] 371-378).

10 Figure 16 : fuite de plasma dans les sites cutanés :

Après injection intradermique de NAF ou d'endotoxine;
Durée : 4 heures;
Moyenne $\pm$ erreurs types de la réponse moyenne sur 3 lapins.

- 15 Figure 17 : accumulation des neutrophiles dans les sites cutanés :

Mesures faites simultanément aux réponses tracées sur la figure 16.

- 20 Figure 18 : Effet de la polymixine B sur l'accumulation des neutrophiles :

Après injection intradermique de NAF (10^{-9} moles/site), de fMLP (10^{-9} moles/site) ou d'endotoxine (10^{-13} moles/site);

Polymixine B : 40 μ g/site;

- 25 Durée : 2 heures;

Moyenne $\pm$ erreurs types des réponses moyennes sur 3 lapins.

Figure 19 : effet de l'actinomycine D sur l'accumulation des neutrophiles :

- 30 Après stimulation des sites cutanés avec NAF (10^{-9} moles/site), fMLP (10^{-9} moles/site) ou de l'endotoxine (10^{-13} moles/site);

Durée : 2 heures;

- 35 Moyenne $\pm$ erreurs types des réponses moyennes sur 3 lapins.

- PAF : 1-O-hexadécyl-2-O-acétyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (facteur d'activation plaquettaire)
- MEM : milieu essentiel minimal d'Eagle (Seromed GmbH, Munich, RFA), complétement avec 25 µg/ml de néomycine, tamponné à pH 7,4 avec NaHCO₃ 25mM et HEPES 20mM
- 5 MEM-PPL : comme ci-dessus, contenant en plus 1% de solution de protéine plasmatique pasteurisée (5% de PPL-SRK, Swiss Red Cross Laboratory, Bern, Suisse) et 100 UI/ml de pénicilline et de streptomycine (Gibco A.G., Bâle, Suisse);
- 10 PBS : solution saline tamponnée au phosphate sans Ca²⁺ et Mg²⁺ (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM NaH₂PO₄ et 1,5mM KH₂PO₄, ajustée à pH 7,4)
- PBS-BSA : PBS complétement par 0,9mM de CaCl₂, 0,49mM de MgCl₂ et 2,5 mg/ml de BSA.
- 15 HEPES : acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
- PPL-SRK : solution de protéine plasmatique (Swiss Red Cross)
- NAF : facteur ou protéine d'activation des neutrophiles
- CX : cycloheximide
- 20 IL-1 : interleukine-1
- SOD : superoxyde
- C5a : anaphylatoxine
- CPC : verre poreux contrôlé
- PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide
- 25 GM-CSF : facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages
- CB : cytochalasine B (5 µg/ml)
- MES : acide 2-[N-morpholino]éthanesulfonique
- CLHP : chromatographie liquide haute pression
- 30 SDS : dodécylsulfate de sodium
- PARTIE I : production de NAF par monocytes humains
- Exemple 1 : production de NAF par monocytes humains stimulée avec LPS

35 Des monocytes humains sont isolés de la couche leucocytaire du sang de donneurs (Swiss Red Cross Laboratory, Bern,

Suisse) par centrifugation à travers un gradient de Ficoll-Paque. Ce procédé sépare les neutrophiles d'avec ce que l'on appelle les cellules mononucléaires, qui sont un mélange de monocytes (environ 20%) et de lymphocytes (environ 80%). On utilise trois préparations de monocytes : (i) la fraction totale des cellules monocléaires, (ii) des monocytes enrichis à partir de la fraction de cellules mononucléaires par adhérence et (iii) des monocytes purs à 90% séparés des lymphocytes par centrifugation d'élutriation (G. Garotta et coll., Biochem. Biophys. Res. Comm. **140** [1986] 948-954 et K.J. Clemetson et coll., J. Exp. Med. **161** [1985] 972-983). Les cellules sont cultivées dans MEM-PPL et stimulées avec des concentrations croissantes (0,1 ng à 1 µg/ml) de LPS. A différents instants, on prélève des parties aliquotes des milieux de culture et on détermine l'activité de NAF en terme de capacité à induire la libération d'élastase à partir de neutrophiles humains prétraités avec de la cytochalasine B (B. Dewald et coll., Biochem. Pharmacol. **36** [1987] 2505-2510).

Des cultures de cellules mononucléaires (5×10^6 cellules/ml) constituées de monocytes et de lymphocytes en un rapport d'environ 1:5 produisent du NAF lorsqu'elles sont stimulées avec LPS (10 ng/ml). Le NAF s'accumule dans le milieu en 24 heures et la production se stabilise entre 24 heures et 48 heures. Il ne se forme pas de NAF en l'absence de stimulus. La figure 1 montre les effets, en fonction du temps et de la concentration, de LPS déjà actif entre 0,1 ng/ml et 1 ng/ml.

On étudie la source de NAF en utilisant différentes préparations de cellules mononucléaires. La figure 2a montre la production de NAF dépendant de LPS par la fraction totale des cellules mononucléaires et par les monocytes sélectionnés à partir de celle-ci par adhérence. Ces résultats confirment que la production de NAF dépend de LPS et indiquent que le NAF est produit par les monocytes. La présence

de lymphocytes ne semble pas influencer la quantité de production de NAF. On obtient des résultats analogues avec des monocytes et des lymphocytes purifiés par élutriation. Comme l'indique la figure 2b, le NAF est produit par les monocytes mais pas par les lymphocytes.

Exemple 2 : production du NAF par des monocytes humains stimulés par PHA ou ConA

La fraction de cellules mononucléaires provenant de la couche leucocytaire du sang humain, séparée comme le décrit l'exemple 1, est cultivée dans les conditions indiquées dans l'exemple 1 et stimulée avec PHA (5 µg/ml) ou ConA (10 µg/ml). La production de NAF en fonction du temps est analogue à celle observée avec les cellules mononucléaires stimulées par 100 ng/ml de LPS. Un maximum est atteint au bout de 24 heures.

Exemple 3 : inhibition de la production de NAF par le cycloheximide

Le fait que le NAF ne soit pas libéré immédiatement par stimulation des monocytes, mais au contraire après une période de plusieurs heures, suivant la concentration du stimulus, suggère qu'une fois encore la synthèse protéinique est nécessaire et que la production du NAF est en fait induite par le stimulus. La nécessité d'une synthèse protéinique est démontrée par les expériences dans lesquelles la production de NAF est inhibée par l'addition de cycloheximide. Les résultats d'une expérience représentative sont indiqués sur le tableau 1.

Tableau 1

Inhibition de la production de NAF par le cycloheximide

Traitement	Production moyenne de NAF après		
	4 h	8 h	24 h
5 Aucun	0	0	0
LPS	726	2042	2633
LPS+CX	0	0	0
LPS+CX à 4 h	774	966	639
LPS+CX à 8 h	752	1884	1854

10 Le cycloheximide (CX, 10 µg/ml) est ajouté 4 ou 8 heures après le LPS (100 ng/ml). L'activité est présentée en unités de fluorescence, exprimant la libération d'élastase.

PARTIE II : purification du NAFExemple 4 : séparation du NAF et de la IL-1 par chromatographie sur phosphocellulose

15 Des cellules mononucléaires obtenues à partir de la couche leucocytaire du sang d'un donneur, comme le décrit l'exemple 1, sont cultivées dans MEM-PPL pendant 48 heures, en présence de 100 ng/ml de LPS dans des bouteilles de culture agitées (1,5 litres, 5×10^6 cellules/ml). Les surnageants de culture sont ensuite recueillis, centrifugés à 20 000 t/min pendant 20 minutes à 4° pour éliminer le matériel particulaire, et chargés sur une colonne de 10 ml de phosphocellulose (Whatman P11, 1,4x6 cm), équilibrée avec du tampon phosphate de potassium 20mM, pH 7,2, contenant 20mM de NaCl et 5% de glycérol. La colonne est lavée avec 30 ml du tampon ci-dessus, puis éluée avec 90 ml d'un gradient linéaire de concentration de NaCl (0,02M à 1,5M) dans le même tampon. Des fractions de 2 ml sont recueillies dans du polyéthylène-glycol à 0,1% et testées pour déterminer l'activité de NAF et de IL-1. L'absorbance à 280 nm est surveillée en continu et constitue une mesure des protéines.

25 La figure 3 montre les profils de distribution des protéines (absorbance à 280 nm) et deux activités biologiques, la libération de l'élastase mesurant l'activité de NAF et la

35

prolifération des thymocytes mesurant l'activité de IL-1. La plupart des protéines, ainsi que l'activité de IL-1, se retrouvent dans le volume écoulé total. L'élution avec un gradient linéaire de NaCl donne une certaine activité de IL-1, à une force ionique faible, suivie d'un pic d'activité de libération d'élastase correspondant au NAF, qui commence à éluer à 0,5M et atteint son maximum à 0,8M de NaCl. Le pic est symétrique et est précédé d'un petit épaulement. Une certaine matière absorbant les UV est éluee par le gradient salin; son profil ne coïncide toutefois pas avec les activités biologiques déterminées. Comme l'indique la figure 3, IL-1 et NAF peuvent être complètement résolus. Il n'y a pas d'activité de libération de l'élastase associée à IL-1 et pas d'activité produisant la prolifération des thymocytes associée à NAF. La récupération du NAF par fractionnement est proche de 100%, ce qui suggère que les milieux ne contiennent pas d'inhibiteurs ni d'activateurs.

Exemple 5 : purification de NAF par filtration sur gel

Un échantillon de 200 µl de NAF partiellement purifié par chromatographie sur phosphocellulose (exemple 4) est appliqué sur une colonne de CLHP TSK- G2000 SW (7,5x600 mm) avec une précolonne de TSK-GSWP (7,5x75 mm). Dans la colonne, circule NaHPO_4 100mM, pH 7,0, contenant 100mM de NaCl, à un débit de 0,5 ml/min. On utilise comme standards d'étalonnage de la sérum-albumine bovine (masse moléculaire 66200), de l'ovalbumine (masse moléculaire 42700), un inhibiteur de trypsine de soja (masse moléculaire 21500), de l'aprotinine (masse moléculaire 6500) et de l'actinomycine D (masse moléculaire 1255). Le NAF élué avec un pic légèrement asymétrique juste après l'aprotinine et bien au-dessus de l'actinomycine D. La masse moléculaire apparente du NAF est donc environ de 6500. Aucune activité de NAF n'est éluee avant ou après le pic décrit (figure 4).

Exemple 6 : purification du NAF par l'hydroxylapatite

Un regroupement de fractions obtenues par chromato-

phie sur phosphocellulose (exemple 4), d'un volume total de 15 ml (correspondant à environ 800 ml de surnageant de culture non fractionné) est dilué au 1/10 avec du tampon de charge (10mM de phosphate de sodium, pH 6,9, dans du polyéthylène-glycol 6000 à 0,1%) et chargé sur une colonne de 3 ml d'hydroxylapatite (Biogel HTP) équilibrée dans le tampon de charge. La colonne est lavée avec trois portions de 3 ml du tampon de charge, puis éluée avec le tampon de charge complémenté par NaCl 1M. Par cette opération, on récupère le NAF de la colonne. Une élution subséquente avec du tampon phosphate de sodium 0,5M, pH 6,9, ne donne pas d'activité de NAF supplémentaire (figure 5).

Exemple 7 : purification de NAF par héparine-Sepharose

Un échantillon de 1 ml de NAF partiellement purifié par chromatographie sur phosphocellulose (exemple 4) est chargé sur une colonne de 0,5 ml d'héparine-Sepharose 4B équilibrée dans du phosphate de sodium 10mM, pH 7,3, complémenté par du polyéthylène-glycol 6000 à 0,1% et du NaCl 50 mM. La colonne est lavée avec le même tampon, puis éluée avec du phosphate de sodium 10mM, pH 7,3, complémenté par NaCl 1,5M. Une quantité mineure de NAF est décelée dans le fluide écoulé total, par lavage de la colonne, mais la plupart de l'activité liée à la colonne est éluée avec le tampon de force ionique supérieure (figure 6).

Exemple 8 : purification de NAF par chromatographie liquide haute pression en phase inverse sur colonne de C4

Un échantillon de NAF purifié par chromatographie sur phosphocellulose (exemple 4), puis par purification sur hydroxylapatite (exemple 6), est appliqué à une colonne de C4 en phase inverse à large pores (Biorad RP 304). La colonne est éluée avec un gradient de 0 à 80% d'acétonitrile dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1%, avec un accroissement de 0,66%/min. Le débit est de 0,5 ml/min. Les fractions sont recueillies et séchées sous vide. Les résidus sont remis en suspension dans 100 µl de PBS contenant 0,1% de polyéthyl-

lène-glycol 6000 et testés pour déterminer l'activité de NAF. Le NAF élue avec un temps de rétention d'environ 60 minutes, ce qui correspond à environ 40% d'acétonitrile, sous forme d'un seul pic pointu (figure 7).

5 Exemple 9 : purification de NAF par chromatographie liquide haute pression en phase inverse sur colonne de CN-propyle

Un échantillon de NAF purifié par chromatographie en phase inverse comme le décrit l'exemple 8, séché sous vide et remis en suspension dans 100 µl de PBS contenant 0,1% de polyéthylène-glycol, est dilué avec un volume d'acide trifluoroacétique à 0,1% et appliqué sur une colonne de cyano(CN)-propyle à large pores Bakerbond (Baker Research Products, Phillipsburg, NJ, USA). La colonne est éluee avec un gradient allant de 0 à 50% de n-propanol dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1%, avec un accroissement de 0,41%/min. Le débit est de 0,5 ml/min. Les fractions sont recueillies et séchées sous vide. Les résidus sont remis en suspension dans 100 µl de solution saline tamponnée au phosphate contenant 0,1% de polyéthylène-glycol 6000 et testés pour déterminer l'activité du NAF. Le NAF élue en deux pics pointus, un pic majeur ayant un temps de rétention de 53 min, correspondant à 22% de n-propanol, et un pic mineur représentant moins de 30% de l'activité totale, avec un temps de rétention de 66 min, correspondant à 27,5% de n-propanol (figure 8).

25 Exemple 10 : chromatofocalisation de NAF

Un échantillon de 4 ml de NAF partiellement purifié par chromatographie sur phosphocellulose (exemple 4) est dialysé contre un tampon de départ constitué de chlorhydrate d'éthanolamine 25mM, pH 9,4, et de 0,1% de polyéthylène-glycol 6000, et chargé sur une colonne de PBE 94 (0,7x19 cm, Pharmacia) équilibrée avec le même tampon. La colonne est ensuite éluee avec 200 ml de polytampon 96-HCl (dilué au 1/10 avec de l'eau), pH 7,0, contenant 0,1% de polyéthylène-glycol 6000. Des fractions sont recueillies toutes les 10

minutes à un débit de 10-14 ml/h et dosées pour l'activité de NAF. La plupart de l'activité élue dans la région de pH 8,5 à pH 8,8 (figure 9).

PARTIE III : Caractérisation physicochimique et biologique de NAF

Exemple 11 : propriétés physicochimiques de NAF

Du NAF partiellement purifié obtenu par chromatographie sur phosphocellulose (exemple 4) est utilisé dans ces expériences. Après la chromatographie sur phosphocellulose, les fractions ayant la plus forte activité de NAF sont dialysées pendant une nuit à 4° contre PBS au moyen d'une membrane présentant une coupure de masse moléculaire de 1000 daltons. La préparation obtenue est ensuite soumise aux traitements suivants : a) incubation à 37° avec et sans trypsine, chymotrypsine ou protéinase K (100 µg/ml), suivie de l'addition d'un excès de BSA (2 mg/ml) pour stopper la protéolyse de NAF; b) chauffage à 56°, 80° ou 95° (comparé à 22° pour le témoin); c) exposition à pH 2 ou 10 (à 22°), suivie d'un ajustement du pH à 7,4 (en comparaison de pH 7,4 pour le témoin); d) exposition au chlorure de lithium 2M, au chlorure de guanidinium 6M, au 2-mercaptoéthanol à 1% ou au dodécylsulfate de sodium (SDS) à 0,5% pendant 3 h à 22°, suivie d'une dialyse pendant 24 h à 4° contre PBS. Lorsqu'on effectue les additions, on manipule les échantillons sans NAF de la même manière et on les teste pour étudier l'influence possible sur le dosage du NAF.

Comme l'indique le tableau 2, le NAF est remarquablement résistant à l'inactivation. Son activité est détruite par incubation avec différentes protéases, ce qui indique que le NAF est un polypeptide. En revanche, le NAF n'est pas facilement inactivé par des conditions de chaleur, de pH acide et alcalin ou par exposition au SDS. Une certaine inactivation est obtenue avec le 2-mercaptoéthanol, le chlorure de lithium et le chlorure de guanidinium.

rure de lithium et le chlorure de guanidinium.

Tableau 2
Propriétés physicochimiques de NAF

	Traitement	Conditions	Activité relative
5			
	Température	22°, 3 h	100
		56°, 1 h	82
		80°, 15 min	80
		95°, 5 min	66
10			
	pH 2,0	22°, 3 h	76
	pH 10,0	22°, 3 h	90
	SDS 0,5%	22°, 3 h	100
15	2-mercaptoéthanol 1,0%	22°, 3 h	30
	chlorure de lithium 2M	22°, 3 h	52
	chlorure de guanidinium 6M	22°, 3 h	68
	trypsine 100 µg/ml	37°, 4 h	100
		37°, 12 h	8
20			
	α-chymotrypsine 100 µg/ml	37°, 4 h	80
		37°, 12 h	1
	protéinase K 100 µg/ml	37°, 12 h	0

Exemple 12 : exocytose induite par le NAF (induction de la libération des granulations par le NAF dans les neutrophiles humains)

Des neutrophiles (5×10^6 /ml) en suspension dans PBS/BSA sont préincubés avec ou sans cytochalasine B (5 µg/ml) à 37° pendant 5 min. La libération des granulations est ensuite amorcée par addition du stimulus, par exemple un NAF ou un stimulus étalon. La réaction est stoppée 15 minutes plus tard par refroidissement rapide dans de la glace, suivie d'une centrifugation pour sédimenter les cellules. Les taux de protéines liées à la vitamine B12, de β-glucoronidase et de lactate-déshydrogénase sont déterminés dans les milieux

acellulaires et les culots cellulaires, et la libération de ces constituants est calculée en pourcentage de la teneur cellulaire totale (B. Dewalt et M. Baggiolini, Methods Enzymol. 132 [1986] 267).

- 5 Les effets du NAF sur la libération des protéines liées à la vitamine B12 et de la β -glucoronidase - qui sont respectivement les constituants des granulations spécifiques et azurophiles - sont résumés sur le tableau 3.

Tableau 3

10 Exocytose dépendant d'un stimulus des granulations des neutrophiles humains

Pourcent de libération de

Stimulus	CB	Protéines liées β -glucu- lactate-		
		à la vitamine B12	ronidase	déshydro- génase
15 aucun	-	6.0 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 2.5
NAF 50 μ l	-	12.9 $\pm$ 1.6	2.7 $\pm$ 1.3	5.8 $\pm$ 0.7
NAF 100 μ l	-	13.9 $\pm$ 2.1	3.0 $\pm$ 1.3	6.8 $\pm$ 2.2
20 fMLP 0,1 μ M	-	14.0 $\pm$ 0.9	2.3 $\pm$ 0.8	5.7 $\pm$ 1.1
aucun	+	10.0 $\pm$ 1.1	2.4 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 3.2
NAF 50 μ l	+	25.6 $\pm$ 3.4	7.9 $\pm$ 2.0	6.7 $\pm$ 1.6
NAF 100 μ l	+	26.8 $\pm$ 4.9	8.5 $\pm$ 1.7	7.3 $\pm$ 2.1
fMLP 0,1 μ M	+	35.6 $\pm$ 5.5	12.1 $\pm$ 4.4	5.3 $\pm$ 1.6
25 valeurs moyennes $\pm$ écart type				

- 25 Dans les neutrophiles normaux, le NAF induit l'exocytose des seules granulations spécifiques. Lorsque les cellules sont prétraitées avec de la cytochalasine B, on obtient toutefois une importante libération des deux types de granulations. Dans ces dernières conditions, il y a un parallèle
- 30 entre la libération de la β -glucoronidase et celle de l'élastase, marqueur utilisé pour tester l'activité du NAF (exemple 1). En termes quantitatifs, les propriétés du NAF induisant l'exocytose sont analogues à celles du peptide
- 35 chimiotactique fMLP. Aucun des stimuli ne provoque la libé-

qui indique que le dommage cellulaire est négligeable.

Exemple 13 : éclatement respiratoire induit par le NAF
(induction de la formation de superoxyde par le NAF dans les
neutrophiles humains)

5 La formation de superoxyde est mesurée à 37° par la réduction, sensible au SOD, du ferricytochrome c (M. Markert et coll., Methods Enzymol. 132 [1984] 267). Le mélange dosé (800 µl) est constitué par $0,75 \times 10^6$ cellules/ml de PBS-BSA contenant 85 µM de cytochrome c. Les changements d'absorbance sont enregistrés sur un spectrophotomètre à rangées de diodes Hewlett-Packard 8451A équipé d'un échangeur de cellules thermostaté à sept places. Le tableau 4 illustre la capacité du NAF à provoquer l'éclatement respiratoire dans les neutrophiles humains.

15 Tableau 4
Production de superoxyde dépendant de NAF par les
neutrophiles humains

Réduction du cytochrome c ⁺		
NAF	Vitesse maximale	Total en 3 min
(µl)	(nmole/min)	(nmole)
20 5	0.81	0.89
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
25 50	3.51 ± 0.69	3.10 ± 0.55
100	3.69	3.39

+ toutes les valeurs sont exprimées pour 10^6 cellules
valeurs moyennes ± écart type

30 On obtient une augmentation progressive de la vitesse maximale et de la quantité totale de production de superoxyde lorsque les quantités de NAF augmentent. Comme le montrent les expériences comparatives, les quantités de NAF provoquant les taux maximum de production de superoxyde correspondent à celles qui induisent l'exocytose maximale.

35

respondent à celles qui induisent l'exocytose maximale.

Exemple 14 : formation de H_2O_2 (comparaison de NAF avec fMLP et C5a comme stimuli de l'éclatement respiratoire dans les neutrophiles humains)

5 Les propriétés de NAF, fMLP et C5a comme stimuli de l'éclatement respiratoire sont comparées au moyen de l'évaluation de la production de superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène par les cellules stimulées. La formation de superoxyde est déterminée comme le décrit l'exemple 13. La
10 formation de peroxyde d'hydrogène est déterminée par chimiluminescence (M.P. Wymann et coll., Anal. Biochem. 165 [1987] 371-378). Le mélange dosé, constitué de PBS-BSA contenant 0,1M d'azoture de sodium, 0,01mM de luminol, 9 U/ml de peroxidase de raifort et 10^6 neutrophiles, est
15 préincubé pendant 10 min à 37° et la réaction est démarrée par addition du stimulus à l'aide d'une microseringue.

La figure 10 montre la formation de superoxyde induite par l'élévation des quantités de NAF. Du fait de son démarrage rapide, de sa vitesse élevée et de sa stabilisation
20 précoce, la réponse au NAF ressemble étroitement à celle produite par fMLP ou C5a. La réponse au NAF est remarquablement améliorée par prétraitement des cellules avec un PAF (figure 10), qui améliore également la production de superoxyde induite par fMLP ou C5a. Une comparaison directe des
25 réponses à NAF, fMLP et C5a est indiquée sur la figure 9. Les enregistrements par chimiluminescence de la vitesse de formation de H_2O_2 en fonction du temps soulignent les similitudes des réponses. Ces mesures, ainsi que d'autres, montrent en outre que le temps entre l'addition du stimulus
30 et le début de la production de H_2O_2 induite par NAF, fMLP et C5a a des valeurs identiques et est d'environ 2 s, comme il a été rapporté antérieurement pour fMLP, C5a, PAF et le leukotriène B_4 (M.P. Wymann et coll., J. Biol. Chem. 262 [1987] 12048). Les analogies qualitatives et quantitatives
35 de la réponse des neutrophiles au NAF, au fMLP et au C5a in-

diquent que le NAF active les neutrophiles en se liant à un récepteur de surface et se comporte ainsi comme un agoniste récepteur.

Exemple 15 : distinction entre NAF et C5a

5 Comme l'indique l'exemple 14, le profil d'activité du NAF vis-à-vis des neutrophiles humains est analogue à celui de la C5a. Les analogies entre ces deux peptides s'étendent aux propriétés physicochimiques discriminatoires comme la résistance à la chaleur et aux acides. Comme la C5a et le
10 NAF ont des effets analogues sur les neutrophiles, il faut effectuer d'autres expériences pour distinguer entièrement entre les deux. Des échantillons de NAF et de C5a sont exposés à du sérum humain frais. On sait que ce traitement transforme la C5a en son dérivé désarginylique relativement
15 inactif par clivage à travers une carboxypeptidase. Comme le montre la figure 11, le traitement au sérum abolit complètement l'activité de la C5a mais n'affecte pas celle du NAF. Cela montre que les deux agents ont des structures différentes.

20 Exemple 16 : preuve que le NAF possède son propre récepteur spécifique sur les neutrophiles

Lorsqu'on stimule des neutrophiles deux fois avec une même quantité du même agoniste récepteur (par exemple fMLP) et que l'on enregistre la production de superoxyde comme mesure de la réponse des neutrophiles, la seconde stimulation
25 est pratiquement inactive. En revanche, lorsqu'on utilise l'un après l'autre des agonistes agissant sur différents récepteurs (par exemple la fMLP suivi de la C5a) ces stimulations donnent une réponse normale. Des expériences de ce type sont donc utilisées pour déterminer si le NAF agit par
30 son propre récepteur ou par un récepteur également utilisé par d'autres agonistes.

La figure 12a montre que les neutrophiles répondent normalement à la fMLP après une première provocation avec le
35 NAF ou la C5a. Sur la figure 12b, sont indiqués les résultats

tats d'une stimulation répétée avec le NAF et la C5a. Les cellules sont stimulées d'abord avec le NAF et la C5a à des concentrations qui provoquent environ la même quantité de formation de superoxyde, puis une seconde fois avec le même stimulus ou l'autre stimulus. Lorsqu'on applique deux fois le même agoniste, les cellules ne répondent pas à la seconde stimulation. En revanche, on obtient une réponse normale à la C5a dans les cellules provoquées d'abord avec le NAF et au NAF dans les cellules provoquées d'abord avec la C5a. Comme les neutrophiles présentent une désensibilisation complète à l'un ou l'autre stimulus, mais pas de désensibilisation croisée, le NAF et la C5a semblent exercer leurs effets stimulants via des récepteurs non apparentés, ce qui indique qu'ils sont de structure différente. Des combinaisons du NAF avec le PAF, la fMLP et le leucotriène B₄ ne donnent pas non plus de désensibilisation croisée. NAF agit donc par l'intermédiaire d'un récepteur sélectif, inconnu jusqu'à présent.

Exemple 17 : accumulation des neutrophiles et fuite plasmatique induites par le NAF chez le lapin

On examine les réponses inflammatoires dans la peau de lapins albinos néo-zélandais conscients de 2,0 à 2,5 kg. Les érythrocytes dans le sang des lapins donneurs sont sédimentés avec de l'hydroxyéthylcellulose (Polysciences, Warrington, Pa.) et les neutrophiles contenus dans le plasma résultant riche en leucocytes sont purifiés (>94% de neutrophiles) par centrifugation à gradient de densité, sur Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suède). Les cellules sont remises en suspension dans une solution de Tyrode exempte de Ca²⁺ et de Mg²⁺, contenant du plasma pauvre en plaquettes à 10% en concentration de 10⁶ leucocytes/ml et marquée pendant 15 min à la température ambiante avec 40 µCi de ¹¹¹indium-oxine (Amersham) pour 10⁶ cellules. Les cellules marquées sont lavées par centrifugation à travers un plasma pauvre en plaquettes à 10% et environ 10⁶ cellules par récepteur sont mé-

langées avec 10 μ Ci de sérum-albumine humaine marquée à l'iode 125 (Amersham) et injectées par voie intraveineuse dans la veine auriculaire latérale des lapins dont on étudie les lésions inflammatoires. On effectue ensuite des injections intradermiques d'agents inflammatoires et on sacrifie les animaux 2 h plus tard dans les études avec l'actinomycine D et la polymyxine B et 4 h plus tard dans les expériences de relation dose-effet. Au milieu de la période pendant laquelle les cellules radiomarquées sont en circulation, on effectue un prélèvement de sang et on détermine les activités spécifiques des neutrophiles et du plasma dans le sang. La radioactivité dans les lésions inflammatoires, à la fin de chaque expérience, est déterminée dans un compteur gamma multicanaux, l'activité dans les sites cutanés témoins est soustraite et le nombre absolu de neutrophiles et le volume de plasma accumulé dans les lésions inflammatoires sont calculés pour les activités spécifiques. Les nombres de neutrophiles dans les lésions inflammatoires sont normalisés entre les animaux par expression des résultats en nombre de cellules par 10^6 neutrophiles circulant par ml de sang périphérique, selon la méthode de Cybulsky et coll., Am. J. Pathol. 124 [1986] 367.

Le NAF recombinant obtenu comme le décrit l'exemple 19 est dissous à 400 μ g/ml dans un milieu essentiel minimal (50mM) plus 0,45M de NaCl (pH 6,5). De l'endotoxine (E. coli sérotype 055:B5, Sigma, St. Louis, Mo.) est dissous dans du sérum physiologique normal apyrogène. De la fMLP est dissoute dans du diméthylsulfoxyde à 10^{-2} M et diluée jusqu'aux concentrations de travail dans PFS. On dissout de la polymyxine B et de l'actinomycine D dans 1 ml d'éthanol et on dilue 20 fois en mélangeant avec le NAF, l'endotoxine ou la fMLP dans PFS. Dans les études sur l'inhibition des réponses inflammatoires, on injecte 40 μ g de polymyxine B et 10^{-7} moles d'actinomycine D par site cutané avec 10^{-6} moles d'endotoxine. Dans toutes les expériences, on injecte par

voie intradermique 0,2 ml d'agents inflammatoires par site à travers des aiguilles de diamètre 26, en faisant 5 injections de chaque traitement pour chaque animal.

Le NAF induit une augmentation, dépendante de la dose, de la fuite plasmatique (figure 16) et une accumulation des neutrophiles (figure 17) sur la gamme de doses testées (10^{-11} à 10^{-9} moles par site). A titre comparatif, l'endotoxine provoque une fuite plasmatique (figure 16) et une accumulation des neutrophiles (figure 17) d'intensité comparable, à 10^{-13} moles par site. Chez 5 lapins, le NAF est 3 à 10 fois plus puissant que la fMLP, comme stimulus pour la fuite plasmatique et l'accumulation des neutrophiles. L'accumulation des neutrophiles induite par dilution du tampon utilisé pour dissoudre le NAF jusqu'à la concentration présente dans les solutions fournissant 10^{-9} moles par site ne diffère pas des réponses données par les sites ne recevant que PSF seul. La possibilité que l'activité de la préparation du NAF puisse être due à une impureté endotoxine est examinée par injection de polymyxine B (40 μ g/site) avec du NAF, de la fMLP ou de l'endotoxine. La polymyxine B provoque une inhibition de 84% de la réponse à l'endotoxine (10^{-13} moles) mais est sans effet sur l'accumulation des neutrophiles induite par le NAF (10^{-9} moles) ou la fMLP (10^{-9} moles) (figure 18).

L'injection d'un inhibiteur non réversible de transcription d'ARN, l'actinomycine D (10^{-7} moles/site), avec 10^{-13} moles d'endotoxine, provoque une inhibition de 90% de l'accumulation des neutrophiles (figure 19). En revanche, l'actinomycine D n'a aucun effet sur l'accumulation des neutrophiles induite par le NAF (10^{-9} moles) ou par la fMLP (10^{-9} moles) (figure 19).

Les résultats indiquent que le NAF est actif in vivo et induit une accumulation, dépendante de la dose, des neutrophiles et une fuite de plasma dans les lésions inflammatoires. L'activité molaire du NAF est comparable à celle

élevée que celle de la fMLP. L'accumulation des neutrophiles induite par le NAF n'est pas inhibée par injection intradermique simultanée d'un inhibiteur de synthèse protéinique (actinomycine D). Le NAF agit ainsi directement, comme un agoniste chimiotactique tel que fMLP et contrairement à l'endotoxine.

Exemple 18 : exocytose induite par le NAF (effet sur les neutrophiles du lapin) :

Des neutrophiles de lapin sont isolés du sang périphérique (obtenu de la veine auriculaire ou de l'artère auriculaire) par sédimentation dans du dextran, suivie d'une centrifugation à gradient de densité de Hypaque-Ficoll. On utilise un NAF naturel purifié.

Conditions d'exocytose : $0,6 \times 10^6$ cellules (dans un volume total de 0,15 ml) prétraitées avec de la cytochalasine B pendant 5 minutes à 37° sont stimulées avec du NAF (0,1 - 100 nM) ou de la fMLP (100 nM) pendant 15 min. On dose, dans le milieu acellulaire, la N-acétyl- β -glucosaminidase, qui est un marqueur de granulations azurophiles. Les résultats sont indiqués sur le tableau 5.

Tableau 5

Exocytose induite par NAF

Stimulus	Concentration (nM)	N-acétyl- β -glucosaminidase (pmole/min)
aucun		41
NAF	0.1	53
	1.0	99
	10.0	139
	100.0	157
fMLP	100.0	181

PARTIE IV : NAF Recombinant

Exemple 19 : synthèse et expression de NAF dans E. coli

a) Synthèse et purification des oligonucléotides

Les oligonucléotides ON-1 à ON-6 (voir figure 13) sont synthétisés dans un synthétiseur d'ADN automatisé au moyen

d'une chimie standard avec, comme monomères, des nucléosides de 3'- β -cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoamidite, sur un support solide comme du gel de silice Fractosil ou du verre poreux contrôlé (VPC) (S.L. Beaucage et M.H. Caruthers, Tetr. Letters 22 [1981] 1859; N.D. Sinha et coll., Nucleic Acides Res. 12 [1984] 4539).

Les matières détritillées sont séparées du support par un traitement de 2 heures avec de l'ammoniaque à 25% à la température ambiante, tous les groupes protecteurs sont éliminés par chauffage de la solution ammoniacale pendant 20 heures à 55° et les produits sont lyophilisés. La séparation des matières brutes s'effectue par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) avec 12% d'acrylamide, 0,3% de bis-acrylamide, 7M d'urée, 0,089M de tris-borate, 0,089M d'acide borique, 0,002M d'EDTA à 20 V/cm. Les oligonucléotides entiers sont localisés par image UV sur des plaques de gel de silice fluorescent, les parties comportant les gels sont découpés et électro-élués dans une chambre d'élution. Les solutions concentrées sont dessalées sur une colonne de Biogel P2 (30x0,9 cm), par élution avec de l'éthanol à 10%, et lyophilisées. Les échantillons de ON-1 à ON-6 sont marqués radioactivement avec ^{32}P - γ -ATP et de la polynucléotide-kinase. L'analyse par PAGE et l'autoradiographie confirment qu'elles sont homogènes. Les séquences correctes sont confirmées par séquençage de Maxam-Gilbert et les oligonucléotides sont immobilisés sur un papier filtre modifié (A. Rosenthal et coll., Nucleic Acids Res. 13 [1985] 1173-1184).

b) Recuit et ligature

Pour le recuit et la ligature, des portions de 250 pmoles des oligonucléotides sont phosphorylées avec 4 μCi de ^{32}P -ATP (5000 $\mu\text{Ci}/\text{mmole}$) et 9 unités de polynucléotide-kinase dans 20 μl de tampon kinase (T. Maniatis et coll., Molecular Cloning, A Laboratory Manual [1982], Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) pendant 40 min à 37°, opération suivie d'une poursuite de 20 min avec 5 nmoles d'ATP non

marqué. La réaction est stoppée avec 1 μ l d'EDTA 0,5M à 70°. Les oligonucléotides phosphorylés sont purifiés par adsorption sur des cartouches de NENSORB 20 (Du Pont) et élution avec de l'éthanol à 20% et le rendement est d'environ 90%.

- 5 Le recuit et la ligature simultanés de quantités égales de 30 à 100 pmoles de ON-2 à ON-5 5'-phosphorylés et de ON-1 et ON-6 non phosphorylés s'effectue dans 25 μ l de tampon (125 mM Tris-HCl, pH 7,6) contenant 25nM de $MgCl_2$. Le mélange est
- 10 chauffé à 90° pendant 4 min, refroidit à 14° en 3 h et incubé pendant 14 h supplémentaires à 14°. Le volume est ajusté à 60 μ l avec 50nM de Tris-HCl, pH 7,6, 10mM de $MgCl_2$, 10mM de dithiothréitol, 1mM d'ATP, 0,1 mg/ml de sérum-albumine bovine contenant 1600 à 2000 unités de T4-ligase. La
- 15 ligature est réalisée pendant 14 h à 14° et stoppée par addition de 1 μ l d'EDTA 0,5M et chauffage à 70°. Après extraction au phénol, la solution aqueuse est amenée à 0,3M d'acétate de sodium, 0,01M d'acétate de magnésium, l'ADN est précipité avec de l'éthanol et les produits sont purifiés par
- 20 PAGE (8% d'acrylamide, urée 7M) avec une charge maximale de 10 pmoles d'ADN par fente de 1,5 cm d'un gel de 0,5 mm d'épaisseur. Le produit de longueur correcte est identifié par autoradiographie, le segment de gel est excisé et l'ADN est électroélué pendant 6 h à 200 V dans du Biotrap BT100 et précipité dans l'éthanol, pour donner un rendement final de
- 25 5 à 8 pmoles d'ADN double brin purifié par 100 pmoles d'oligonucléotide.

c) Clonage du gène synthétique

- Un échantillon de 110 ng du gène de NAF synthétique isolé est ligaturé avec 260 ng d'ADN plasmide pBS M13 découpé par SphI/BamHI purifié sur gel d'agarose (Stratagene).
- 30 Un dixième de ce mélange de ligature est utilisé pour transformer 200 μ l de cellules 5K de souche E. coli rendues compétentes par la méthode de D. Hanahan, J. Mol. Biol. 166 [1983] 557-580 et environ 320 colonies résistantes à l'ampicilline sont produites par ng d'ADN fourni. Six clones
- 35

sont choisis et cultivés pendant une nuit dans un milieu bouillon L/ampicilline. L'ADN plasmide est préparé (H.C. Birnboim et J. Doly, Nucleic Acids Res. 7 [1979] 1513-1523) et appliqué sur du gel d'agarose à 1%. De l'ADN pur enroulé en super-hélice est isolé par électrophorèse des bandes dans du papier 3MM (Whatman) et centrifugation dans des tubes d'Eppendorf. Après extraction au phénol et précipitation dans l'éthanol, l'ADN est séquencé par la méthode de terminaison des chaînes plasmidiques dénaturées par une base, au moyen d'amorces T3 et T7 (Stratagene) et de l'enzyme séquenase (E.J. Chen et coll., DNA 4 [1985] 165-170).

Parmi les 6 clones, trois, à savoir les clones 1, 2 et 6, contiennent la séquence de NAF correcte. Les trois autres clones comportent des erreurs : le clone 3 contient un résidu G supplémentaire inséré après le codon d'initiation ATG, ce qui fait que la totalité de la séquence de codage est déphasée. Dans le clone 5, C est remplacé par T en position 34, ce qui fait qu'un codon d'arrêt se forme après l'acide aminé n° 6. Enfin, le clone 4 n'a pas de G en position 13. Cette position ne figure pas dans la séquence codante mais dans la région entre le codon d'initiation et le site de liaison au ribosome.

Le plasmide contenant la séquence correcte (clone 6) est découpé avec les enzymes de restriction ClaI et BamHI et le fragment à 237 bp est isolé du gel d'agarose par élution dans du papier 3 MM comme ci-dessus. Ce fragment est ensuite ligaturé à un fragment d'ADN linéaire contenant, de gauche à droite :

- un site d'endonucléase de restriction BamHI;
- une séquence de terminaison de transcription synthétique (CCCGGGCGATGAATCGCCCGGG ou CCCGGGCGATTCATCGCCCGGG);
- une section de plasmide pAT153, depuis le site SalI au nucléotide n° 651, en passant par l'origine de répllication et le gène de résistance à l'ampicilline, jusqu'au site EcoRI au nucléotide n° 0;

- le promoteur E. coli tryptophane;
- un site ClaI situé approximativement à 5 paires de bases en aval du site de liaison au ribosome dans le promoteur.

Le plasmide d'expression résistant à l'ampicilline résultant, désigné par p(NAF)-6T3 (figure 14) est transformé en cellules E. coli de souche HB101.

La séquence de terminaison de la transcription n'est pas essentielle pour l'expression de NAF dans E. coli. Elle permet une interruption efficace de l'ARNm-NAF produit par la E. coli-polymérase et accroît ainsi le rendement de l'expression. Le NAF peut cependant aussi être exprimé dans le même vecteur sans la séquence de terminaison de la transcription, mais le rendement est alors, cependant, 30 à 50% plus faible.

Ce gène synthétique codant pour le NAF, ainsi que d'autres gènes codant pour la même séquence peptidique de base, mais ayant une séquence nucléotidique différente ou codant pour des peptides de longueurs variables, peut également être exprimé dans E. coli à l'aide d'autres promoteurs, par exemple les promoteurs lambda PL ou les promoteurs E. coli Lac ou Tac. Les gènes peuvent également être introduits à l'aide d'autres vecteurs et exprimés dans d'autres organismes, par exemple dans des levures, des champignons, des cellules animales, des lignées cellulaires bactériennes, des végétaux et dans des organismes transgéniques supérieurs.

c) Expression

L'expression de p(NAF)-6T3 dans E. coli HB 101 est effectuée de la manière suivante.

Préculture 1 : on ajoute 50 µl d'une culture dans le glycérol de la lignée cellulaire maintenue à -20° à 10 ml de milieu LB stérile (10 g/l de tryptone, 5 g/l d'extrait de levure, 10 g/l de NaCl) contenant 10 µg/ml d'ampicilline. La culture est agitée dans un incubateur pendant 8 h à 37° et à 200 t/min.

Préculture 2 : 8 ml du milieu de préculture 1 sont inoculés

Préculture 2 : 8 ml du milieu de préculture 1 sont inoculés dans 1 l de milieu M9 (J.H. Miller Experiments in Molecular Genetics [1972], Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., p. 431-433) contenant 0,2% de glucose, 0,5% de casaminoacides (Difco), 25 mg/l de tryptophane et 100 mg/ml d'ampicilline. Cette culture est agitée dans un incubateur pendant 15-16 h à 37° et à 200 t/min.

Fermentation : la fermentation principale est effectuée dans un fermenteur de 70 l, à un volume de travail de 35 l. On utilise le même milieu que pour la préculture 2, sauf que l'on n'ajoute que 5 mg/l de tryptophane. On inocule la préculture 2 dans ce milieu et on poursuit la fermentation à 37° jusqu'à ce que l'on obtienne une densité optique de 2,8 à 600 nm (DO_{600}). Lorsque la DO_{600} atteint 2,8, on ajoute de l'acide indole-acrylique dans de l'éthanol jusqu'à une concentration finale de 20 mg/l. Au bout de 4 h, la DO_{600} est passée à 13,5; la centrifugation donne un culot de 516 g.

d) Purification du NAF recombinant

Des cellules de E. coli contenant du NAF recombinant sont stockées à -20°. Des lots de 100 g sont lavés avec 100 ml de Tris-HCl 20mM, pH 8,0, contenant 50mM de NaCl, remis en suspension dans 250 ml du même tampon et rompus sous 2500 psi dans une presse française (Aminco). Après centrifugation à 47 000xg pendant 40 min, le culot est remis en suspension dans le même tampon, recentrifugé et stocké à -20°. Des portions de 10 g sont mises en suspension dans 100 ml de MES-NaOH 50mM, pH 6,5, 6M de chlorhydrate de guanidine, agitées pendant 1 h et dialysées contre de l'acide acétique à 0,5%. Le dialysat est clarifié par centrifugation et chargé en parties aliquotes sur une colonne de Mono-S (HR 5/5, Pharmacia). La colonne est lavée avec MES-NaOH 50mM, pH 6,5, contenant 0,2M de NaCl, et éluée à une vitesse de 0,5 ml/min avec un gradient linéaire dans le même tampon (0,2 à 0,5M de NaCl). Les fractions ayant la teneur en NAF la plus élevée

en phase inverse à larges pores (Vydac C4TP 0,46x125 mm) dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1% et avec un gradient de 20 à 60% d'acétonitrile, à un débit de 1 ml/min.

PARTIE V : Identité du NAF naturel et du NAF recombinant

5 Exemple 20 : identité physicochimique

Le NAF récupéré par CLHP (voir exemple 19) est considéré comme étant pur sur la base de deux critères : des gels de SDS-polyacrylamide colorés à l'argent présentent une seule bande coïncidant avec le NAF naturel (1 µg de NAF re-

10 combinant provenant de la fraction du pic CLHP dans la bande 2 contre 1 µg de NAF naturel dans la bande 3, avec les étalons de masse moléculaire cytochrome c [12,5 kd] et aprotinine [6,5 kd] dans la bande 1), et la dégradation d'Edman du

15 peptide segmenté à l'acide formique donne des séquences aminoterminales et carboxyterminales correspondant à celles du NAF naturel à 72 acides aminés. L'analyse des acides aminés est en accord avec la composition attendue de la séquence. On ne trouve pas de méthionine, ce qui indique que ce résidu est probablement éliminé par les bactéries.

20 Exemple 21 : identité biochimique

Du NAF naturel et du NAF recombinant sont testés en parallèle sur des neutrophiles humains. Ils provoquent des changements pratiquement identiques de Ca^{2+} libre cytosolique, donnant une élévation maximale à une concentration

25 aussi faible que 3nM (figure 15). On obtient avec les deux préparations une réponse à l'éclatement respiratoire dépendant de la concentration presque identique dans l'intervalle de 1 à 30nM évaluée par chimioluminescence. L'équivalence entre le NAF naturel et le NAF recombinant est égale-

30 ment reflétée par des mesures de chimiotaxie et d'exocytose. La migration chimiotactique s'observe entre 0,1 et 10nM, avec un effet maximal à 1nM (tableau 6). Avec l'un ou l'autre peptide, on observe une libération significative de protéine liée à la vitamine B₁₂ à partir des granulations

35 spécifiques à 0,3nM et de la β-glucuronidase à partir des

spécifiques à 0,3nM et de la β -glucuronidase à partir des granulés azurophiles à 1nM. Cet effet augmente avec la concentration du stimulus, comme l'indique le tableau 7.

Tableau 6

5	<u>Chimiotaxie des neutrophiles induite par le NAF</u>		
	NAF (nM)	nat	rec
	0.1	98 $\pm$ 6	88 $\pm$ 6
	1.0	123 $\pm$ 6	124 $\pm$ 3
10	10.0	127 $\pm$ 3	126 $\pm$ 4

Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ écart type de migration du front d'attaque, en μ m (n=3). La migration aléatoire en l'absence d'un stimulus chimiotactique est de 61 $\pm$ 5 μ m.

15 nat = NAF naturel rec = NAF recombinant

Tableau 7

Exocytose induite par le NAF

20	NAF (nM)	Protéine liée à la vitamine B ₁₂		β -glucuronidase	
		nat	rec	nat	rec
	0.3	7.8 $\pm$ 3.6	5.4 $\pm$ 2.0	1.1 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.6
	3.0	21.9 $\pm$ 4.2	20.2 $\pm$ 3.7	8.2 $\pm$ 1.9	7.1 $\pm$ 1.7
	30.0	28.4 $\pm$ 3.7	28.1 $\pm$ 3.8	14.2 $\pm$ 2.1	12.9 $\pm$ 2.9

25

Le pourcentage de libération à partir de neutrophiles prétraités à la cytochalasine B (4x10⁶ cellules/ml) est stimulé pendant 10 min avec du NAF naturel (nat) ou du NAF recombinant (rec). La libération provenant des témoins non stimu-

30 lés correspondants est déduite. Moyennes $\pm$ écart type (n=3).

R E V E N D I C A T I O N S

- 1.- Facteur d'activation des neutrophiles (NAF).
- 2.- NAF selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est dérivé de monocytes humains.
- 5 3.- NAF selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il possède la séquence d'acides aminés complète ci-dessous :

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-
10 Leu-Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lys-
Phe-Leu-Lys-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser.
- 4.- NAF selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'extrémité aminoterminal est prolongée comme ci-dessous :
15 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-
- 5.- NAF selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'extrémité aminoterminal est raccourcie comme ci-dessous :
20 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-
- 6.- NAF selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'extrémité aminoterminal est raccourcie comme ci-dessous :
25 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-
- 7.- NAF selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un mélange de protéines possédant deux ou plus des séquences indiquées dans les revendications 3 à 6.
- 8.- NAF selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un mélange d'environ 70% du NAF identifié dans la revendication 3, d'environ 17% du NAF identifié dans la revendication 4, d'environ 8% du NAF identifié dans la
35 la revendication 4, d'environ 8% du NAF identifié dans la

- revendication 5, et d'environ 5% du NAF identifié dans la revendication 6.
- 9.- NAF selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est synthétique.
- 5 10.- NAF selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est recombinant.
- 11.- NAF selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est biologiquement actif.
- 12.- NAF selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il
- 10 possède l'une quelconque des séquences indiquées dans l'une quelconque des revendications 3 à 6.
- 13.- NAF selon la revendication 2 ou 9, caractérisé en ce qu'il a une masse moléculaire d'environ 8500, une masse moléculaire apparente d'environ 6500 sur SDS-PAGE et un point
- 15 isoélectrique d'environ 8,6.
- 14.- Procédé de préparation du NAF de la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la purification par chromatographie du surnageant de cultures de monocytes humains et la récupération.
- 20 15.- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend une chromatographie sur phosphocellulose.
- 16.- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend une chromatographie sur hydroxylapatite.
- 17.- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce
- 25 qu'il comprend une chromatographie sur héparine-Sepharose.
- 18.- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend une CLHP en phase inverse sur une colonne de C4.
- 19.- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce
- 30 qu'il comprend une CLHP en phase inverse sur colonne de CN-propyle.
- 20.- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend une combinaison de deux ou plus des méthodes chromatographiques des revendications 15 à 19.
- 35 21.- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce

- qu'il comprend la purification par chromatofocalisation.
- 22.- Procédé de préparation du NAF de la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend la synthèse, la purification et la ligature des oligonucléotides correspondants, le
- 5 clonage du gène de NAF synthétique résultant, son expression et la récupération et la purification.
- 23.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression dans E. coli.
- 24.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce
- 10 qu'il comprend l'utilisation de l'un quelconque des oligonucléotides ON-1 à ON-6.
- 25.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend l'utilisation du vecteur d'expression p(NAF)-6T3.
- 15 26.- Vecteur d'expression p(NAF)-6T3 et ses équivalents convenant pour l'expression dans E. coli du NAF de la revendication 10.
- 27.- ADN possédant la séquence nucléotidique indiquée sur la figure 13 et ses équivalents convenant pour l'expression
- 20 dans E. coli du NAF de la revendication 10.
- 28.- ADN selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un ADNc.
- 29.- Lignée cellulaire transformée par un ADN codant pour le NAF de l'une quelconque des revendications 3 à 6.
- 25 30.- NAF selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est utilisable en thérapeutique.
- 31.- NAF selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est utilisable dans le traitement
- 30 des troubles qui sont accompagnés ou provoqués par une modification du nombre ou de l'état d'activation des neutrophiles-cellules polymorphonucléaires.
- 32.- NAF selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est utilisable dans le traitement
- des troubles dans lesquels une élévation du nombre ou de
- 35 l'état d'activation des neutrophiles-cellules polymorphonu-

cléaires conduit à une amélioration clinique.

33.- NAF selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est utilisable dans les infections bactériennes, mycoplasmaïques, par les levures et les champi-
5 gnons ou dans les infections virales.

34.- NAF selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est utilisable dans les maladies inflammatoires.

35.- NAF selon l'une quelconque des revendications 1 à 13,
10 caractérisé en ce qu'il est utilisable dans le psoriasis, les affections arthritiques ou l'asthme, ou dans les troubles présentant une numération des neutrophiles anormalement faible et/ou un taux de neutrophiles anormalement faible, ou dans la préparation d'antagonistes utilisables dans ces
15 indications.

36.- NAF selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 25.

37.- Composition pharmaceutique caractérisé en ce que un NAF
20 selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, avec un véhicule ou un diluant pharmaceutiquement acceptable.

25

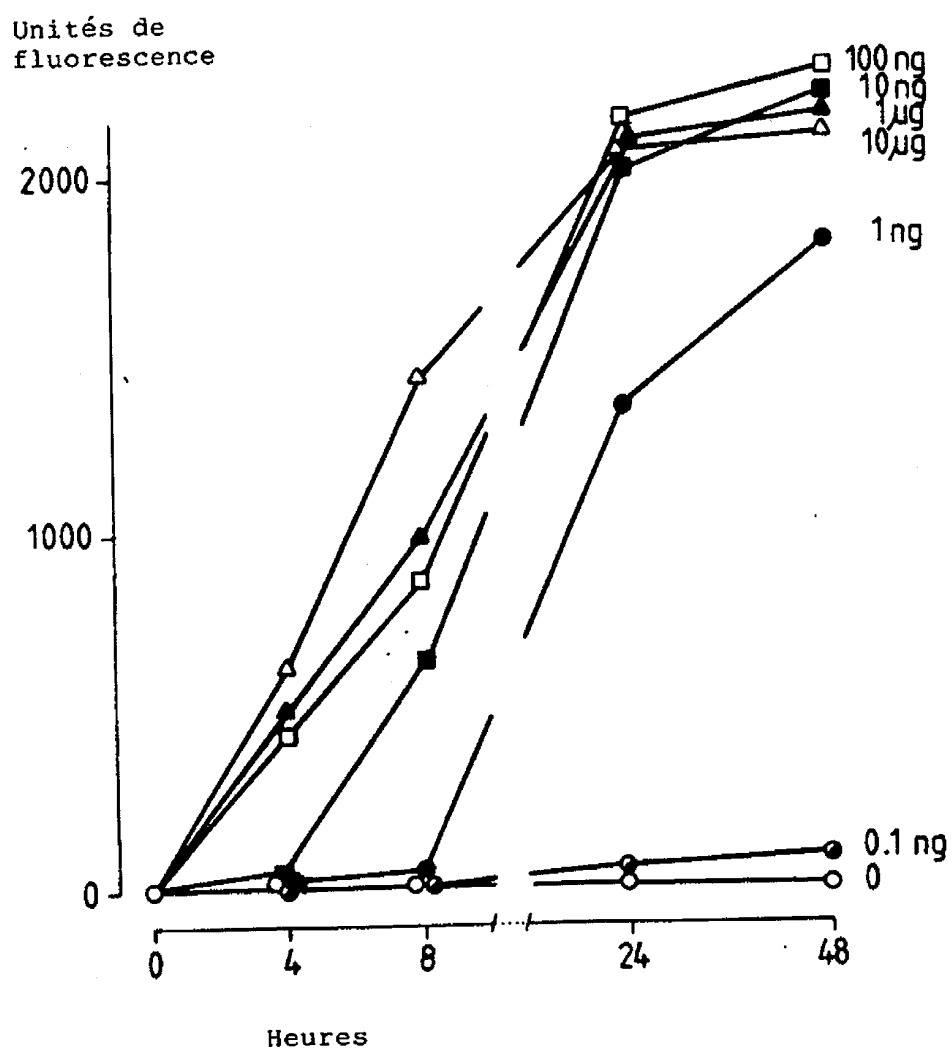
30

35

45

FIG. 1

Figure 1: production de NAF induite par LPS



46
FIG. 2

Figure 2: production de NAF par des phagocytes mononucléaires mais pas par des lymphocytes

Activité
relative

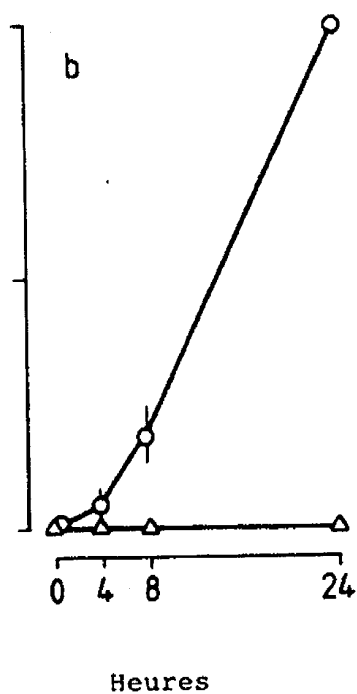
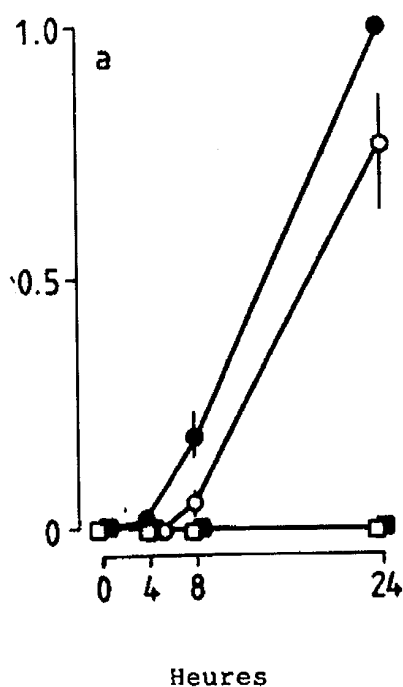
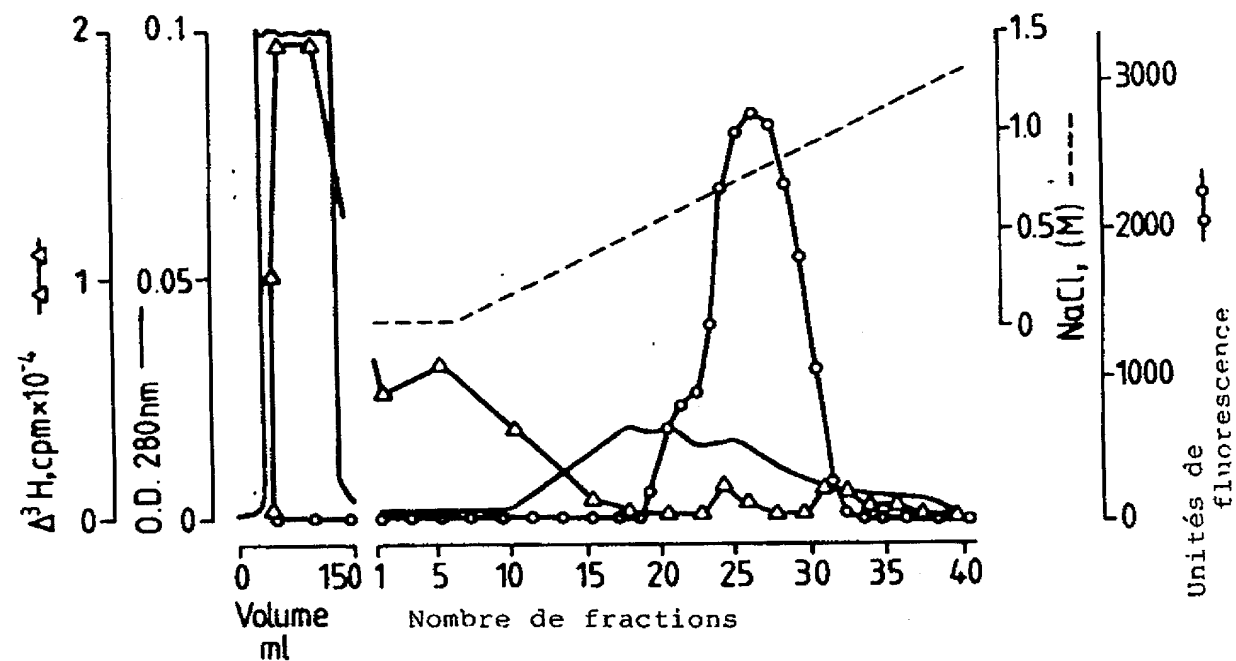


FIG. 3

Figure 3: purification partielle du NAF par chromatographie sur phosphocellulose



⁴⁸
FIG. 4

Figure 4: purification du NAF par filtration sur gel en CLHP

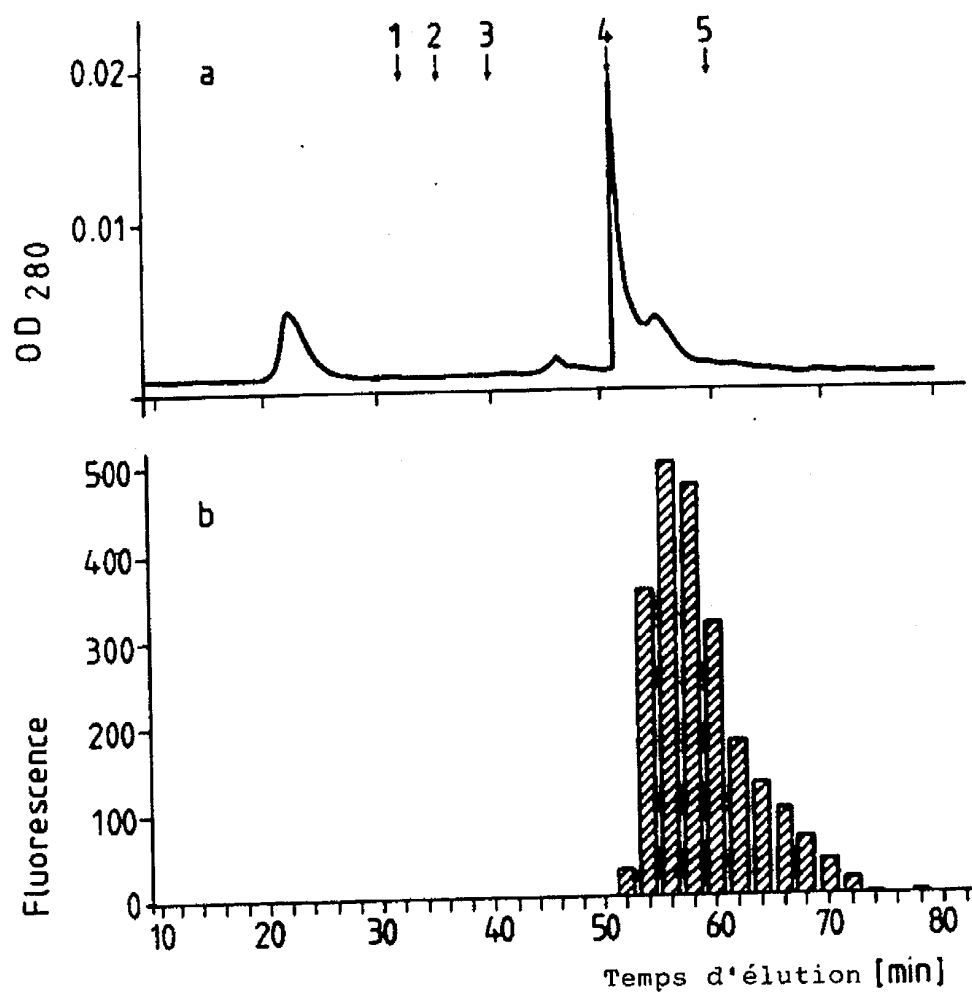


FIG. 5

Figure 5: purification du NAF par chromatographie sur hydroxulapatite

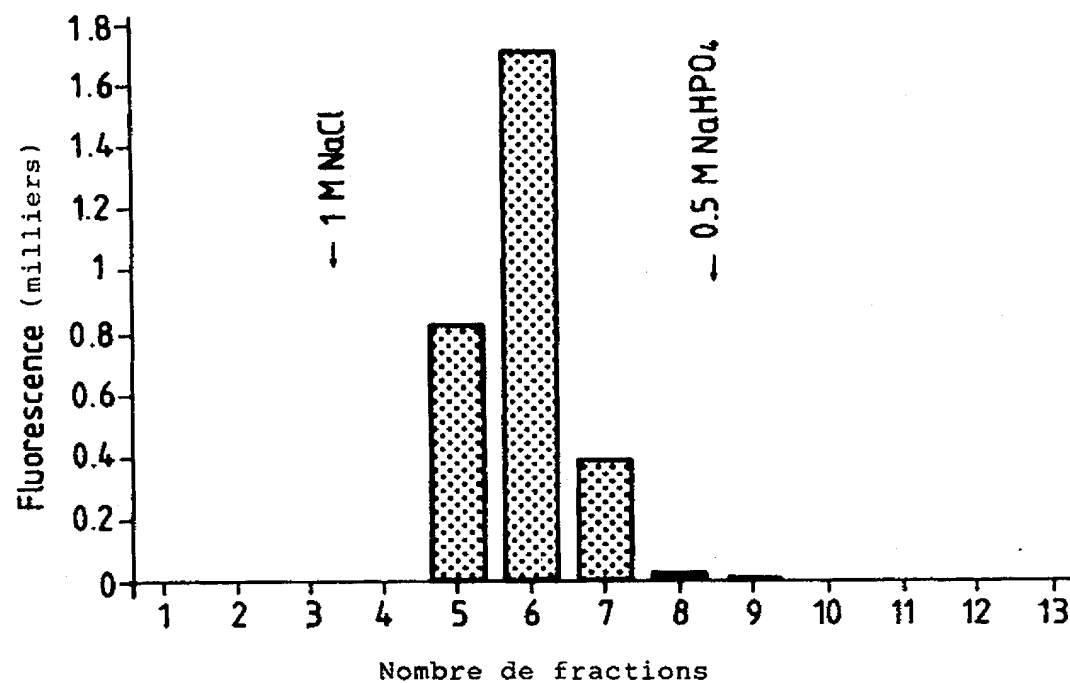
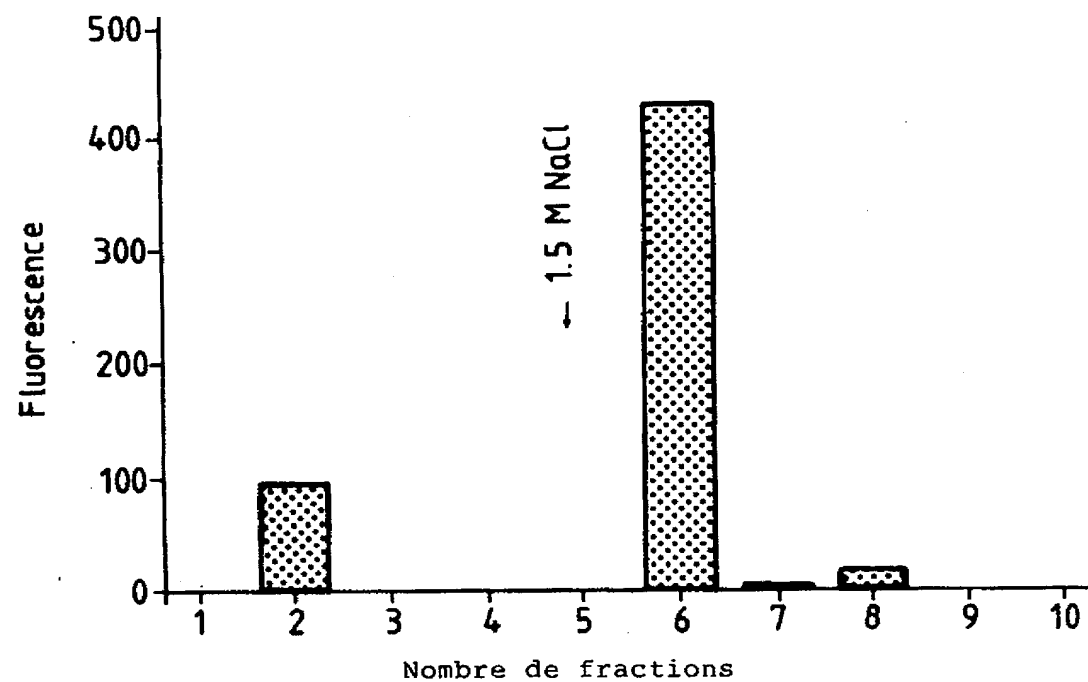


FIG. 6

Figure 6: purification du NAF par chromatographie sur
héparine-Sépharose

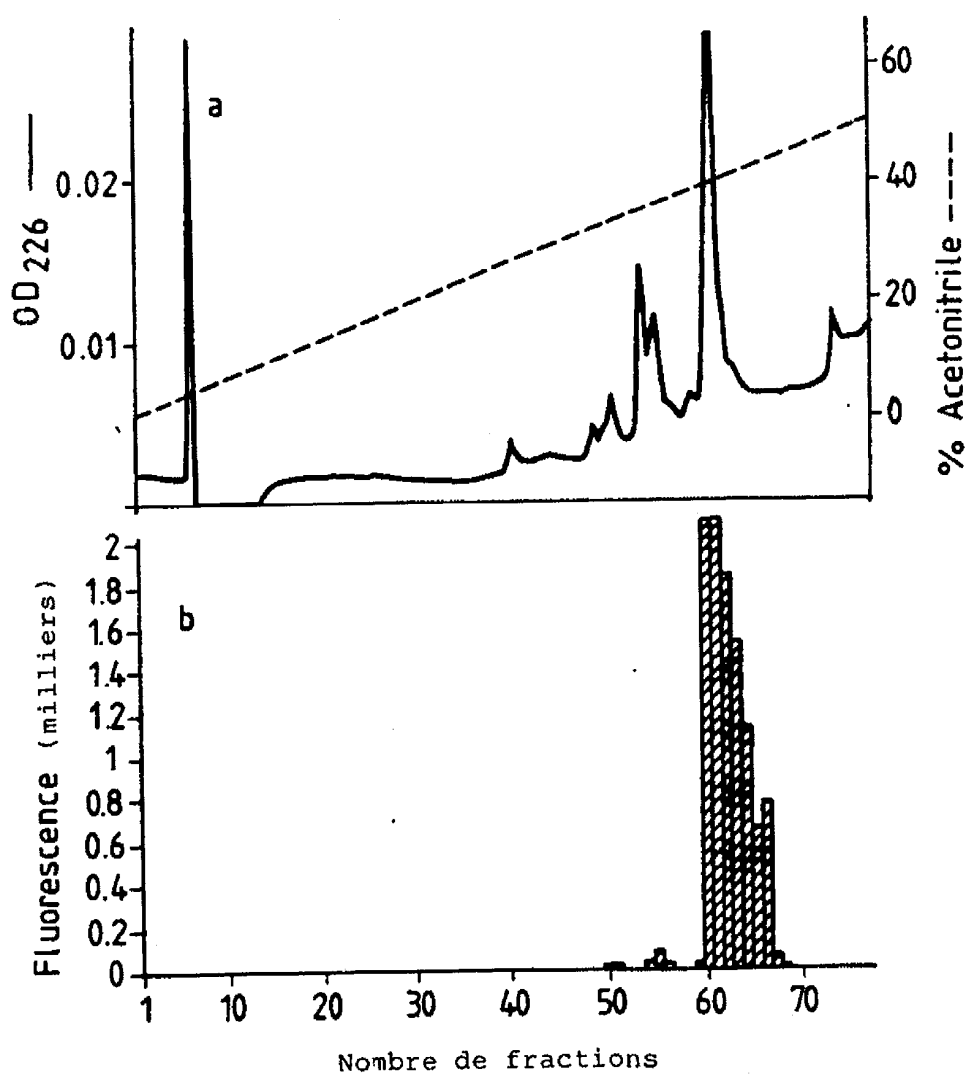


50

08801310

51
FIG. 7

Figure 7: purification du NAF par CLHP en phase inverse sur colonne de C4



52
FIG. 8

Figure 8: purification du NAF par CLHP en phase inverse
sur colonne de CN-propyle

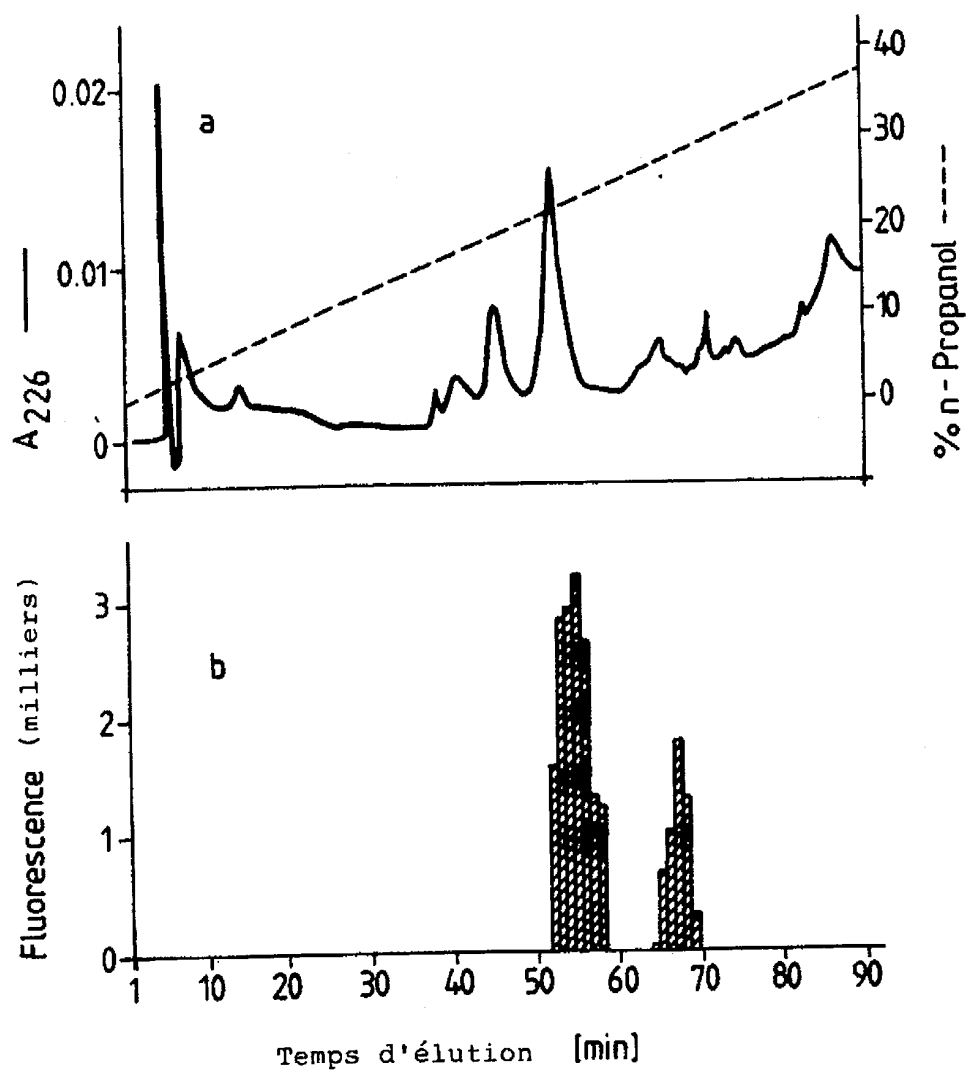
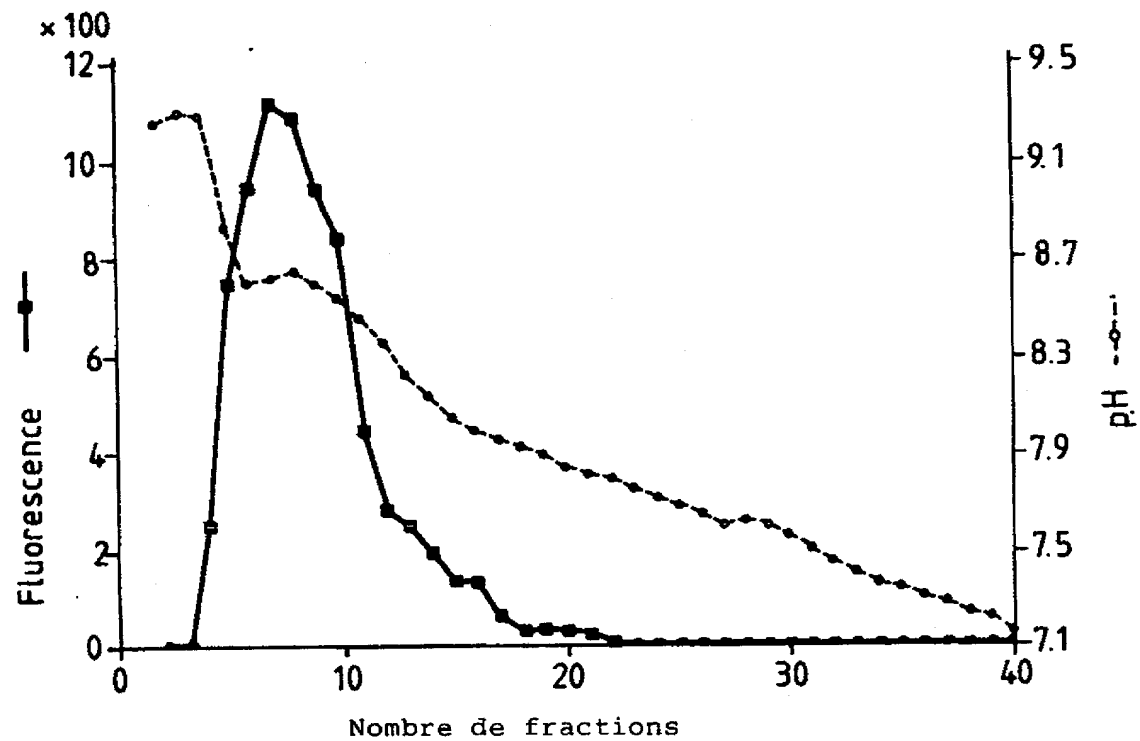


FIG. 9

Figure 9: purification du NAF par chromatofocalisation

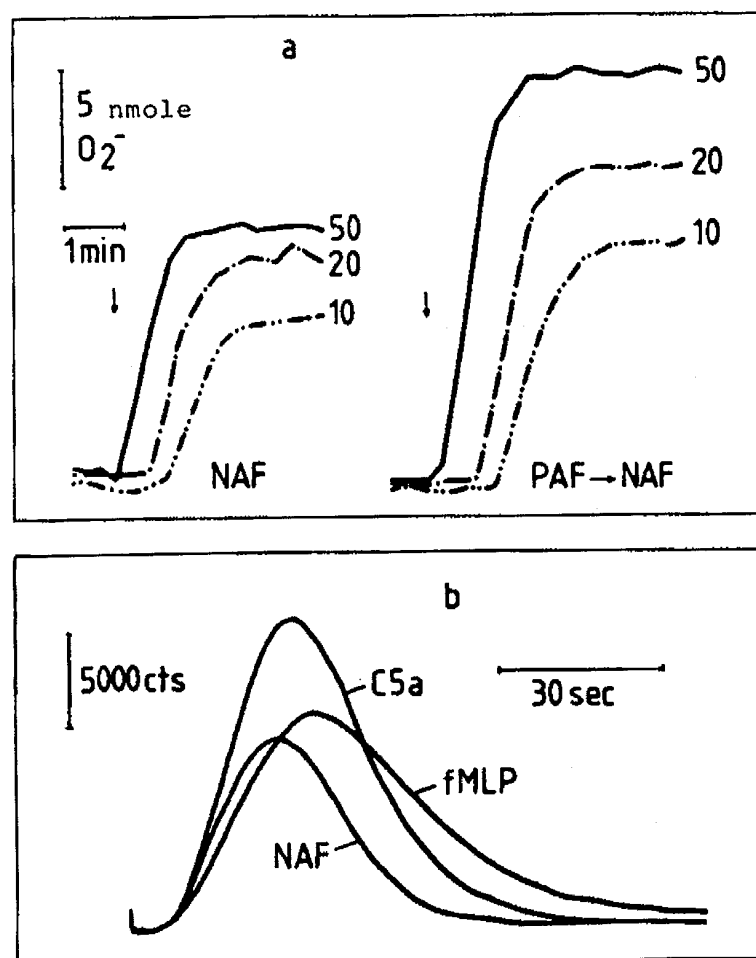


53

08801310

FIG. 10

Figure 10: réponse de l'éclatement respiratoire au NAF partiellement purifié



55
FIG. 11

Figure 11: discrimination entre NAF et C5a

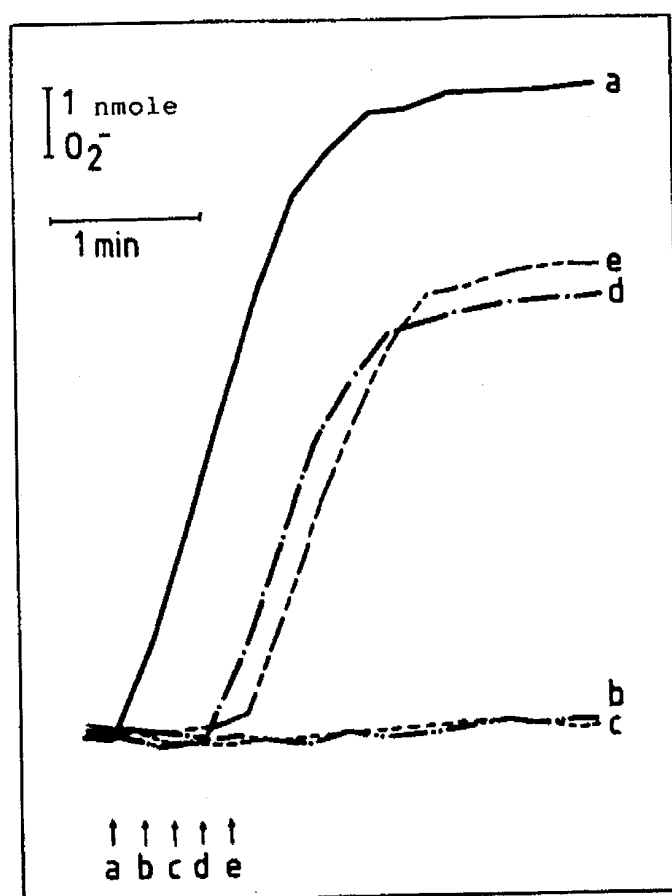


FIG. 12

Figure 12: formation de superoxyde en réponse à une stimulation séquentielle avec du NAF partiellement purifié, C5a et fMLP

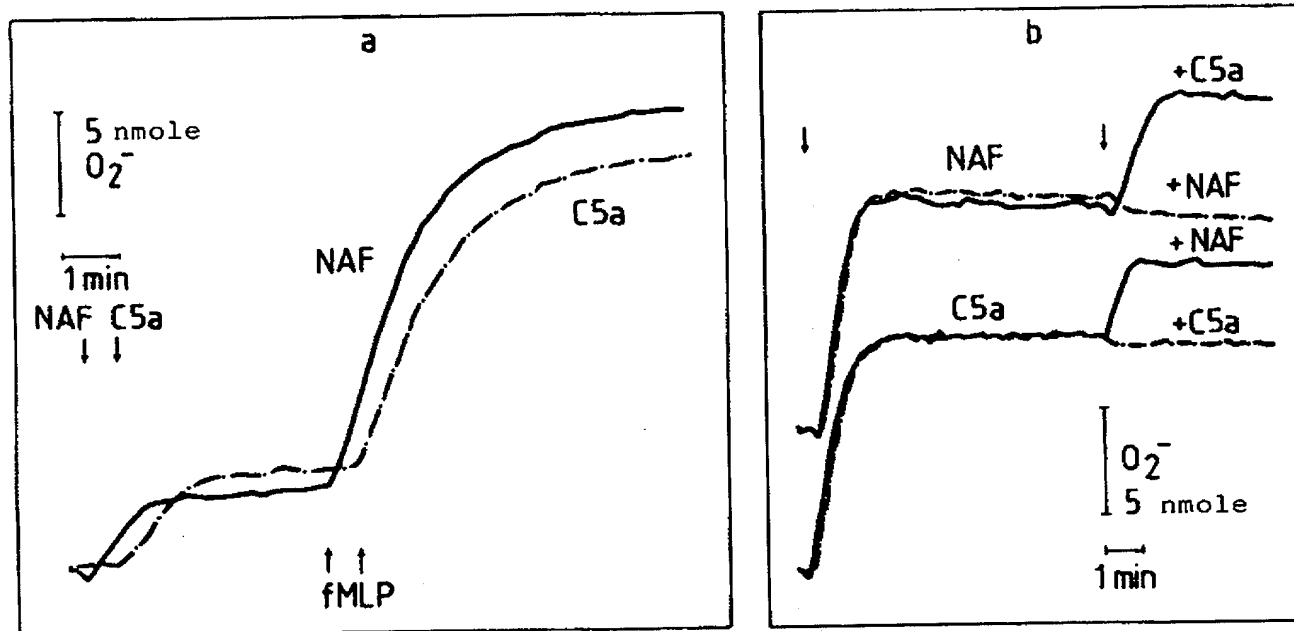


FIG 13

Figure 13: séquence nucléotidique du gène de NAF synthétique

Clal TagI 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 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 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 Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu
 40 50
 230
 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

58
FIG. 14

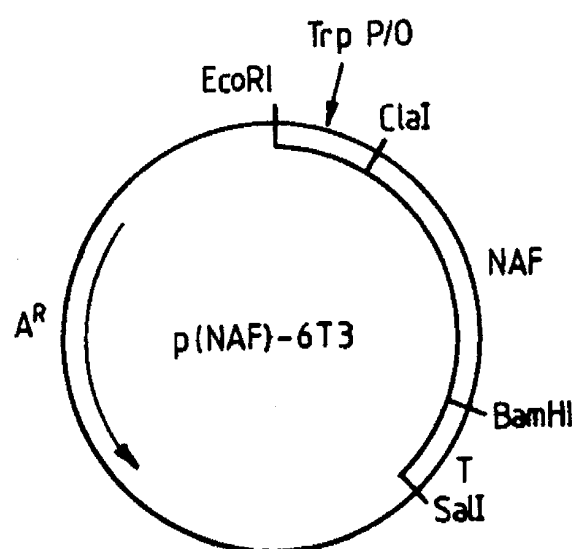


FIG. 15

Figure 15: identité du NAF naturel et du NAF recombinant

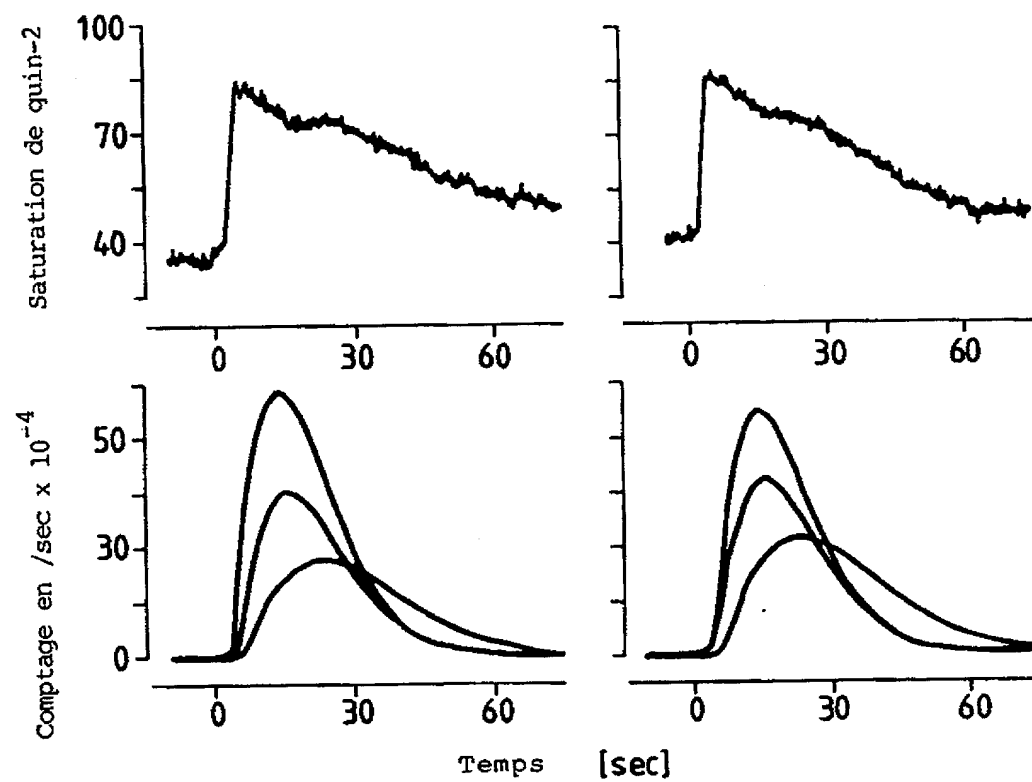
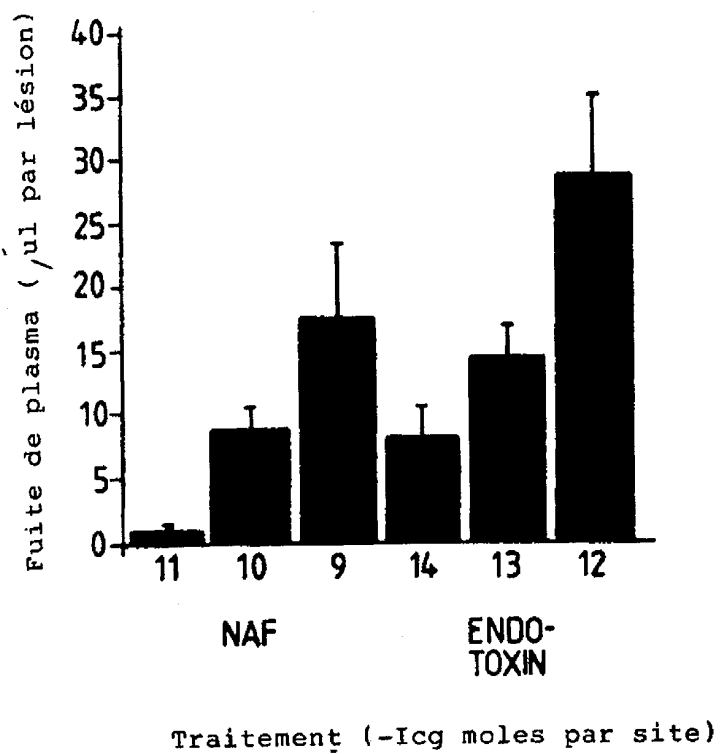


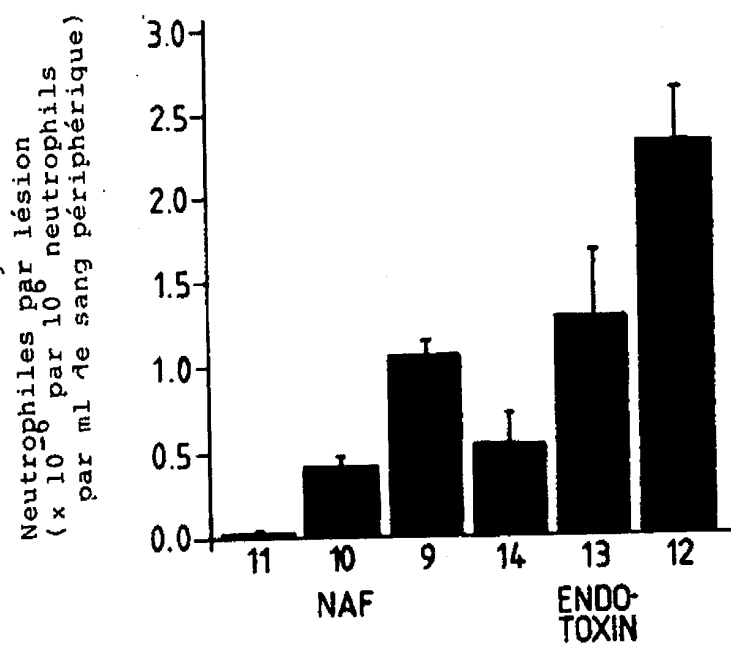
FIG. 16

Figure 16: fuite plasmatique dans les sites cutanés



61
FIG. 17

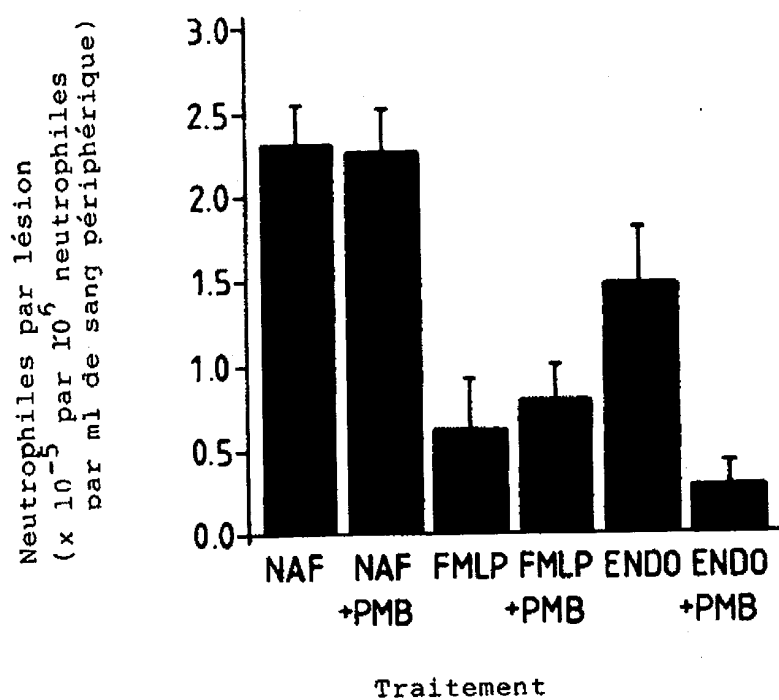
Figure 17: accumulation des neutrophiles dans les sites cutanés



Traitement (-log moles par site)

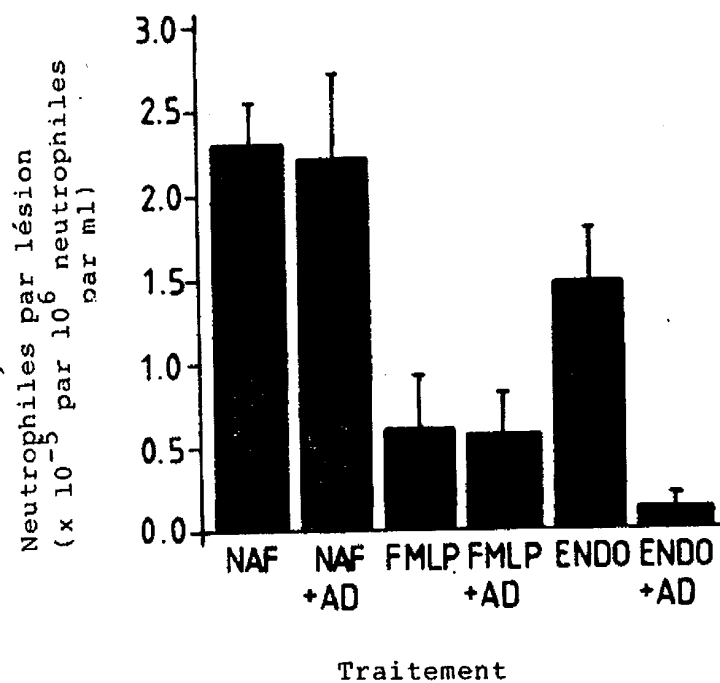
FIG. 18

Figure 18: effet de la polymyxine B sur l'accumulation des neutrophiles



63
FIG. 19

Figure 19: effet de l'actinomycine D sur l'accumulation de neutrophiles





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numéro de la demande
nationale :

BE 88 01 310

BO: 1528

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
D, X	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 139, no. 1, 1er juillet 1987, pages 250-256, The American Association of Immunologists, US; J. SCHMID et al.: "Induction of mRNA for a serine protease and a beta-thromboglobulin-like protein in mitogen-stimulated human leukocytes" * En entier, en particulier figure 6 *	1, 4, 9-13	C 07 K 7/10 C 07 K 13/00 C 12 N 15/00 C 12 P 21/02 A 61 K 37/02 C 07 K 3/28
Y	Idem	1-37	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 25, 23 juin 1986, page 478, résumé no. 223310t, Columbus, Ohio, US; E. KOWNATZKI et al.: "Novel neutrophil chemotactic factor derived from human peripheral blood mononuclear leukocytes", & CLIN. EXP. IMMUNOL. 1986, 64(1) 214-22 * Résumé en entier *	1-37	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
			C 07 K C 12 N C 12 P A 61 K
RECHERCHE INCOMPLETE			
La division de la recherche estime que l'article 6(4) de l'Accord de travail entre l'OEB et l'Etat belge est applicable à la présente demande de brevet belge, de sorte qu'une recherche significative sur l'état de la technique ne peut être effectuée au regard d'une partie des revendications. Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes: 1-37 Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes: 38, 39 Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches: 38, 39 Raison pour la limitation de la recherche: Revendication 38: méthode de traitement chirurgical, thérapeutique, et diagnostic appliquée au corps humain ou animal. Revendication 39: une "étape" ou des "caractéristiques" <u>en soi</u> ne sont pas des inventions brevetables.			
Date d'achèvement de la recherche 26 juillet 1989		Examineur R.R.W. HERMANN	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numéro de la demande
nationale :

BE 88 01 310

BO: 1528

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
Y	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 139, no. 3, 1er août 1987, pages 788-793, The American Association of Immunologists, US; T. YOSHIMURA et al.: "Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL1)" * L'article en entier *	1-37	
Y	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 139, no. 10, 15 novembre 1987, pages 3474-3483, The American Association of Immunologists, US; J.-M. SCHRÖDER et al.: "Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity" * L'article en entier *	1-37	
D, P, X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 151, no. 2, 15 mars 1988, pages 883-890, Academic Press Inc., US; H. GREGORY et al.: "Structure determination of a human lymphocyte derived neutrophil activating peptide (LYNAP)" * L'article en entier *	1-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
D, P, X, Y	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 167, juin 1988, pages 1883-1893; .../...	1-13	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numéro de la demande
nationale :

BO 88 01 310

BO: 1528

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
P, X	K. MATSUSHIMA et al.: "Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor" * L'article en entier * --- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, 1988, page 625, résumé no. 228213b, Columbus, Ohio, US; S. TANAKA et al.: "Synthesis and biological characterization of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor", & FEBS LETT. 1988, 236(2), 467-70 * Résumé en entier * -----	1-13	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			