



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 93560 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

A61K038/27 A

A61K038/16 B

C07K001/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1990.03.23	(73) <i>Títular(es):</i> REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, THE 300 LAKESIDE DRIVE, 22ND FLOOR OAKLAND, CALIFORNIA 94612-3550 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1989.03.24 US 328181 1989.05.02 US 346165 1989.06.01 US 360235	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.11.07	(72) <i>Inventor(es):</i> NAPELEONE FERRARA US DENIS GOSPODAROWICZ US JEAN PLOURT US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 05/96 1996.05.14	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FACTOR DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE O CONTEM

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 93 560

REQUERENTE: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, norte-americana, estabelecida em 300 Lakeside Drive, 22nd Floor, Oakland, California, Estados Unidos da América.

EPIGRAFE: " PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FACTOR DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE O CONTEM "

INVENTORES: Napeleone Ferrara, Denis Gospodarowicz e Jean Plourt.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

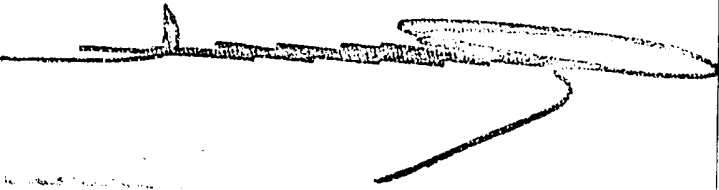
Estados Unidos da América, em 24 de Março de 1989, 02 de Maio de 1989 e em 01 de Junho, sob os n.ºs. 328,181, 346,165 e 360,235, respectivamente.

Descrição da patente de invenção de THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, norte-americana, instituição de ensino superior e de investigação científica, estabelecida em 300 Lakeside Drive, 22nd Floor, Oakland, Califórnia, Estados Unidos da América, (inventores: Napoleone Ferrara, Denis Gospodarowicz e Jean Plourt, residentes nos E.U.A.) para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FACTOR DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE O CONTEM"

Descrição

O presente pedido e continuação em parte do Pedido de Patente dos E.U. pendente com o Nº. de série 346 165, depositado em 2 de Maio de 1989, que é continuação em parte do pedido de Patente dos E.U. pendente Nº 328 181, registado em 24 de Março de 1989, os quais estão ambos incorporados por referência na sua totalidade.

Origem da Invenção



A presente invenção foi feita com o apoio do Governo em parte no U.S. National Institute of Health por meio das bolsas N^{os} 5ROEY 02186; SROIHL 20197: e HD 08035 concedidas pelo Departamento em San Francisco, Califórnia. O Governo dos Estados Unidos possui determinados direitos sobre esta invenção.


Domínio da Invenção

A presente invenção refere-se a um novo factor de crescimento para células endoteliais vasculares identificado em meio condicionado de células foliculares de pituitaria de bovino cultivadas e de células de tumor de murino. A invenção também se refere ao isolamento, a purificação e a clonagem do factor de crescimento.

Descrição do Problema e da Técnica Relacionada

As referências numéricas em parentesis no texto referem-se a publicações listadas seguidamente na Secção de Referências.

A angiogênese é um fenómeno que se desenrola em várias fases que envolve proliferação de células endoteliais capilares, migração e infiltração nos tecidos (1). Este fenómeno desempenha um papel central em vários processos fisiologicos e patológicos tal como o desenvolvimento embrionário, a cicatrização de feridas, a aterosclerose e o crescimento de tumores (1.2). Vários factores que induzem a angiogêneses foram recentemente isolados e caracterizados. Entre estes estão as formas ácidas e básicas do factor de crescimento de fibroblastos (FGF), ambas capazes de estimular o crescimento das células endoteliais capilares in vitro bem como apresentando quimiotaxia para este tipo de células. Para além disso tanto o FGF acidico como o básico estimulam a actividade da collagenase e a produção do activador de plasminogéno,



enquanto bloqueiam a actividade do inibidor de plasminogénio (3,4). Estas enzimas estão implicadas na interrupção da membrana de base capilar, acontecimento que é necessário para que a angiogénese tenha lugar (1). Outros factores de crescimento tal como o factor alfa de necrose de tumores (TNF α), o factor beta de crescimento de transformação (TGF β), o factor alfa de crescimento de transformação (TGF α) e o factor de crescimento epidérmico (EGF) são também angiogénicos in vivo (5-8). Contudo, com a excepção dos factores TGF α e EGF a elevados concentrações (7), estes factores de crescimento não são mitogénicos para células endoteliais capilares (5,6); a sua acção no processo angiogénico é por conseguinte provavelmente indirecta, resultando desta actividade a atracção de macrófagos por quimiotaxia (9,10), o que por sua vez liberta factores angiogénico(s) directo(s), um dos quais pode ser FGF básico (11).

Varios factores de crescimento, tais como FGF ácido e básico PDGF e EGF, são amplamente mitogénicos para vários tipos de células. Esta mitogenicidade ampla é desejável em muitos tipos de aplicações de cicatrização de feridas. Existem contudo tipos específicos de aplicação de cicatrização de feridas nas quais seria mais desejável empregar factores de crescimento que tem uma actividade mitogénica mais específicas em relação a determinadas células. Por exemplo, a seguir à cirurgia de enxerto vascular ou da angioplastia de balão, seria altamente desejável empregar um agente de cicatrização de feridas que incorporasse um factor mitogénico que tivesse uma actividade mitogénica que fosse altamente específica para células endoteliais vasculares.

Actualmente, não existe qualquer factor mitogénico adequado para este tipo de aplicação.

No decurso dos nossos estudos sobre a localização de FGF básico em vários tecidos, observou-se


~~CONFIDENTIAL~~


que na glândula pituitária as células do folículo stellate são as principais produtoras de bFGF (18). Se bem que se tenha verificado que o meio condicionado por aquelas células e fortemente mitogénico para células endoteliais capilares, apenas esta presente uma pequena quantidade de bFGF neste meio ou mesmo nenhum, sugerindo deste modo, que para além de sintetizar bFGF. estas células são também capazes de produzir outro mitogene de células endoteliais. Até agora, contudo, esta actividade mitogénica não foi purificada ou caracterizada.

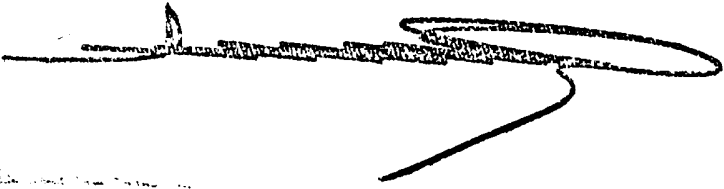
Técnica anterior de interesse


As publicações seguintes são de interesse como antecedentes na especialidade.

1. Folkman, J. (1986) Cancer Res. 46, 467-473.
2. Gospodarowicz, D., et al. (1987) Endocrine Reviews 8, 95-114.
3. Saksela, O., et al. (1987) J. Cell Biol. 107, 957 - 962.
4. Montesano, R., et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 7297 - 7301.
5. Frater-Schroeder, M. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 5277 - 5281.
6. Sporn, M. B., et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 4167 - 4272
7. Schreiber, A. B. et al. (1986) (Science 232, 1250 - 1253.
8. Gospoderowicz, D., et al. (1979) Expt. Eye Res. 28, 501 - 514.

- 
9. Leibovich, S., et al. (1987) Nature 329, 630 -
- 632.
 10. Wahl, S. M., et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 84, 5788 - 5792.
 11. Baird, A., et al. (1985) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 126, 358 - 363.
 12. Abraham, J. A. et al. (1986) Science, 233, 545 -
- 547.
 13. Jaye, M., et al. (1985) Science 233, 541 - 545.
 14. Schweigerer, L., et al. (1987) Nature, 325,
257 - 259.
 15. Moscatelli, D., et al. (1986) J. Cell. Physiol. 129,
273 - 276.
 16. Vlodavsky, I., et al. (1987) Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A. 84, 2292 - 2296
 17. Ferrara, N., et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 84, 5773 - 5777
 18. Gospoderowicz, D., et al. (1984) Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A. 81, 6963, 6967.
 19. Gospodarowicz, D., et al. (1988) Europ. J. Cell.
Biol., 46, 144 - 151.
 20. Ferrara, N., et al. (1986) Methods Enzymol. 124,
235 - 253.
 21. Gospodarowicz, D., et al. (1983) J. Cell. Biol. 7,
1677 - 1685.

- 
21. Gospodarowicz, D., et al. (1983) J. Cell. Biol. 7, 1677 - 1685.
 22. Gospodarowicz, D., et al. (1986) J. Cell. Physiol., 127, 121 - 136.
 23. Gospodarowicz, D., et al. (1977) Endocrinology 100, 1108 - 1120.
 24. Gospodarowicz, D., et al. (1977) Endocrinology, 100, 1080 - 1089.
 25. Gospodarowicz, D., et al. (1977) Ext. Eye. Res. 25, 75 - 89.
 26. Neufeld, G., et al. (1986) Regulatory Peptides 13, 293 - 305.
 27. Weissman, B. E., et al. (1988) Cell 32, 599 - 606.
 28. McConahey, P., et al. (1966) Int. Arch. Allergy 29, 185 - 189.
 29. Laemmli, U. K. (1970) Nature, (London) 227, 680 - 685.
 30. Klagsburn, M., et al. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 82, 805 - 809.
 31. Gospodarowicz, D., (1987) Methods Enzymol. 146, 106 - 119.
 32. Kudlow, J. E., et al. (1988) In Biology of growth factor. Adv. in Exptl. Med. and Biol. Plenum Press New York 234, 105 - 126.

- 
46. Neufeld, G., et al. (1987) Endocrinology, 121, 597 - 602.
47. Schweigerer, L., et al. (1988) Exp. Eye Res., 46 (1), 71 - 80.
48. Schweigerer, L., et al. (1987) Endocrinology, 120, 796 - 802.
49. Shing, Y., et al. (1984), Science 223, 1296 - 1299.
50. Jaffe, E. A., et al. (1972) J. Clin. Inv. 51, 46a.
51. Folkman, J. (1982) In: Pathobiology of the Endothelial Cell. (Edited by Nossel, H. L. and Vogel, H. J.) pp 79 - 93, Academic Press, New York.
52. D'Amore, P. A., et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 3068 - 3072.
53. Pheel, D. M., et al. (1985) In Vitro, 16, 526 - 538.
54. Henzel, W. J., et al. (1987) J. Chromatograph., 404, 41 - 52.
55. Morrissey, J. H. (1981) Anal. Biochem., 117, 307 - 310.
56. Baird, A., et al. (1986) Recent Prog. Hormone Res. 42, 143 - 186.
57. Roberts, R., et al. (1988) Nature, 332, 376 - 378
58. Maciag, T. et al. (1984) (Science, 225, 932-935.
59. Lobb, R.R., et al. (1984) Biochemistry, 23, 6295-6299.


- 
60. Folkman, J., et al. (1987), Science, 235, 442-447.
 61. Goustin, A. S., et al. (1986) Cancer Res., 46, 1015 - 1029.
 62. Bassett, D. L. (1943) Am. J. Anat., 73, 251-259.
 63. Gospodarowicz, D., et al. U. S. Patent Nº 4,785,079, issued November 15, 1988.
 64. B. Gumbiner, et al. (1981) Proc. Natl. Acad. U.S.A. 78, 318.
 65. S. Blam, et al. (1988) Oncogene 3, 129.

Todas as referências e/ou patentes referidas na presente memória descritiva são incorporadas aqui por referência.

Estas referências aparecem no texto entre parentesis (1).

Investigações publicadas anteriormente descrevem a cultura de populações homogêneas de células foliculares de pituitária de bovino ou de células de folículo stellate (CFS) (20) e subsequentemente caracterizadas como elementos de transporte de iões, possivelmente implicado na regulação da composição em iões e na osmolaridade do fluido intersticial nos cordões de células adeno-hipofisárias (41, 42). Está também descrito que as CFS produzem o factor de crescimento de fibroblasto mitogénico angiogénico (bFGF) (17).

O gene para bFGF (43), de modo semelhante ao gene para o factor de crescimento de fibroblasto ácido (aFGF) (13), não codifica para um peptídeo de sinal convencional, necessário para o transporte extracelular de



proteínas de acordo com os perfis clássicos de secreção (44). Deste modo, o factor de crescimento não é segregado de modo apreciável para o meio (15,45) e os tipos de células sensíveis estão dependentes do bFGF oxigénio para a proliferação óptima na cultura, mesmo quando podem conter concentrações intracelulares significativas de mitogene (46, 47, 48).

Observou-se inicialmente, contudo, que o meio condicionado por CFS de pituitária de bovino é mitogénico para células endoteliais capilares derivadas do cotex adrenal. É interessante notar que estas células são sensíveis tanto a bFGF como a aFGF mas não são estimuladas para proliferar por EGF, TGF alfa, TGF beta, PDGF, insulina ou TNF (2). Estas observações conduzem-nos a considerar a possibilidade que pode ser segregado pelas CFS em cultura um factor de crescimento das células endoteliais distinto do FGF e possivelmente de qualquer outro factor de crescimento conhecido.

A presente invenção descreve a purificação e as características biológicas deste novo factor de crescimento. A sua sequência específica de ácidos aminados terminal, bem como a sua especificidade para células endoteliais vasculares, distingue-o de qualquer outro factor de crescimento descrito anteriormente.

RESUMO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, é proporcionado um novo factor de crescimento sob uma forma isolada, isto é, isento de impurezas que acompanham normalmente a molécula nativa quando é produzido in vivo. O factor de crescimento da presente invenção será referido aqui como "factor de crescimento de células endoteliais derivadas de folliculo stellate" ("folliculo stellate derived endothelial cel) growth factor" = FSdGF), uma vez que este factor

foi originalmente isolado a partir de células de folículo stellate de bovino, ou como "factor de crescimento endotelial vascular" (VEGF). Subentende-se, contudo, que estas denominações tem a intenção de abranger a proteína, sem olhar à sua origem ou modo de produção. Por exemplo, a referência na presente memória descritiva a FSdGF na forma isolada proporciona um meio para isolar as sequências de ADN clonado que codificam para a proteína, de tal modo que possa ser produzida em quantidades comerciais usando as técnicas conhecidas de tecnologia de ADN recombinante. Para além disso, a referência na presente memória descritiva a FSdGF deve ser entendida como abrangendo as proteínas correspondentes por outras espécies para além da espécie bovina, por exemplo, proteína humana, mesmo apesar de se saber que podem ocorrer variações mínimas na sequência de ácidos aminados de espécies para espécies que não afectam significativamente as actividades úteis duma proteína. Utilizando os materiais e processos aqui descritos os tecidos da especialidade podem obter, por exemplo, a correspondente proteína humana por isolamento e expressão das sequências de ADN clonado que codificam para a proteína. Também se consideram incluídos no âmbito do termo "FSdGF" os seus fragmentos biologicamente activos, bem como as suas versões prolongadas na extremidade N-terminal e/ou C-terminal que retem qualitativamente as actividades biológicas de FSdGF aqui descritas. Se bem que a forma de FSdGF que foi isolada usando os procedimentos descritos na presente memória descritiva esteja aparentemente glicosilada, é conhecida que a produção de proteínas por técnicas recombinantes em alguns hospedeiros procarióticos como E. coli geralmente não tem como resultado formas glicosiladas da proteína, mas que as formas não glicosiladas resultantes são frequentemente de grande utilidade. De acordo com isto, o termo "FSdGF" abrange as formas glicosiladas e não glicosiladas da molécula, conquanto que estas formas conservam as actividades biológicas aqui descritas.

~~SECRET~~

O FSdGF é uma proteína dimérica de aproximadamente 43 a 45 kD, de acordo com uma determinação por electroforese em gel de poliacrilamida SDS sob condições não redutoras. Esta proteína parece apresentar uma actividade mitogénica específica em relação às células endoteliais vasculares. Consequentemente o FSdGF terá utilidade como um factor de crescimento em várias aplicações de cicatrização de feridas nas quais seja desejado promover uma re-endotelização no sistema vascular. O FSdGF será particularmente útil como agente cicatrizante na cirurgia de enxertos vasculares e na angioplastia de balão. O FSdGF pode também ser utilizado como agente mitogénico para células FSdGF e a promoção de cicatrização de feridas vasculares que se segue a um infarte de miocárdio.


De acordo com a presente invenção, o FSdGF pode ser obtido sob forma isolada a partir de meio de cultura de células condicionado que contenha o FSdGF por um processo que inclui as fases da precipitação por sulfato de amónio: cromatografia de afinidades em Sepharose de heparina; cromatografia de gel de exclusão; cromatografia de permuta catiónica e opcionalmente cromatografia líquida de alta pressão de fase inversa.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1A mostra uma cromatografia de afinidade de sepharose de heparina (HSAC) do meio condicionado de células de FS de bovino.

A Figura 1B mostra uma cromatografia de exclusão de gel das fracções de HSAC purificadas parcialmente em Bio-Gel P-60.

A Figura 1C mostra os resultados cromatográficos em Mono S da fracção P-60 de BioGel bioactiva.



A Figura 2A mostra uma HPLC de fase inversa das fracções de Mono S purificadas e bioactivas e uma comparação da capacidade do meio condicionado de células de FS em varias fases de purificação para estimular a proliferação de culturas de células ACE de baixa densidade.

A Figura 2B é uma comparação da capacidade do meio condicionado de células de FS em várias fases de purificação para estimular a proliferação de culturas de células ACE de baixa densidade.

A Figura 3 é o NaDodSO_4 /PAGE da fracção bioactiva purificada por RP C_4 HPLC.

As Figuras 4A, 4B e 4C são uma comparação entre a capacidade de bFGF derivado de pituitária de bovino e o FSdGF para estimular o crescimento de células HUE (A), células ACE (B) e células BHK-21 (C).


A Figura 5 é uma comparação de capacidade de bFGF e de FSdGF para estimular a proliferação de células BCE, células granulosas, células do cortex adrenal e células BALB/MK.

A Figura 6 é um espectro de FECEF reduzido/alquilado bloqueado por lisina.

A Figura 7 é um traço da digestão de tripsina do novo factor de crescimento.

A Figura 8 é um gráfico de cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa da actividade mitogénica de células foliculares de bovino.

As Figuras 9A e 9B são uma análise Na_2SO_4 /PAGE (12,5 de acrilamida) da fracção mais activa do perfil de HPLC mostrado anteriormente.



A Figura 10 mostra um gráfico de proliferação de células endoteliais derivadas do cortex adrenal de baixa densidade em função do tempo.

A Figura 11 é uma curva de crescimento em função da dose de células endoteliais capilares derivadas do cortex na presença de VEGF purificado.

A Figura 12 é um gráfico dos efeitos de VEGF nos diferentes tipos de células.

A Figura 13A mostra a cromatografia de afinidade em Sepharose de heparina (HSAC) do meio condicionado por células de FS.


A Figura 13B a cromatografia de exclusão de gel de fracções de HSAC purificadas parcialmente em Sepharose G/100.

A Figura 13C mostra os resultados cromatográficos de Mono S da fracção bioactiva P-60 de BioGel.

A Figura 13D mostra a HPLC de fase inversa das fracções purificadas e bioactivas de Mono S e uma comparação de capacidade do meio condicionado de células de FS em vários estados de purificação para estimular a proliferação de culturas de células ACE de baixa densidade.

A Figura 14 é a NaDoDSO_4 /PAGE da fracção bioactiva purificada por RP C_4 HPLC.

As Figuras 15A, 15B e 15C são uma comparação entre a capacidade de bFGF derivado de murino e o FSdGF para estimular o crescimento das células HUE (A), células ACE (B) e células BHK-21 (C).



A Figura 16 é uma comparação da capacidade de bFGF e do factor de crescimento de murino para estimular a proliferação de células BCE, células granulosas, células de cortex adrenal e células BALB/MK.

As Figuras 13 a 16 referem-se a origem de murino (Att20) para o factor de crescimento.

Descrição Pormenorizada da Invenção

Definições

As abreviaturas seguintes tem na presente memória descritiva os significados indicados:

aFGF	factor de crescimento de fibroblasto acidico
bFGF	factor de crescimento de fibroboasto básico
PDGF	factor de crescimento derivado de plaquetas
TGF α	factor de crescimento de transformação α
TGF β	factor de crescimento de transformação β
EGF	factor de crescimento epidérmico
PDECGF	factor de crescimento de células endoteliais derivadas de plaquetas
FS	células do folliculo stellate
FSdGF	factor de crescimento derivado de folliculo stellate
STV	fosfato de sódio 0,01 M (pH 7,4), 0,9 % de NaCl, 0,05 % de tripsina, 0,02 % de EDTA
CS	soro de vitela
FCS	soro de vitela fetal
PBS	salina tamponizada com fosfato
HSAC	cromatografia de afinidade em Sepharose de heparina
RP-HPLC	cromatografia líquida de alta pressão de fase inversa
FPLC	cromatografia líquida de alta pressão rápida

células ACE	células endoteliais capilares derivadas do cortex adrenal
células HUE	células endoteliais umbilicais humanas
células BCE	células endoteliais corneais de bovino
RIA	análise radioimunológica
BSA	albumina de soro de bovino
BHK21	clone 21 de fibroblasto derivado de rim de hamster bebé
Na Dod SO ₄	dodecilsulfato de sódio
PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida
PM	peso molecular
kDa	quilodalton
DMEM	meio de Eagle modificado de Dulbecco.

Materiais Os materiais Bio Gel P-60, conjunto de análise de proteínas Bio Rad, conjunto de coloração de nitrato de prata e padrões de peso molecular baixo para Na Dod SO₄/Page da Bio Rad (Richmond, CA). Os produtos heparina, Sepharose, concanavalina A Sepharose e a coluna Mono S HRS/5 foram obtidos de Pharmacia (Piscataway, NJ). A coluna de fase inversa Vydac C₄ foi obtida do Separation Group (Hesperia, CA). O meio de Dulbecco Modified Eagle (DMEM) foi obtido de Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY). A solução SIV (salina contendo 0,05% de tripsina, fosfato de sódio 0,01 M de pH 7,3 e 0,02 % de EDTA) foi obtida de Difco Lab (Detroit, MI). O soro de vitela (CS) e soro fetal de vitela (FCS) foram obtidos de HyClone Sterile Systems, Inc. (Logan, UT). As placas para cultura de tecidos foram obtidas de Falcon Plastics (Oxnard, CA), excepto para placas de cultura de grande dimensão (600 cm²) que foram de Applied Scientific (San Francisco, CA). A gentamicina foi obtida da Schering Co. (Kenilworth, NJ), e a fúngizona foi obtida de E. R. Squibb and Sons (Princeton, NJ). A leupeptina, a gelatina de transferência e a insulina eram da Sigma (St. Louis, MO). O FGF básico derivado de pituitária e os anticorpos policlonais de coelho neutralizantes dirigidos contra FGF básico foram preparados como

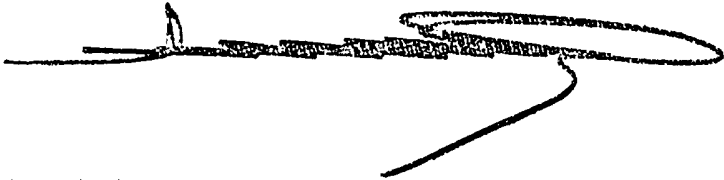
descrito previamente (18,19).

Cultura de células

Preparam-se culturas de células de folículo stellate (FS) derivado de pituitária e caracterizaram-se como previamente descrito (17,20). Culturas confluentes, que consistiam em mono-camadas de células em forma de cúpula homogêneas, foram dissociadas por exposição a SIV suplementando com Na_2EDTA até uma concentração final de 0,3 % (4 a 5 min, 24°C). As células foram em seguida inoculadas numa proporção de divisão de 1:10 em placas de cultura de grande dimensão e foram cultivadas na presença de DMEM suplementado com 5% de CS, 5 % de FSC, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina e 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fungizona (18). Ao atingir a confluência, as culturas foram para além disso passadas ou expostas a um meio isento de soro (ver abaixo). As culturas de células endoteliais umbilicais humanas (21), as células de cérebro de bovino e endoteliais capilares derivadas de cortex adrenal (22), as células granulosas de bovino (23), as células de cortex adrenal (24), as células endoteliais corneais (25), o clone 21 de células de rim de hamster bebé (BHK-21) e queratinócitos epidérmicos de rato BALB/MK (27) (uma oferta da NIH NCI, Bethesda, MD) foram mantidas como anteriormente descrito (21-27).

Preparação do meio condicionado

Células FS de Passagem recente foram depositadas em placas Nunc de 600 cm^2 e cultivadas até a confluência durante 4 e 5 dias em DMEM suplementado com 5% de CS, 5 % de FCS e anticorpos como descrito acima. Uma vez observada a formação de cúpula, as monocamadas foram lavadas duas vezes com 25 ml de salina tamponizada com fosfato antes da adição de 150 ml de por placa de DMEM suplementado com 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de

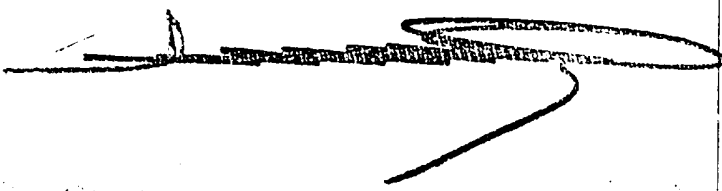


fungizona, 10 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina e 10 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina. Depois de 48 ou 72 horas, os líquidos de cultura foram separados e substituídos pela mesma quantidade de meio fresco isento de soro. Puderam ser feitas recolhas durante 1 mês ou mais sem deterioração visível da monocamada.

Processo de isolamento

O meio condicionado recolhido a partir das camadas confluentes foi centrifugada (10 000 g, 15 min.) no intuito de remover as células flutuantes e resíduos de células. O pH do sobrenadante foi então ajustado a 5,6 com HCl 6 N. Adicionou-se sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (520 g/l), e a suspensão foi deixada durante 6 horas a 4°C, separou-se então o precipitado por centrifugação (10 000 g, 30 min), redissolveu-se em PBS e armazenou-se a -70°C.

Para o isolamento final, os precipitados de 3 recolhas (21 litros no total de meio condicionado, produto inicial) foram descongelados, reunidos e em seguida dialisados durante a noite a 4°C contra Tris-HCl 10 mM a pH 7,3 e NaCl 50 mM. A seguir à diálise o produto insolúvel foi removido por centrifugação (10 000 g, 30 min) e o sobrenadante foi deitado sobre resina de Speharose de heparina (20 ml) que tinha sido equilibrado em Tris-HCl 10 mM a pH 7,3 e NaCl 50 mM. Lavou-se a resina a fundo com o tampão de equilíbrio até que a absorvância voltasse a linha de base, e em seguida eluiu-se por fases com concentrações crescentes de NaCl (NaCl 0,15 M, 0,45 M, 1 M e 3 M). Removeram-se alíquotas das fracções para análise da proliferação de células e reuniram-se as fracções com a maior bioactividade que foram concentradas até 1 ml com uma célula de ultrafiltração Amicon (Modelo 12) e equipada com uma membrana de ultrafiltração Diaflo YM 10.



A amostra concentrada foi carregada numa coluna Bio Gel P-60 (100-200 mesh 1 x 95 cm) equilibrada a 4°C em PBS e foi eluída com PBS. A coluna Bio Gel P-60 pode ser substituída por uma de Sephadex G-100 que parece ser mais eficiente. Foram tomadas alíquotas de cada fracção para análise de proliferação de células e as fracções bioactivas foram reunidas e diluídas duas vezes com Hepes 20 mM a pH 8,3. A amostra foi então aplicada com um Super loop numa coluna Mono S ligada a um sistema FPLC (Pharmacia, Piscataway, NJ). Realizou-se a eluição com um gradiente multilinear de acetonitrilo aquoso de 20 a 45%. Tomaram-se então alíquotas para a análise biológica e as fracções de coluna foram armazenadas congeladas a -70°C.

Análise de proliferação de células

A actividade mitogénica das fracções de coluna e das amostras purificadas foi determinada usando como células alvo células endoteliais capilares derivadas de cortex adrenal (células ACE) (22). As culturas armazenadas, mantidas na presença de DMEM suplementado com CS a 10 % 50 µm/ml de gentamicina e 0.25 µm/ml de fungizona foram transferidos semanalmente para discos de cultura de tecido gelatinizado numa proporção de divisão de 1:10.

Para a análise mitogénica, as células foram inoculadas em placas de grupos de 12 alvéolos a uma densidade de 5×10^3 células por alvéolo em 1 ml de DMEM suplementado com 10 % de soro de vitela e antibióticos, como descrito anteriormente (19). Seis horas mais tarde, um conjunto de alvéolos em triplicado foi tratado com tripsina e as células foram contadas para determinar a eficiência de inoculação. Dez alíquotas de microlitro na diluição apropriada, de cada amostra, como indicado nas descrições pormenorizadas da legenda da figura, foram então adicionadas em triplicado aos alvéolos nas placas nos dias 0 e 2. Após 4 dias em cultura, as placas foram tratadas com tripsina e foram determina-

das as densidades das células com um contador Coulter (Coulter Electronics, Hialeah, FL).


A actividade mitogénica do produto purificado final foi também ensaiado nas células endoteliais umbilicais humanas, células granulosas de bovino, células de cortex adrenal, células endoteliais corneais, células BHK-21 e queratinócitos epidérmicos de rato BALB/MK. Para análise, as células foram inoculadas numa densidade inicial de 2 ou 4×10^4 células/placa de 35 mm. As análises foram conduzidas como descrito para células vasculares de bovino.

Na Dod SO₄/PAGE

Fizeram-se reagir amostras com 250 uCi de Na¹²⁵I usando o método da cloroamina T de iodinação (28). Depois da precipitação por TCA na presença dum veículo de ovalbumina (100 µg/ml), as amostras marcadas com ¹²⁵I (2.5 a 16×10^4 cpm em 10 µl) foram analisadas por Na Dod SO₄/PAGE, (15 % de poliacrilamida, ref. 29) sob condições redutoras ou não redutoras. Depois de electroforese (5 h, 20 mA) os géis foram corados com azul de Coomassie a 0,1 % em ácido tricloroacético durante 15 min e descorados de um dia para o outro com ácido acético a 7%. Os géis foram em seguida secos e submetidos a autorradiografia durante 6 a 92 h.

Microsequenciação de proteínas

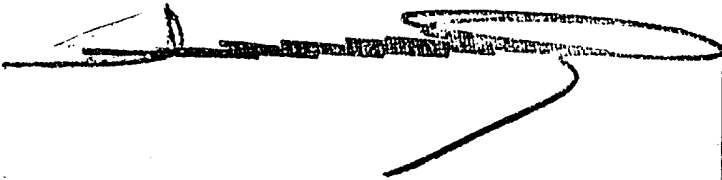
Para a sequenciação de proteínas, redissolveram-se aproximadamente 5 µg (=200 pmol) de proteína das fracções activas da coluna C₄ em ácido trifluoroacético e carregaram-se num sequenciador de proteína de fase gasosa Applied Biosystems 477A. Realizaram-se 12 ciclos de degradação de Edman utilizando software padrão e reagentes fornecidos por Applied Biosystems e fizeram-se identificações de ácidos aminados PTH com uma coluna HPLC em linha automatizada (modelo 120, Applied Biosystems, Foster City, CA).



Isolamento e Detecção do Factor de Crescimento

Os ensaios preliminares indicaram que o meio condicionado por células de FS continham quantidades consideráveis de actividade mitogénica para células endoteliais capilares que não podem ser neutralizadas por anticorpos policlonais. Para além disso quando aplicado a uma coluna de afinidade HS em NaCl 0,6 M, a maior parte da actividade não era retida. Em contraste, tanto o aFGF como o bFGF são retidos sob condições semelhantes e eluídos a partir de HS a concentrações de NaCl de 1,1 M e 1,6 M, respectivamente (18,30,31). Uma vez que se sabe que as células de pituitária em cultura produzem vários factores de crescimento (32), existia a possibilidade de que factores tais como TGF α , EGF e/ou TGF β pudessem também estar presentes no meio condicionado de células de FS. Usaram-se por conseguinte células ACE, que não respondem a TGF α , EGF, ou PDFG (22) e para as quais o TGF β é inibidor do crescimento (33,34), para seguir a purificação do novo factor de crescimento.


A precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ constituiu uma via conveniente de redução de volume do meio condicionado recolhida das células de FS para um nível adequado para a cromatografia subsequente. A análise por HSAC, que foi usada para a purificação de outros factores de crescimento (32, 33), proporcionou uma fase de purificação eficiente. O produto que não ficou retido pela coluna era inactivo e correspondia a 50 % do total da proteína carregada (Fig. 1A). É provável que os componentes de transferrina e insulina do meio celular estivessem presentes na fracção não retida e contribuíssem para a porção maioritária das proteínas. A eluição com NaCl 0,15 M deu origem a um pequeno pico de proteína não bioactiva, enquanto a eluição com 0,45 M deu origem ao maior pico de proteína com 10 % de bioactividade aplicada à coluna. Ensaio preliminares mostraram que a maior parte da bioactividade podia ser eluída da coluna HS com NaCl 0,6 M mas que a actividade era eluída sob a forma de um pico



alargado. Por conseguinte, para concentrar o pico de proteína realizou-se a eluição com NaCl 1 M. Esta fase deu um pico de proteína relativamente estreito no qual foi recuperada 90 % da bioactividade aplicada na coluna (figura 1A). Globalmente, a cromatografia por HS deu como resultado uma purificação de 30 vezes, estimada pela proteína recuperada. Uma vez que a actividade de intensidade de crescimento no produto inicial era variável, possivelmente devido à presença do inibidor, o rendimento nesta fase não pode ser determinado com rigor (ver Quadro I).


QUADRO 1 - Resumo da purificação do factor de crescimento derivado do Folliculo
Stellate

Fases de purificação	Proteína (ug)	Estimulo ED ₅₀ máximo (ng/ml)	Actividade total (unidades)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄ ppt	405000	750 ^a	29x10 ^{6a}	1	--a
HSAC 1.MNaCl pool ^c	13464	100	9x10 ⁵	30 ^b	100
Bio Gel P-60 ^c	1477	10	9.8x10 ⁵	300	108
Mono S frac 39-42 ^c	244	8	4.9x10 ⁵	900	54
C ₄ -HPLC ^d	15	0.5	2.3x10 ⁵	6923	25

- 
- a) A actividade de intensificação de crescimento no $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ era variável, talvez devido à presença do inibidor de crescimento. A estimulação máxima na saturação foi também muito mais baixa do que a observação para outras fracções purificadas parcialmente (ver fig. 6). Por conseguinte o rendimento foi baseado na actividade total presente na primeira fracção purificada parcialmente. (HSAC, NaCl 1 M).
- b) A purificação na fase HSAC foi estimada em 30 vezes com base na quantidade de proteína recuperada.
- c) A proteína foi estimada usando o reagente de Bradford de Bio Rad com BSA como um padrão
- d) A proteína foi estimada por análise de AA
- e) A ED_{50} foi determinada como a concentração de proteína que deu uma estimulação de 50 % de proliferação de células na análise de células ACE. Corresponde a uma unidade de actividade.

A cromatografia por Sepharose foi seguida por cromatografia de exclusão em gel usando Bio Gel P-60 (Fig. 1B). A bioactividade foi eluída como um pico maioritário com nm PM aparente de 40 a 45 kDa. Esta fase teve como resultado uma purificação adicional de dez vezes com uma recuperação de 100 % (Quadro 1).


As fracções bioactivas da coluna Bio Gel P-60 foram reunidas e aplicadas a uma coluna mono S (Fig. 1C). O perfil bioactivo das fracções eluídas consistiam em dois picos minoritariamente de eluição de bioactividade respectivamente de NaCl 0,23 M e NaCl 0,28 M, com um pico de bioactividade maior que eluiu a 0,33 M NaCl. A análise de bioactividade presente nos vários picos indicou que as fracções de NaCl 0,33 M continham cinco vezes mais actividade


que quer o pico de NaCl 0,23 M quer o de 0,28 M. A fase de Mono S deu um aumento adicional de três vezes em actividade biológica específica depois da fase de Bio Gel P-60; a recuperação foi de cerca de 50 % (Quadro 1). Os dois outros picos bioactivos somavam o remanescente da bioactividade.

A purificação final da actividade mitogénica das células endoteliais foi conseguida por RP-HPLC com uma coluna de Vydac C₄ (Figura 2A), um processo preparativo adequado para análise de sequência de ácidos aminados. Apesar das perdas na actividade que foram encontradas, presumivelmente devido às condições ácidas e ao solvente usado, estas não foram suficientemente graves para evitar a detecção das fracções bioactivas. Toda a bioactividade detectada estava presente em dois picos de proteína aguçados apostos muito juntos que, quando analisados por Na₂ Dod SO₄/Page deram a mesma banda simples no gel corado por prata (Figura 3). A fase de RP-HPLC-C₄ deu como resultado pelo menos num aumento de sete vezes numa actividade biológica específica com uma recuperação de 50 % (Quadro 1). A Figura 2B ilustra a potência relativa das várias fracções em diferentes fases de purificação.

Quando as fracções bioactivas de Mono S de NaCl 0,23 M e 0,28 M reunidas foram cromatografadas sob condições similares na coluna C₄, obteve-se um perfil biológico identico ao observado para as fracções de Mono S de 0,33 M reunidas. A porção maioritaria (90%) da bioactividade coincidia com dois picos apostos muito próximos de proteínas que foram eluidas na mesma posição das observadas por Na₂ Dod SO₄/Page estes picos deram, sob condições redutoras, uma banda comum em 23 kDa, migrando numa posição identica à observada na Figura 3.

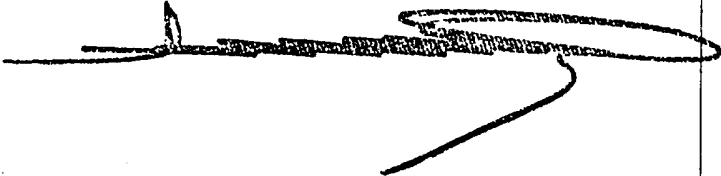
Caracterização Física e Biológica do Factor de Crescimento



O factor purificado quando analisado sob condições não redutoras apresentou um peso molecular estimado de 46 kDa (Figura 3). Este valor está de acordo com a sua posição de eluição na análise de dimensão na coluna de Bio Gel P-60 em solvente que normalmente permitem manter a conformação nativa. Quando analisado sob condições redutoras a massa molecular aparenta foi de 23 kDa (Fig. 3). A partir destes dados parece que o mitogene é constituído por duas cadeias peptídicas com massa molecular de 23 kDa. Dado que se obtém uma sequência N-terminal simples a molécula dimérica é provavelmente composta por duas cadeias homólogas idênticas ou pelo menos cadeias muito homólogas.

O facto de aparentemente a banda de 46 kDa não ser distinta podia ser interpretado como indicando a presença de uma glicoproteína. No sentido de explorar este ponto as fracções bioactivas de HSAC foram aplicadas numa coluna de Sepharose de concanavalina em Tris 10 mM de pH 7.3, NaCl 0,05 M e MgCl₂ 5 mM. Toda a actividade biológica foi retida pela coluna. A eluição com concentração salina elevada (NaCl 0,5 M) não eluir qualquer quantidade de bioactividade significativa, enquanto a eluição com metilaminósido 10 mM deu como resultado uma recuperação de 25 % da actividade aplicada na coluna. A eluição com metilaminósido 0,2 M não teve como resultado uma maior recuperação de bioactividade. Estes resultados sugerem que o factor é uma glicoproteína com forte afinidade para a concavalina A. Contudo, a fraca recuperação biológica do factor a partir deste tipo de resina de cromatografia de afinidade torna a concavalina A inadequada como fase de purificação.

As curvas de relacionamento da resposta em relação à dose para o factor de crescimento descrito nas figuras 2B e 4 ilustram que mesmo uma quantidade tão pequena como cerca de 25 pg/ml estimula a proliferação




das células ACE. A saturação foi observada a cerca de 500 pg/ml com uma ED₅₀ de 65 pg/ml (Fig. 4B). Esses valores podem ser comparados favoravelmente com a gama de concentrações em que o bFGF promove a proliferação de células ACE (efeito mínimo a 10 pg/ml, saturação 200 mg/ml e ED₅₀ a 50 pg/ml. ref. 22 e fig. 4B). Contudo, a densidade final da cultura cultivada na presença do factor de crescimento derivado de FS era metade ao das culturas expostas às concentrações de bFGF óptimas. Apesar disso, se se considera que o PM do factor de crescimento derivado das células de FS é 2,5 vezes o do bFGF, este novo factor tem essencialmente a mesma potencia que o bFGF numa base molar. Para além da sua capacidade para estimular a proliferação de células ACE o factor de crescimento derivado de FS estimulou o crescimento de células endoteliais capilares derivadas de cérebro de bovino bem como as de células de HUE (Fig. 4). Estes resultados indicam que o efeito mitogénico do factor não é limitado pelas variações de espécie nem pela origem das células endoteliais vasculares. Contudo, e em contraste com o bFGF, o factor não é mitogénico para células BHK-21 (Fig. 4C) nem é mitogénico para células do cortex adrenal, células endoteliais corneais, células granulosas ou células BALB/MK (Fig. 5). Por conseguinte, e em contraste com o FGF, este factor parece ter uma grande especificidade para células endoteliais vasculares.

Descrição Pormenorizada das Figuras 1 a 7

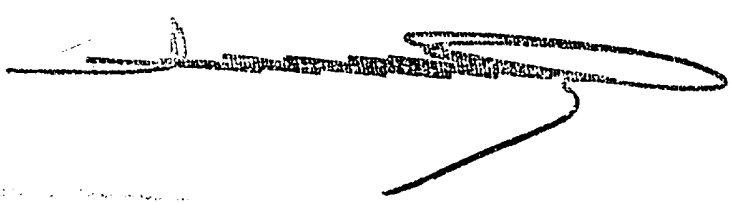
Fig. 1 Purificação de FSDGF por HSAC, cromatografia de exclusão de gel e cromatografia de permuta iónica em Mono S

Fig. 1A. Aproximadamente 350 ml das fracções de precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derivadas de 2l litros de meio condicionado por células de FS e dialisadas contra a Tris HCl 10 mM de pH 7,3 e NaCl 50 mM foram feitos passar numa coluna de Sepharose de heparina



(1,5 cm x 12 cm, 25 ml de volume de leite) a um caudal de 150 ml/h. A coluna foi em seguida lavada com 150 ml de tampão de equilíbrio (Tris-HCl 20 mM pH 7,3, NaCl 50 mM), e as proteínas retidas (50% do total de proteína aplicada à coluna) foram eluídas com uma aplicação por fases de concentrações crescentes de NaCl (NaCl 0,15 M, 0,45 M, 1 M e 3M). A dimensão da fracção foi de 2 ml e o caudal foi de 60 ml/h. A cromatografia foi realizada a 4°C e monitorizada a absorvância a 280 nm. O histograma e os círculos a vazio mostram a capacidade relativa dos diferentes conjuntos de fracções individuais para estimular a proliferação de baixa densidade de culturas de células ACE (5×10^3 células/placa de 35 mm). No caso das fracções reunidas (eluir, lavar e NaCl 0,15 M), diluiu-se as aliquotas dez vezes em gelatina a 0,2% em PBS e submeteram-se aliquotas de 10 μ l a bioanálise. No caso de fracções individuais de NaCl 0,45 M e 1 M, as aliquotas foram diluídas uma centena de vezes em gelatina a 0,2% em PBS e submeteram-se aliquotas de 10 μ l a bioanálise. A maior parte da actividade biológica estava presente no eluído de NaCl 1 M.

Fig. 1B Depois de concentrar as fracções bioactivas 126 a 133 de HSAC de NaCl 1 M até 1 ml num concentrador Amicon YM10, aplicou-se o retentado da ultrafiltração numa coluna de Bio Gel P-60 (100 a 200 malhas, 1 x 95 cm) equilibrada e carregada a 4°C em PBS. O caudal para o desenvolvimento da coluna foi de 6 ml/h e recolheram-se fracções de 1,45 ml. A absorvância foi monitorizada a 280 nm. As posições de eluição de marcadores de massa molecular (em kDa) encontram-se indicadas com setas. Diluíram-se 1 para 100 aliquotas de cada fracção da coluna em de gelatina a 0,2 % em PBS e submeteram-se a bioanálise em células ACE aliquotas de 10 μ l em placas de 12

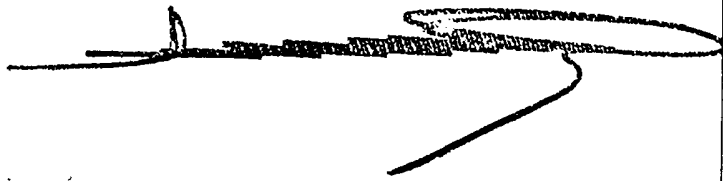


alvéolos, como descrito em Materiais e Métodos. A maior parte da bioactividade foi eluída sob a forma de um único pico com um PM de 40 a 45 kDa.

Fig. 1C. As fracções bioactivas 26 e 29 eluídas a partir da coluna de Bio Gel P-60 foram reunidas e diluídas três vezes com HEPES 20 mM de pH 8.3. Usando um "Super loop" de 50 ml, a amostra foi em seguida aplicada numa coluna Mono S HR 5/5 equilibrada em HEPES 20 mM de pH 8,3. A coluna foi em seguida eluída com uma gradiente de NaCl (0 M até 1 M) como se segue: NaCl 0 M durante 5 min, NaCl 0 M até 0,45 M em 45 min, NaCl 0,45 até 1 M em 25 min. NaCl 1 M durante 45 min. A absorvância foi monitorizada a 280 nm. O caudal foi de 1 ml por minwe recolheram-se fracções de 1 ml. Diluíram-se 1 para 100 alíquotas de cada fracção em gelatina a 0,2% em PBS e submeteram-se a bioanálise em células ACE alíquotas de 10 μ em placas de 12 alvéolos como descrito na secção de Materiais e Métodos. Os histogramas mostram a distribuição da actividade biológica com a maior parte da actividade biológica sendo eluída nas fracções de 37 a 40 (NaCl 0,33 M). As fracções indicadas por esteriscos foram reunidas e examinadas adicionalmente por RP-HPLC usando uma coluna C₄.

Fig.2 HPLC de fase inversa das fracções purificadas e bioactivas de Mono S e comparação da capacidade do meio condicionado por células em várias fases de purificação para estimular a proliferação de culturas de células ACE de baixa densidade.

Fig.2A. As fracções activas de Mono S (fracção 38 até 40; Fig. 3) foram carregadas numa coluna Vydac C₄ (25 x 0,46 cm, dimensão das partículas 5 μ m, dimensão dos poros 300 Å) equilibrada em TFA a 0.1 % (v/v),



acetone nitrilo a 20%. As setas mostram os tempos de injeção. A proteína foi eluída com um gradiente linear de 115 min de acetone nitrilo de 20 a 45% em TFA a 0,1 % com um caudal de 0,6 ml/min, a temperatura ambiente.

Recolheram-se fracções de 1,5 ml excepto na região onde se esperava eluir a bioactividade; nesta região os volumes da fracção foram limitados manualmente à dimensão das fracções de pico individuais. Diluíram-se 1 para 10 aliquotas de cada fracção com gelatina a 0,2 % em PBS e submeteram-se a bioanálise como descrito em Materiais e Métodos. O histograma mostra a distribuição da actividade biológica. As fracções de pico (fracções 25 e 26) indicadas pelos asteriscos foram usadas individualmente para estudos estruturais e posterior análise da sua actividade biológica.

Fig.2B. Culturas de células ACE de baixa densidade (5×10^3 células/alvéolo) foram inoculadas e a sua proliferação foi medida como descrito em Materiais e Métodos. As amostras ensaiadas eram precipitadas de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ [\triangle]; conjunto das fracções de NaCl 1 M de HSAC [\blacktriangle]; conjunto das fracções bioactivas de Bio Gel P-60 [\circ]; conjunto das fracções bioactivas de Mono S [\blacksquare]; fracção bioactiva de C_4 [\diamond]. Os pontos individuais são a media de determinações em triplicado e os desvios padrão foram inferiores a 10 % da média. As culturas de controlo expostas a DMEM suplementado com CS a 10 % tinham uma densidade final de células de $1,5 \times 10^4$ células/alvéolo.

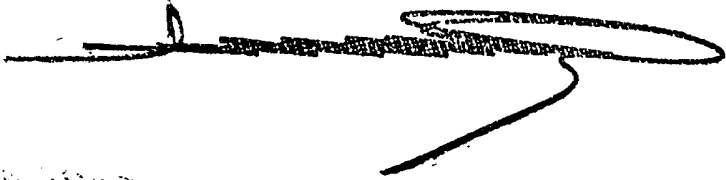
Fig. 3 NaDodSO_4 /PAGE das fracções bioactivas purificadas por RM-HPLC C_4 .

~~CONFIDENTIAL~~

As fracções em cada um dos três picos de actividade da fase de cromatografia de permuta iónica de Mono S (eluindo a NaCl 0,23 M, 0,28 M e 0,33 M, respectivamente; ver Fig. 1C) foram reunidas e cada conjunto foi posteriormente purificado por RP-HPLC C_4 , como descrito na Fig. 2A. Em cada caso, os dois picos de actividade eluídos a partir da coluna C_4 (ver Fig. 2A) foram recolhidos e reunidos. Amostras do material recolhido de cada uma das três eluições da coluna C_4 foram seguidas submetidas a electroforese num gel de poliacrilamida a 15% sob condições redutoras (pistas 3 a 5) ou não-redutoras (pistas 6 a 8). O gel foi em seguida corado utilizando o conjunto de coloração de BioRad de nitrato de prata. As amostras eram: pistas 3 e 6, conjunto de 0,23 M; pistas 4 e 7, conjunto de 0,28 M; pistas 5 e 8, conjunto de 0,33 M. Os marcadores de peso molecular depositados nas pistas 1, 2 e 9 eram: albumina de soro de bovino (PM 66 000), ovalbumina (PM 42 700), anidrase carbónica (PM 31 000) e lisozima (PM 14 500).

Fig.4 Comparação do bFGF derivado de pituitária com o FSdGF no que se refere à capacidade para estimular o crescimento de células HUE (A), células ACE (B) e células BHK-21 (C).

Fig.4A As culturas de densidade baixa de células de HUE (5×10^3 células por alvéolo gelatinizado de 1 cm de diâmetro) foram expostas a meio tampão 199 HEPES (25 mM) suplementado com 100 μ g.ml de heparina, selénio 10^{-8} M, FCS a 20 % e concentrações crescentes de bFGF (O) ou de derivado de pituitária ou FSdGF (●). Adicionou-se heparina apenas uma vez na altura da inoculação enquanto se adicionaram os factores bFGF e FSdGF dia sim dia não. Depois de seis dias em cultura, trataram-se com tripsina os alvéolos em triplicado e contaram-se as células.




A densidade final das culturas expostas a FCS a 20% isoladamente foi $1,5 \times 10^4$ células por alvéolo. O desvio padrão foi inferior a 10 % da média.

Fig.4B As culturas de baixa densidade de células ACE (5×10^3 células por alvéolo de 1 cm de diâmetro) foram expostas a DMEM suplementado com CS 10 % e a concentrações crescentes quer de bFGF derivado de pituitária (O) quer de FSdGF (●) adicionado em dias alternados. Depois de 5 dias em cultura, trataram-se com tripsina os alvéolos em triplicado e contaram-se as células. A densidade final das culturas expostas a CS a 10 % isoladamente foi $1,3 \times 10^4$ células por alvéolo. O desvio padrão foi inferior a 10 % da média.

Fig.4C. Expuseram-se culturas de baixa densidade de células BHK-21 (2×10^4 células por placa de cultura gelatinizadas de 35 mm) foram expostas a 2 ml de DMEM-F12 (1 para 1 v/v) suplementado com Fungizona 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, gentamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, transferrina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, insulina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e concentrações crescentes quer de bFGF derivado de pituitária (O) ou FSdGF (●). A insulina e a transferrina foram adicionadas apenas uma vez. bFGF e FSdGT foram adicionados cada um dos outros dias. Depois de 4 dias em placas de cultura triplicadas foram tratadas com tripsina e as células contadas. A densidade da cultura final exposta a transferrina e a insulina isoladamente foi $1,38 \times 10^4$ células/placa. O desvio padrão foi inferior a 10 % da média.

Fig.5 Comparação de bFGF com FSdGF no que se refere à capacidade para estimular a proliferação de células BCE, células granulosas, células do cortex adrenal e células BALB/MK.




Inocularam-se 2×10^4 células de BCE, células granulosas ou células do cortex adrenal em placas de 35 mm nos respectivos meios (DMEM) suplementado com CS a 10% para células BCE e do cortex granulosas). Inocularam-se células BALB/MK a uma densidade de 3×10^4 células por placa de 35 mm em meio Eagle modificado de baixa concentração de Ca (40) suplementado com FCSa 10%. Adicionaram-se bFGF derivado de pituitária (bFGF, 2 ng/ml) ou FSdGF (5 ng/ml) em dias alternados. As células BALB/MK foram também expostas a aFGF (10 ng/ml) uma vez que este mitogene é tão potente como FGF na promoção do seu crescimento. Depois de 6 dias em culturas, as células foram tratadas com tripsina e contadas num contador Coulter. O desvio padrão foi inferior a 10% da média.

A Microsequência Revela uma Única Sequência N-Terminal de Ácidos Aminados


Identificou-se um ácido aminado simples em cada um dos primeiros 12 ciclos, consistente com uma proteína homogênea. O rendimento do resíduo amino-terminal foi de 150 picomoles. As atribuições não ambíguas feitas para os ciclos 1 a 12 foram como se segue: Ala-Pro-Met-Ala-Glu-Gly-Gly-Gln-Lys-Pro-His-Glu. Uma pesquisa na base de dados NBRF usando o programa FASTP de Lipman e Pearson (35) não mostrou qualquer homologia significativa entre esta sequência e qualquer proteína conhecida.

Análise de Sequência de Peptídeos Triptícos

Reduziram-se 12 μg de FSdGF em 200 μl numa solução que continha cloridrato de guanidina 6 M, Tris base 0,5 M de pH=8, EDTA 1 mM e ditiotretol 10 mM durante 1 hora a 37°C. A proteína reduzida foi alquilada por adição de iodoacetamida sólida para dar uma concentração final de 25 mM e a reação foi deixada prosseguir durante 30 minutos à tempera-



tura ambiente. A seguir à reacção de alquilação as lisinas foram modificadas com anidrido succinico. Adicionaram-se quatro alíquotas de 5 μ l cada de anidrido succinico a 100 mg/ml em acetonitrilo preparado recentemente a intervalos de 5 minutos. Depois da adição final a proteína foi desaliniada por HPLC de fase inversa usando um aparelho de HPLC Hewlett-Packard 1090L equipado com um diodo detector de ordem e uma coluna Brownlee Labs C₄ (BU 300) de 0,46 x 3 cm. O solvente A era TFA a 0,1 % em água, o solvente B era TFA a 0,1 % em acetonitrilo. O gradiente foi de 20 a 60 % de B durante 30 minutos a um caudal de 0,5 ml/min. O perfil de eluição foi monitorizado a 214 nm e o pico da proteína simples foi recolhido manualmente. O cromatograma é apresentado na Figura 6. Depois de secagem num Speed-Vac (Savant) a proteína foi redissolvida em 200 μ l de bicarbonato de amónio 100 mM. Adicionaram-se 0,4 mg de TPCK tratado com tripsina e a amostra foi incubada por uma 2 horas adicionais a 37°C. Adicionou-se uma quantidade adicional de 0,4 μ g de tripsina depois de 2 horas e a amostra foi incubada durante mais 2 horas a 37°C. Os peptídeos foram separados por um processo de HPLC idêntico e usando os mesmos solventes conforme descrito acima. A coluna era uma Vydac C₁₈ (218TP5215) eluída a 0,25 ml/min. O programa de HPLC fluiu inicialmente durante 5 minutos a B 10 % e depois eluiu-se com um gradiente de B de 10 a 70% durante 65 minutos. A eluição de peptídeos foi monitorizada a 214 nm e os picos foram recolhidos manualmente. O cromatograma é apresentado na Figura 7. Para os picos da análise de sequência de ácidos aminados 7, 15, 16, 24 e 25 foram depositados e secos directamente nos discos de fibra de vidro usados como suporte no sequenciador de proteína. Não se obtiveram quaisquer sequências para os peptídeos 15 e 16. O peptídeo 7 deu uma sequência mista com a sequência maior H-Ile-X-Pro-His-Gln-Ser-Gln-His-Ile-Gly-Glu-Met-Ser-Ile-Leu-Gln-His-Asn-e a sequência menor H-X-Val-Leu-Asp/Phe-Val-Val-X-X-Pro-. O peptídeo 24 deu uma sequência única H-Ser-Phe-Cys-Arg-Pro-Ile-Glu-Thr-Leu-Val-Asp-Ile-Phe-Gln-Glu-Tyr-Pro-Asp-Glu-Ile. O peptídeo 15 deu



uma seqüência única H-Ser-Phe-Cys-Arg-Pro-Ile-Glu-Thr-Leu-Val-Asp-Ile-Phe-Gln-Glu-Tyr-Pro-Asp/Ile-Glu. A Ser 1 dos peptídeos 24 e 25 corresponde a Ser 23 da seqüência de amino-terminal apresentada acima de modo que estas seqüências podem ser fundidas para dar a seqüência dos primeiros 42 ácidos aminados da proteína.

As atribuições não ambíguas feitas para os ciclos 1 a 12 foram as seguintes: ¹Ala-Pro-Met-Ala-Glu-Gly-Gln-Lys-Pro-His-Glu. Uma pesquisa na base de dados NBRF usando o programa FASTP de Lipman e Pearson (35) não encontrou qualquer homologia significativa entre esta seqüência e qualquer proteína conhecida.

Composições e Utilizações

O FSdGF proporcionado pela presente invenção é útil como agente de cicatrização de feridas, particularmente em aplicações em que é desejável reendotelizar tecidos vasculares, ou em que o crescimento de um novo leito capilar (angiogênese) é importante.

O FSdGF pode, para além disso, ser utilizado no tratamento de feridas pouco profundas tal como feridas dérmicas, incluindo as categorias de chagas de pressão, úlceras de estase venosa e úlceras diabéticas. Para além disso, o FSdGF pode ser usado no tratamento de queimaduras pouco profundos e de feridas no local para o enxerto de pele. Neste caso, o FSdGF é aplicado quer directamente no local ou é usado para embeber a pele que vai ser transplantada antes do enxerto. Dum modo semelhante, o FSdGF pode ser usado na cirurgia plástica quando é necessária a reconstrução que se segue a uma queimadura ou para efeitos estéticos.


A angiogênese é também importante na manutenção de feridas limpas e desinfectadas. O FSdGF pode, por conseguinte, ser usado na cirurgia geral e no seguimento do



tratamento de cortes e de lacerações. É particularmente útil no tratamento de feridas abdominais em que a passagem de material fecal aumenta o risco de infecção. A neovascularização é também a chave para a reparação de fracturas uma vez que os vasos sanguíneos se desenvolvem no local da danificação do osso. A administração do FSdGF no local da fractura é por conseguinte uma outra possibilidade de utilização.

Nos casos em que o FSdGF é usado para cicatrização de feridas como tópico, como descrito acima, pode ser administrado por qualquer das vias descritas abaixo para a reendotelização do tecido vascular ou preferivelmente por meios tópicos. Nestes casos, será administrado sob a forma de solução gel, cremes, unguento ou sob a forma de um pó seco directamente no local da ferida. Podem também ser usados dispositivos de libertação lenta que dirigem o FSdGF para o local da ferida. Nas aplicações tópicas, o FSdGF deve ser aplicado em concentrações na gama de 50 a 1 000 $\mu\text{g/ml}$, quer numa única aplicação ou em regime de doses que são diariamente ou de tantos em tantos dias por um período de uma até várias semanas.

O FSdGF pode ser usado como agente de cicatrização de feridas pós-operatório em angioplastia de balão, um processo no qual as células endoteliais vasculares são removidas junto com as placas ateroscleróticas. O FSdGF pode ser aplicado a superfícies endoteliais vasculares por aplicação intravenosa sistémica ou local quer sob a forma de uma injeção intravenosa ou sob a forma de perfusões. Se desejado, o FSdGF pode ser administrado durante períodos longos usando uma bomba micrométrica. As composições adequadas para administração intravenosa contém o FSdGF numa quantidade eficaz para promover o crescimento das células endoteliais e uma substância veicular parenteral. O FSdGF pode estar presente na composição numa larga gama de concentrações, por exemplo, de cerca de 50 $\mu\text{g/ml}$ até cerca de 1 000 $\mu\text{g/ml}$ utilizando injeções de 3 a 10 ml por paciente. Qualquer dos




veículos parenterais conhecidos pode ser usado, tal como salina normal ou dextrose de 5 a 10 %.

O FSdGF pode também ser usado para promover a endotelização em cirurgia de enxerto vascular. No caso de enxertos vasculares usando vasos transplantados de material sintético, por exemplo, o FSdGF pode ser aplicado a superfícies de enxerto e/ou nas junções do enxerto e a vasculatura que existe no sentido de promover o crescimento de células endoteliais vasculares. Para estas aplicações, o FSdGF pode ser aplicado por via intravenosa como descrito acima para a angioplastia de balão ou pode ser aplicado directamente às superfícies de enxerto e/ou à vasculatura existente quer antes quer durante a cirurgia. Em tais casos, pode pretender-se aplicar o FSdGF numa substância veicular viscosa de modo que se obtenha uma adesão à superfície afectada. Substâncias adequadas incluem, por exemplo, carbopol de 1 a 5%. O FSdGF pode estar presente no veículo numa larga gama de concentrações, por exemplo, de cerca de 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ até cerca de 1 000 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

O FSdGF pode também ser empregue para reparar danificações e seguir a enfarte de miocárdio. O FSdGF é administrado por via intravenosa para este efeito, quer em injeções individuais quer por bombas micrométricas durante um período de tempo como descrito acima.

O FSdGF pode também ser utilizado como um factor de crescimento para as culturas *in vitro* de células endoteliais. Para tais usos, o FSdGF pode ser adicionado ao meio da cultura das células a uma concentração desde cerca de 10 ng/ml até cerca de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

A sequência de ácidos aminados do FSdGF pode ser usada para projectar sondas oligonucleotídicas sintéticas para a recuperação do gene do FSdGF. Estas sondas são de uma sequência mista baseada em todas as possibilidades da escolha do código genético ou de sequência simples basea-



da nas preferências da escolha de códões e outros factores. Nos primeiros exemplos, as sondas baseadas na sequência de ácidos aminados do FSdGF de bovino serão usadas para efectuar buscas em bancos de ADNc de bovino feitas a partir de células de folículo stellate ou em bancos genómicos de bovino. Os clones de ADN de bovino que codificam para o FSdGF assim isolado serão sequenciados para determinar a codificação completa e assim a sequência de ácidos aminados do FSdGF de bovino. Os clones de FSdGF de bovino serão em seguida usados como sondas para isolar sequências de FSdGF humanas a partir de bancos de ADNc obtidos a partir de tecidos que mostram exprimir este factor, ou de bancos genómicos humanos. Deste modo, é possível estabelecer o nucleótido completo bem como a sequência de ácidos aminados de FSdGF.

Discussão

Esta é a primeira identificação, purificação e identificação biológica dum novo factor de crescimento de células endoteliais de ligação a heparina (VEGF) a partir de meio de cultura condicionado por FC de pituitária. Nos exemplos que se seguem são fornecidos pormenores adicionais.

Resultados

Verificou-se que o meio condicionado por FC estimula a velocidade de proliferação das células endoteliais microvasculares de baixa densidade. O Quadro 2 resume as fases para a purificação da actividade de promoção de crescimento e o correspondente rendimento em bioactividade. A actividade mitogénica foi precipitada por sulfato de amónio a 50 % e resuspendida num volume adequado para subsequente purificação. A fase H-S dá-nos uma via eficiente de concentrar posteriormente tal actividade e também proporciona uma purificação de dez vezes, Aproximadamente 90% da actividade biológica foi eluída na presença de NaCl 0.9 M (Fig. 8). A bioactividade não foi afectada ao aquecer as fracções a 65°C durante 5 min e diminui 25 a 30% em seguida à exposição a TFA a 0,1% (pH 2) durante duas horas.

Quadro 2

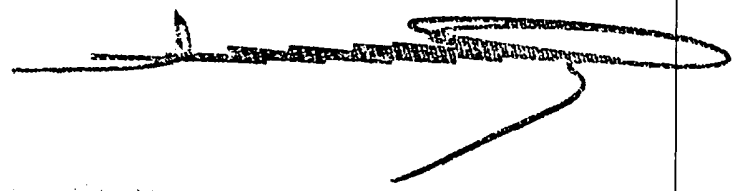
Sumário da purificação de VEGF a partir de 6 litros de meio condicionado


Fase de purificação	Proteína (ug)	Estimulação máxima (ng/ml)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
M.C. #	190 000	2500	1	100
S.A. #	175 000	2500	1	92
H-S #	13 000	250	10	68
F.I. 1	25	5	500	6
F.I. 2	4	1,2	2000	4

M.C., meio condicionado; S.A., precipitado de sulfato de amônio; H-S, heparina-Sepharose; F.I. 1 HPLC de fase inversa fase 1; F.I. 2, HPLC de fase inversa fase 2.

a concentração de proteína foi determinada por Kit Bio Rad

* a concentração de proteína foi determinada por comparação das intensidades relativas de bandas com padrões em SDS/PAGE corados com prata.






A fracção de HS mais bioactiva foi aplicada a uma coluna semi-preparativa de HPLC C₄ de fase inversa, método adequado para a purificação rápida de proteínas e peptídeos. A bioactividade foi eluída sob a forma de um pico simples na presença de acetonitrilo a cerca de 29 % (Fig. 9A). Um gel de SDS/PAGE (56) corado de prata nas fracções mais bioactivas revelou a presença de três ou quatro bandas. Estas fracções foram ainda purificadas por uma segunda fase de HPLC de fase inversa, usando uma coluna analítica C₄ que foi eluída com um gradiente de 2-propanol, em vez de acetonitrilo. Foi obtido um pico único de bioactividade correspondendo a um pico distinto no perfil de absorção. (Fig. 9B).

As fracções de pico da segunda análise da cromatografia de fase inversa apresentavam uma banda única numa SDS/PAGE corada de prata, com uma M_r aparente de cerca de 23 kDa sob condições redutoras (Fig. 10). A intensidade de coloração estava correlacionada dum forma nitida com a actividade mitogénica ao longo do perfil de bioactividade. Uma vez que ensaios anteriores utilizando um peneiro molecular com uma coluna TSK G 3000 SW tinham sugerido uma M_r na gama de 40 a 43 kDa, a possibilidade de que o factor de crescimento em condições nativas seja um dímero foi considerada. Esta possibilidade foi fortemente sugerida pela constatação de que a substância purificada tem uma M_r aparente de cerca de 45 kDa numa SDS/PAGE corada por prata sob condições não redutoras (ver Fig. 10).

Como ilustrado na Figura 11 a curva de resposta em relação à dose para o factor de crescimento purificado revelou um efeito de metade do máximo na proliferação de células endoteliais capilares derivadas do cortex adrenal a 150-200 pg/ml e um efeito máximo a 1-1,5 ng/ml. Estes valores foram derivados a partir da sequenciação da proteína e verificou-se que estavam de acordo com os valores obtidos comparando as intensidades relativas das ban-



das com padrões em SDS/PAGE corado por prata.

Por microsequenciação de fase gasosa da substância purificada demonstrou-se sem ambiguidades uma sequência de ácidos aminados N-terminal única. Os cinco primeiros resíduos são ¹Ala-Pro-Met-Ala-Glu. Outro modo para descrever a sequência de ácidos aminados N-terminal é Ala-Pro-Met-Ala-Glu-Gly-Gly-Gln-Lys-Pro-His-Glu-Val-Val-Lys-Phe-Met-Asp-Val-Tyr-Gln-(Arg)-Ser-Phe-X-Arg-Pro-Ile-Glu-Thr-Leu-(Val)-X-Ile-X-(Gln)-Glu-Tyr-(Pro)- em que os ácidos aminados em parentesis são conhecidos com um alto grau de certeza e -X- corresponde a um ácido aminado de identidade ainda desconhecida. Uma pesquisa por computador revelou que uma tal sequência não apresenta homologia significativa para qualquer proteína anteriormente conhecida.

A bioactividade do factor de crescimento foi também ensaiada com diferentes tipos de células. Conforme se apresenta na Figura 12, apreciou-se uma actividade apreciável apenas em tipos de células de origem endotelial vascular tal como células endoteliais da aorta de bovino adulto e fetais, células endoteliais capilares de cérebro de bovino e células endoteliais humanas da veia umbilical. Em contraste, células do cortex adrenal, células epiteliais do cristalino, células endoteliais corneais, fibroblastos BHK-21 e queratinócitos não apresentam qualquer resposta mitogénica significativa.

O factor de crescimento foi purificado usando uma combinação de precipitação por sulfato de amónio, cromatografia de afinidades de H-S e uma sequência de duas cromatografias de HPLC de fase inversa. A análise do produto purificado por SDS PAGE revela uma M_r de cerca de 45 kDa sob condições não redutoras. Quando o produto foi analisado em presença de 2-mercaptoetanol, uma única banda com uma M_r de 23 kDa foi visualizada, indicando que o factor

de crescimento e um dímero composto de duas sub-unidades de peso molecular aparente idêntico. A microsequênciação do produto purificado revela uma única sequência de ácidos aminados N-terminal.

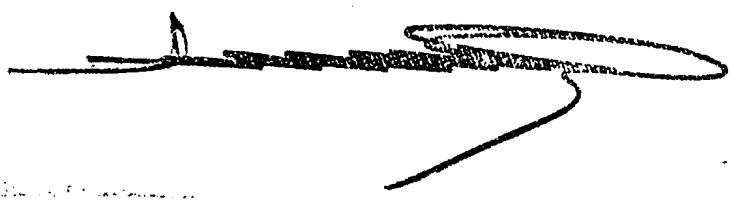
O factor de crescimento era estável ao calor e perante os ácidos e o seu p.I. é cerca de 8,5, por estimativa por cromatofocagem numa coluna de Mono P.

O factor de crescimento purificado é capaz de estimular a proliferação de células endoteliais vasculares a concentrações entre 25 pg e 1 a 1,5 ng/ml. Estes valores, admitindo uma M_r de 45 kDa, correspondem respectivamente a 0,55 pM e 22 a 33 pM. Estes valores são da mesma gama do que os obtidos com o bFGF (2,56). Contudo, o novo factor de crescimento não induz qualquer efeito mitogénico apreciável nas células endoteliais corneais, células endoteliais do cristalino, fibroblastos BHK-21, células do cortex adrenal ou queratinócitos. Em contraste, tanto o bFGF como o aFGF são potentes agentes mitogénicos para todos estes tipos de células (2,56).

A capacidade do VEGF se ligar à heparina pode ter implicações no que se refere à sua função e regulação in vivo. Os sulfatos de heparina são componentes fundamentais da matriz extracelular e tem sido indicados como desempenhando um papel importante determinando o contacto entre as células alvo e os factores de crescimento de ligação a heparina (16, 57, 58, 59).

A presença de VEGF em FC de pituitária indica um papel para estas células no desenvolvimento, organização e manutenção de um estado diferenciado da microvasculatura complexa da adeno-hipófise.

É presentemente desconhecido se o VEGF se expressa em outros órgãos para além da glândula pituitária. Contudo, considerando o papel fundamental do cresci-

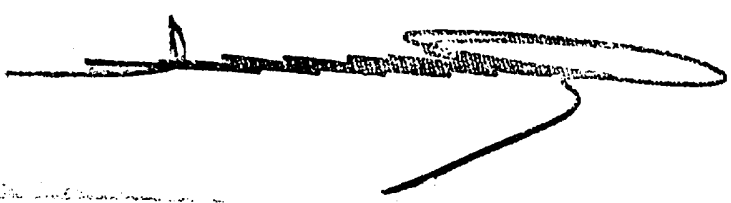


cimento das células endoteliais vasculares e da angiogénese numa grande variedade de proliferação normais e patológicas (60), é de esperar que a distribuição do factor de crescimento seja muito espalhado. Com este contexto, é interessante notar que se verificou mais tarde que os factores PDGF, EGF, TGF alfa, TGF beta, FGF e NGF, que se acreditou inicialmente serem restritos a células ou a tecidos específicos, tinham uma distribuição mais vasta e algumas vezes ubíqua (61).

Os genes para os factores bFGF e aFGF, os mitógenos de células endoteliais mais bem caracterizados não codificam para um peptídeo de sinal convencional (17,43). Deste modo, estes factores de crescimento parecem estar sequestrados dentro das células de origem e aparentemente não têm acesso directo às células alvo (2, 15, 45). Foi sugerido que o bFGF pode estar incorporado na base da membrana e ser subsequentemente libertado numa forma solúvel apenas quando a matriz é degradada a seguir à acção de enzimas específicos (16). Este mecanismo de libertação sugere um papel para o factor de crescimento principal ou exclusivamente em acontecimentos que envolvem degradação da base da membrana ou lise da célula, tal como remodelação orgânica, cicatrização de ferida ou neoplasia (60).

Em contraste, um factor de crescimento de célula endotelial solúvel como o VEGF pode desempenhar um papel mais dinâmico na regulação fisiológica da proliferação das células endoteliais vasculares quer no crescimento cíclico dos vasos sanguíneos que tem lugar nos órgãos tal como o corpo líteo (62) quer na manutenção tónica do estádio diferenciado do endotélio na árvore vascular.

Ao contrário do bFGF ou do aFGF, que são activos num espectro de células muito largo (2, 56), o VEGF parece ser específico para células endoteliais vasculares. O VEGF tem significado terapêutico especial para condições



em que é adequado uma acção seletiva nas células endoteliais vasculares, na ausência de excessiva proliferação de tecido conectivo, tal como úlceras diabéticas ou lesões vasculares traumáticas.

Descrição Pormenorizada das Figuras 8 a 12

Fig. 8 -- Perfil da bioactividade de Heparina-Sepharose (H-S) de meio condicionado com FC. O meio (6 litros) foi concentrado e aplicado a uma coluna de HS que tinha sido pré-equilibrada em Tris/Cl 10 mM de pH 7,2 contendo NaCl 50 mM. Lavou-se a coluna com o mesmo tampão e depois eluiu-se sequencialmente com Tris/Cl 10 mM de pH 7,2 contendo NaCl 0,15, 0,9 e 3 M. Diluíram-se 100 vezes aliquotas das fracções recolhidas em gelatina a 0,2 % em PBS e aplicaram-se 5 μ l/ml a células endoteliais capilares para bioanálise.

Fig. 9A e 9B - Perfis de HPLC de fase inversa sequencial de actividade mitogénica de células endoteliais. As fracções de H-S mais bioactivas foram aplicadas a uma coluna C_4 (10 x 250 mm) pré-equilibrada com TFA a 0,1 %/acetonitrilo a 20 % (Fig. 9A). Depois da coluna ser lavada com 10 ml de tampão de equilíbrio, a amostra foi eluída com um gradiente linear de acetonitrilo. Diluíram-se dez vezes aliquotas de cada fracção com gelatina a 0,2 % em PBS e aplicaram-se 5 μ l/ml a células endoteliais capilares para bioanálise. As fracções mais bioactivas foram reunidas e aplicadas a uma coluna C_4 (4,6 x 250 mm) que tinha sido pré-equilibrada com TFA a 0,1%/2-propanol a 20% (Fig. 9B). Depois de lavagem da coluna com 3 ml de tampão de equilíbrio, a amostra foi eluída com um gradiente linear de 2-propanol. Ensaíram-se aliquotas de fracções para verificação da bioactividade.

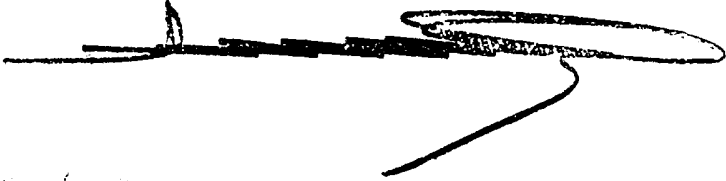



Fig. 10 -- Análise de NaDodSO_4 /PAGE da fracção mais bioactiva do cromatograma apresentada na Fig. 9B. Secaram-se duas alíquotas desta fracção num "speed vac" e redissolveram-se em tampão de amostra contendo 2-mercaptoetanol a 2,5 % (+) ou não contendo este reagente (-). As amostras foram desnaturadas pelo calor e submetidas a electroforese numa PAGE a 12,5 % que foi subsequentemente corada por prata. Os marcadores de peso molecular são: fosforilase B, 97 400; albumina de soro de bovino, 66 200; ovalbumina, 43 000; anidrase carbónica, 31 000; inibidor de tripsina de soja, 21 500; lisozima, 14 400.

Fig. 11 -- Crescimento dependente da dose de células endoteliais capilares derivado do cortex adrenal na presença de VEGF purificado. Inocularam-se células à densidade de 1×10^4 /alvéolo em placas de 12 alvéolos. As quantidades indicadas de VEGF foram adicionadas algumas horas depois de serem depositadas em placas de alíquotas de 5 μl /ml. Depois de 5 dias, contaram-se as células num contador Coulter. Os resultados apresentados representam valores médios de três ensaios separados conduzidos em duplicado. Os duplicados em cada ensaio variaram menos do que 10 %.

Fig. 12 -- Efeitos do VEGF no crescimento de diferentes tipos de células. CEC, células endoteliais corneais; BAC, células de cortex adrenal de bovino; TKC, queratinocitos; Lec, células epiteliais de cristalino; BHK-31, células de rim de hamster bebé, clone 21; ACC, células endoteliais capilares de cortex adrenal; BEC, células endoteliais capilares de cérebro de bovino; HUVE, células endoteliais humanas da veia umbilical; FBAE, células endoteliais da aorta fetal do bovino, ABAE, células endotelial da aorta de bovino adulto. As células foram inocula-

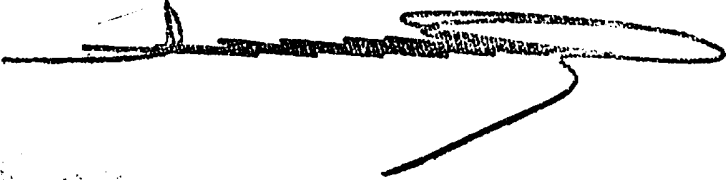


das no seu respectivo meio de crescimento, incubadas com uma concentração máxima de VEGF e contadas depois de 4 ou 5 dias. Os resultados são expressos em percentagem do controlo adequado.

A angiogénese é um fenómeno de fases múltiplas que envolve a proliferação de células endoteliais capilares, migração e infiltração nos tecidos (1). Desempanha um papel fundamental em vários processos fisiológicos e patológicos tal como desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, aterosclerose e crescimento de tumores (1, 2). Vários factores que induzem a angiogénese foram recentemente isolados e caracterizados. Destes, verificou-se que apenas as formas básica e acidica do FGF controlam directamente todas as fases da angiogénese incluindo a proliferação de células endoteliais vasculares, a migração e o aumento da expressão de activador de plasminogénio e da actividade de collagenase (2).

Apesar da evidência de que o FGF é angiogénico, duas questões enigmáticas apontam para a existência de outros factores angiogénicos que poderiam complementar a acção do FGF. Em primeiro lugar, no FGF não existem as sequências de sinal hidrofóbico que governam a secreção (12, 13), ainda que para aceitação como um factor angiogénico qualquer presumível mediador devesse ser apresentado como sendo uma substância difusível que induz formação de novos capilares a partir dum leito microcirculatório. Em segundo lugar, o FGF é produzido pelas próprias células endoteliais (14, 15). Se o FGF está presente nas células endoteliais circundantes se bem que as células sejam quiescentes, outros factores devem entrar na acção para desencadear a angiogénese.


A presente invenção também se refere ao isolamento e à caracterizado de um novo agente mitogénico




das células endoteliais produzido e segregado por células AtT20. Esta linha de células de rato é fornecida pela The America Type Culture Collection, 12301 Parklaw Drive, Rockville, Maryland, O factor produzido por células AtT20 tem uma única especificação de células alvo, uma vez que estimula a proliferação apenas das células endoteliais vasculares e não afecta outros tipos de células sensíveis ao FGF.

Este factor foi descoberto durante estudos sobre a expressão de bFGF e de vias de secreção possíveis da linha de células de pituitária AtT-20 (5). As células foram transfectadas com um gene de bFGF quimérico composto pela sequência de codificação para o peptídeo de sinal de secreção da hormona de crescimento fundida com a sequência de codificação para o gene de bFGF (6). A linha de células de murino foi seleccionada porque conserva as funções de secreção e pode ser usada para estudar os acontecimentos moleculares envolvidos na embalagem e na secreção da proteína (5). Esperava-se que o bFGF expresso fosse segregado por estas células quer através duma via de secreção constitutiva quer através duma via de secreção envolvendo grânulos secretórios. Quando o meio condicionado por células AtT-20 transfectadas foi examinado para verificar da actividade anglogénica, uma quantidade considerável de actividade estava presente, a qual não pode ser imunoneutralizada por anticorpos contra bFGF e não apresentou reacção cruzada numa análise de RIA específica para o bFGF. Do mesmo modo, o meio condicionado por células progenitoras que não expressam o gene de bFGF também continha uma quantidade considerável de bioactividade, o que sugeria que um factor não relacionado com o bFGF era responsável por esta actividade.

O mitogene de células endoteliais presente no meio condicionado foi em seguida purificado por uma combinação de fases incluindo cromatografia de afinidade



de Sepharose de heparina, cromatografia de gel de exclusão em Sephadex G 100, cromatografia de permuta catiónica em resina Mono S e finalmente por PR-HPLC com coluna Vydac C₄ (ver Quadro 3), As fracções foram analisadas para verificação da bioactividade usando células endoteliais capilares derivadas do cortex adrenal. Quando o produto recolhido foi aplicado em HS sob condições descritas na Fig. 13A a actividade foi eluída num largo pico na gama de 0,5 a 0,6 M. No sentido de o concentrar, efectuou-se a eluição com NaCl 0,8 M. Este produto quando aplicado em Sephadex G 100 deu o maior pico de bioactividade que foi eluída com um PM aparente de cerca de 45 kDa. Quando cromatografado em Mono S sob condições indicadas na Figura 13 C, observou-se um único pico bioactivo maioritariamente que foi eluído com NaCl 0,28 M. A purificação final foi conseguida por RP-HPLC usando uma coluna Vydac (Fig. 13D). Toda a bioactividade detectada estava presente em dois picos de proteína aguçados muito próximos que quando analisados por Na₂DodSO₄/PAGE sob condições não redutoras deram uma banda única com um peso molecular aparente de 45 kDa. Quando observado sob condições redutoras, a banda tinha um peso molecular aparente de 23 kDa (Fig. 13D). Numa das fracções, estava também presente uma pequena quantidade de contaminante com um PM de 27 kDa cuja migração não era afectada por redução. A quantidade desse contaminante não era superior a 5 % do total, Quando a actividade de pico maior foi novamente analisada sob condições idênticas numa coluna C₄. obteve-se um pico único de proteína com um pequeno patamar (Figura 13 D). Por microsequenciação deste produto foi revelado uma sequência de ácidos aminados terminal única. Sequenciaram-se aproximadamente 2 µg (80 pmole) de proteína usando um sequenciador de proteína de fase gasosa Applied Biosystems 477A. Identificou-se um só ácido aminado em cada um dos 24 primeiros ciclos, o que está de acordo com uma proteína homogénea. O rendimento do resíduo amino-terminal foi 30 pmole. Modos de atribuição não ambigua para os ciclos de 1 a 5 são os seguintes: Ala-Pro-Met-Ala-Glu. Uma sequência de ácidos aminados mais



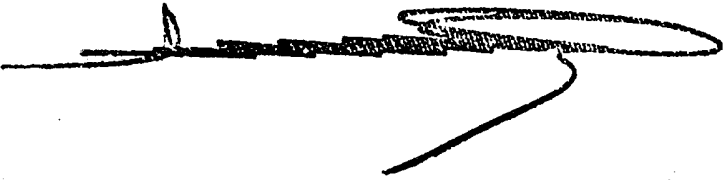
longa para o factor de crescimento a partir de AtT-20 foi mais tarde determinada e é descrita seguidamente.

Uma pesquisa da base de dados NBRF utilizando o programa de Lipman e Pearson (35) não encontrou qualquer homologia significativa entre a sequência dos primeiros 22 ácidos aminados e qualquer proteína conhecida.

A curva da resposta em relação à dose para o factor de crescimento apresentada na Fig. 15B ilustra como uma quantidade tão pequena como 50 pg/ml estimula a proliferação de ACE.

Observou-se a saturação a 1 ng/ml com um ED_{50} de 150 pg/ml. Estes valores podem ser comparados favoravelmente com a gama de concentrações em que o bFGF promove a proliferação de células ACE (efeito mínimo de cerca de 10 pg/ml, saturação a cerca de 200 pg/ml e ED_{50} a 50 pg/ml, (22) e Fig. 15). Contudo, a densidade final do crescimento da cultura em presença do factor de crescimento derivado de atT20 foi metade da das culturas expostas a concentração óptimas de bFGF, indicando que o tempo médio de duplicação das células ACE era mais longo quando levado a proliferar pelo factor de crescimento derivado de AtT20 do que pelo bFGF. Apesar disso, se se considera que o PM do factor de crescimento derivado das células AtT-20 é 2,5 vezes o de bFGF poderia pensar-se que tem mais ou menos a mesma potência que o bFGF. Para além da sua capacidade para estimular a proliferação de células ACE o factor de crescimento derivado de atT20 estimula o crescimento das células endoteliais capilares de cérebro de bovino bem como o das células HUE (Fig. 15A).

Isto indica que o seu efeito mitogénico não está limitado por variação de espécies nem pela origem das células endoteliais vasculares. Surpreendentemente, ele não estimula a proliferação mesmo das células BHK-21,



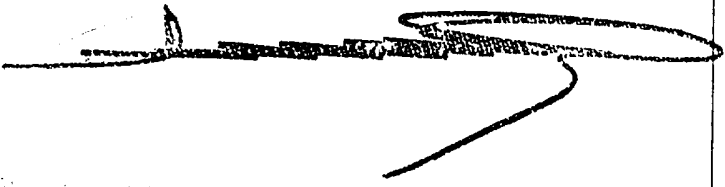
uma linha de células conhecida por responder a uma larga variedade de mitogenes incluindo TGF α , EGF, PDGF, TGF β e aFGF ou bFGF (como verificado em (26), nem foi mitogénico para células do cortex adrenal, células endoteliais corneais, células granulosas, células vasculares de músculos brandos ou células BALB/MK (Figura 15D). Por conseguinte, e em contraste com FGF, parece ter uma única especificidade para células endoteliais vasculares. Os presentes dados estabelecem que células AtT20 que conservam muitas propriedades químicas e fisiológicas importantes de corticotrofo de pituitária, em particular a capacidade para sintetizar e libertar como principais produtos de secreção ACTH, B-lipopropina e B-endorfina (64), produzem também um factor angiogénico.

Quadro 3

Sumário de purificação do factor de crescimento derivado de ATF-20

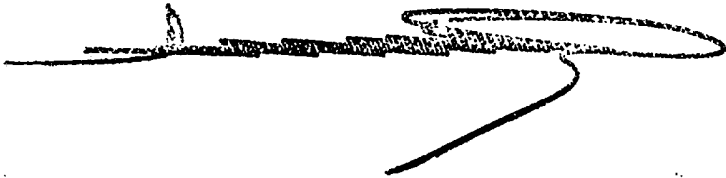
Fases de purificação	Proteína (µg) ^a	ED ₅₀ b(ng/ml)	Actividade total	Rendimento(%)	Purificação (vezes)
(NH ₄) ₂ CO ₄	480 000	1500	320 000	100	1
HSAC	180 000	36	522 000	163	42
G100	1 500	7	210 000	65	214
Mono S	72	0,4	180 000	56	3 750
RP HPLC C4	7 ^c	0,15	43 000	13	10 000

- a) A proteína foi avaliada utilizando o reagente de Bradford da Bio Rad com BSA como padrão
- b) O ED₅₀ foi determinado como concentração de proteína que deu uma estimulação de metade da proliferação de células na análise de células de ACE. Corresponde a uma unidade de actividade.
- c) A proteína foi determinada utilizando E₂₁₀^{1%} = 140.



As propriedades físicas do factor de crescimento (PM 45 kDa, pI básico, afinidades para HS) e as propriedades biológicas (mitogénico para células endoteliais vasculares) indicam que este factor é distinto de outros factores de crescimento conhecidos tais como EGF, TGF α , PDGF, TGF β ou o recentemente referido factor de crescimento de queratinócito (21). A sua falta de reconhecimento por neutralização de anticorpos policlonais dirigidos contra aFGF ou bFGF bem como a sua falta de reactividade cruzada em RIA específico para aFGF ou bFGF indica que é distinto de FGF. Parece também ser distinto do factor de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas recentemente referido (37). Apesar de terem a mesma especificidade aparente de células alvo e uma massa molecular semelhante, eles diferem de 20 vezes em potência e pela sua estrutura secundária, sendo o PDECGF um polipeptídeo de cadeia simples enquanto o factor de crescimento AtT20 tem uma estrutura dimérica.

A especificidade distinta em relação às células alvo e à sequência N-terminal diferente levam-nos à conclusão de que o factor de crescimento derivado de AtT20 representa um factor de crescimento anteriormente desconhecido. Apesar do presente estudo estabelecer claramente que este novo factor de crescimento é mitogénico para células endoteliais capilares, não é ainda conhecido se este factor pode estimular outros acontecimentos ligados à angiogénese. Estes incluem a quimiotaxia das células endoteliais capilares e a activação da síntese de enzimas celulares tais como a colagenase e o activador de plasminogénio que está envolvido na desintegração da membrana base capilar (3). Em vista desta actividade preferencial nas células endoteliais vasculares em comparação com outras células derivadas da mesoderme o nome de vasculotropina é sugerido para este novo factor de crescimento.




Dados estruturais disponíveis permitiriam estudos na clonagem, estrutura, topologia, expressão e regulação do gene do factor de crescimento quer nas condições fisiológicas quer nas patológicas, Estes estudos podem proporcionar indícios sobre a sua distribuição em tecidos normais em comparação com tecidos malignos bem como sobre as suas funções fisiológicas incluindo angiogénese.

Descrição Pormenorizada das Figuras 13 a 16

Figura 13. Purificação do factor de crescimento AtT20 por HSAC, cromatografia de exclusão de gel, cromatografia de permuta iónica Mono S e R-HPLC em coluna C₄

Figura 13A. Aproximadamente 490 ml de fracções precipitadas por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derivadas de 30 litros (6 recolhas de 5 litros com dois dias de intervalo de meio condicionado por células AtT-20 (DMEM-H21) suplementado com 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrina e dda-lisados contra Tris HCl 10 mM de pH 7,3, NaCl mM, foram carregados numa coluna de Sepharose de hiparina (1,5 cm x 12 cm, 25 ml de volume de leito) com um caudal de 150 ml/h. A coluna foi em seguida lavada com 150 ml de tampão para equilibrar (Tris-HCl 20 mM de pH 7,3, NaCl 50 mM) e as proteínas retidas (50% do total das proteínas aplicadas na coluna) foram eluidas com uma aplicação por fases de concentrações crescentes de NaCl (NaCl 0,3 M, 0,8 M e 3 M). A dimensão da fracção foi de 3 ml e o caudal foi de 6 ml/h. A cromatografia foi realizada a 4°C e a absorvância foi monitorizada a 280 nm. O histograma e círculos a cheio mostram a capacidade relativa das diferentes fracções reunidas ou individuais para estimular a proliferação de culturas de células de ACE de baixa densidade (5×10^3 células/alvéolo, 12 alvéolos por placa). As condições para ensaio da actividade biológica eram semelhantes às descritas em (37). A maior parte da actividade biológica estava presente

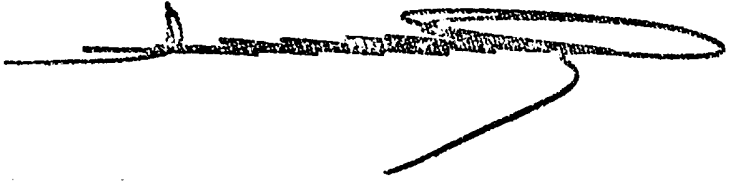


no eluído de NaCl 0,8 M.

Fig. 13B. Depois de concentrar as fracções bioactivas de HSAC NaCl 0,8 M até 1 ml num concentrador Amicon YM10 aplicou-se o retido da ultrafiltração numa coluna de Sephadex G 100 (1 x 95 cm) equilibrada e eluída a 4°C em PBS. O caudal para desenvolvimento da coluna foi de 6 ml/h e recolheu-se fracções de 3 ml. A absorvância foi monitorizada a 280 nm. As posições de eluição de marcadores de massa molecular (em kDa) foi como indicado pelas setas. Diluíram-se 1 para 100 aliquotas de cada fracção da coluna em de gelatina e 0,2 % em PBS, e submeteram-se a bioanálise aliquotas de 10 µl.

Fig. 13C. As fracções bioactivas eluídas a partir da coluna de Sephadex G 100 foram reunidas e diluídas três vezes com HEPES 20 mM de pH 8.3. Utilizando um "Super loop" de 50 ml, a amostra foi em seguida aplicada numa coluna de Mono S HR 5/5 equilibrada com Hepes 20 mM de 8,3 à temperatura ambiente. Eluiu-se em seguida a coluna com um gradiente multilinear de NaCl (0 M até 1 M) como se segue: NaCl 0 M durante 5 minutos, NaCl 0 M até 0,45 M em 45 minutos, NaCl 0,45 M até 1 M em 15 minutos, NaCl 1 M durante 5 minutos. A absorvância foi monitorizada a 280 nm. O caudal foi de 1 ml por min. e foram reunidas fracções de 1 ml. Diluíram-se de 1 para 100 aliquotas de cada fracção em gelatina a 0,2 % em PBS, submeteram-se a bioanálise aliquotas de 10 µl em células ACE em placas de 12 alvéolos como descrito atrás. O histograma mostra a distribuição de actividade biológica com a maior parte da actividade biológica eluindo-se nas fracções 33 a 35 (NaCl 0,28 M).

Fig. 13D. As fracções de Mono S activas (fracções 33 a 35; Fig. 13C foram carregadas numa coluna Vydac (25 x 0,46 cm, dimensão das partículas 5 µm, dimensão do poro 300 Å) e equilibrada em TFA a 0,1 (v/v) e acetonitrilo a 20%. As setas mostram os tempos de injeção. A proteína foi eluída com um gradiente linear de 115 min de acetonitrilo




de 20 a 45% em TFA a 0,1% com um caudal de 0,6 ml/min, à temperatura ambiente. Recolheram-se fracções de 1,5 ml. Diluíram-se de 1 para 10 aliquotas de cada fracção com gelatina a 0,2 % em PBS e submeteram-se a bioanálise como descrito acima. O histograma apresenta a distribuição da actividade biológica, As fracções de pico (22, 24) foram usadas individualmente para estudos estruturais e para análise mais aprofundada da sua actividade biológica. (a) O pico de actividade maior foi reeluido nas mesmas colunas como apresentado na inserção b, as fracções de pico foram tomadas para análise de sequência de amino e terminal. (b) Amostras de proteína marcadas por ^{125}I da fracção 22 (pistas A,C) e 23 (pistas B,D) foram analisadas individualmente em condições não redutoras (pistas A,B) ou em condições redutoras (pistas C,D).

Fig. 14 - Realizou-se electroforese sob as condições descritas, Em condições não redutoras verificou-se a existencia de um componente de cerca de 43 a 45 kDa. Em condições redutoras apareceu um componente de cerca de 23 kDa. Depois da electroforese os géis foram corados com azul de Coomassie. descorados, secos e submetidos a autoradiografia. A migração das amostras foi comparada à dos padrões de proteína não reduzidos (esquerda) ou reduzidos (direita): 97,66,43,30,21 kDa.

Fig. 15 - Comparação da capacidade do bFGF derivado de pitutária com o factor de crescimento derivado das células AtT-20 para estimular os crescimento de células HUE (a), células ACE (B) e células BHK-21 (C).


Fig. 15A. Culturas de baixa densidade de células HUE (21) (5×10^3 células por alvéolo gelatinizado de 1 cm de diâmetro) foram expostas a meio 199 HEPES (25 mM) tamponizado suplementado com 100 $\mu\text{g/ml}$ de hiparina. selénio 10^{-9} M, FSC a 20% (como descrito em (11) e aumento de concentração quer do bFGF derivado de pituitária (○) quer do factor de crescimento derivado de células AtT-20 (●).



Adicionou-se heparina apenas uma vez na altura da inoculação enquanto que tanto o bFGF como o factor de crescimento das células AtT-20 foram adicionadas em dias alternados. Depois de 6 dias em cultura, trataram-se com tripsina alvéolos em triplicado e contaram-se as células. A densidade final das culturas expostas a FES a 20% isolado foi de $7,4 \times 10^4$ células por alvéolo. O desvio padrão foi inferior a 10 % da média.

Fig. 15C. Expuseram-se baixas densidades de células BHK-21 (26) (2×10^4 células por placas de cultura de tecido gelatinizado de 35 mm) a 2 ml de DMEM-F12 (1 para 1 v/v) suplementado com 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. 10 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina e concentrações crescentes quer de bFGF derivados de pituitária (0) quer de factor de crescimento derivado de células AtT-20 (0). Adicionaram-se insulina e transferrina apenas uma vez, enquanto que o bFGF e o factor de crescimento derivado de células AtT-20 foram adicionadas em dias alternados. Depois de 4 dias em cultura trataram-se com tripsina triplicados dos discos e contaram-se as células. A densidade final da cultura exposta e transferrina insulina isoladamente foi de $1,05 \times 10^4$ células/placa. O desvio padrão foi inferior a 10 % da média.

Fig. 16. Inocularam-se células BALB/MK (14) a uma densidade de 3×10^4 células por placa de 35 mm em meio Eagle modificado de baixa concentração de Ca (15) suplementado com 10 % de FCS. Inocularam-se 2×10^4 células BCE (16), células granulosas (17) ou células do cortex adrenal (18) por placa de 35 mm nos seus respectivos meios (DNME suplementado com 10 % de FCS, 5 % de CS e 10 % de CS para BCE e células do cortex adrenal e meio F-12 suplementado com 2,5 % de CS para células granulosas). Adicionaram-se o bFGF derivado de pituitária (bFGF, 2 ng/ml) ou o factor de crescimento derivado de células AtT-20 (1,5 ng/ml) em dias alternados. Expuseram-se também células BALB/MK a




aFGF (10 ng/ml) uma vez que este mitogene ser tão patente como o EGF na promoção do seu crescimento. Depois de 6 dias em cultura, as células foram tratadas com tripsina e contadas num contador Coulter. O desvio padrão foi inferior a 10 % da média.

Uma vantagem de cultivar células de bovino para recolher o factor de crescimento é que o conjunto da estrutura da célula tem uma boa integridade de coesão. Isto é. a camada de células normalmente permanece intacta para recolher o meio condicionado por muitos dias e mesmo durante um mês ou mais da recolha sucessiva de amostras de meio. Quando está presente a estrutura em cápsula, é possível recolher amostras por cima da cúpula e também do interior ou por debaixo da cúpula. A desvantagem observada durante a cultura das células de bovino reside em que estas células produzem uma grande quantidade de proteínas diferentes que são segregadas pelas células. Deste modo, as fases de purificação precisam de ser capazes de remover maiores quantidades da proteína não desejada.

Uma vantagem da linha de células AtT-20 é que está comercialmente disponível.

Uma vantagem da cultura de células de murino, AtT-20, é que estas células produzem o novo factor de crescimento sem produzir uma grande quantidade de outras proteínas que podiam interferir com as fases de isolamento subsequentes.

A desvantagem de cultivar células de murino AtT-20 é que a integridade estrutural da cultura de células não é elevada. Deste modo, durante a cultura e a recolha, pequenas porções da camada de células podem partir-se, flutuar no meio condicionado e depois morrerem. Muitas vezes a cultura das células de murino apenas é possível até cerca de 7 dias ou por períodos ligeiramente mais longos.



O novo factor de crescimento com origem em bovino é muitas vezes de pureza suficiente depois da fase de mono S e uma fase de Sephadex G-100 de modo que não é necessária a purificação por RP HPLC-C₄. A análise por RP HPLC pode ser adequada para determinar a pureza de FsdGF.

SEQUENCIA DE ÁCIDOS AMINADOS DO FACTOR DE CRESCIMENTO DE MURINO

A sequência N-terminal foi determinada para a proteína do factor de crescimento derivado das células de rato AtT20. Duas análises de sequenciação N-terminal foram realizados num sequenciador de proteínas de fase gasosa Applied Biosystems. Na segunda análise, o sequenciador foi carregado com aproximadamente 2,5 vezes a quantidade de proteína da primeira análise.

Como resultado de comparação dos dados das duas análises de sequenciação, a seguinte sequência N-terminal foi determinada:

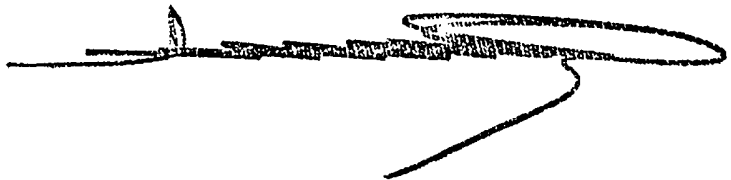
X'-Pro-Thr-Thr-Glu-Gly-Glu-Gln-Lys-Ala His-Glu-Val-Val-Lys-Phe-Met-Asp-Val-Tyr-Gln-Arg-Ser-...

Na posição do ácido aminado um-(X') detectaram-se três ácidos aminados diferentes (Ala, Gly, e Ser), sendo Ala o mais frequente. Uma vez que este resíduo de ácido aminado é ambiguo, o resíduo é representado por "X".

A comparação da sequência obtida a partir das células AtT20 de rato com os 23 ácidos aminados N-terminais determinados para a proteína de FsdGF de bovino demonstrou que estas duas proteínas são substancialmente homólogas:

rato

AtT20 prot.; X'-Pro-Thr-Thr-Glu-Gly-Glu-Gln-Lys-Ala-His-Glu-Val-Val-Lys-Phe-Met-Asp-Val-Tyr-Gln-Arg-Ser-...



bovino

FSdGF: Ala-Pro-Met-Ala-Glu-Gly-Gly-Gln-Lys-Pro-His-Glu-
-Val-Val-Lys-Phe-Met-Asp-Val-Tyr-Gln-Arg-Ser-...

Os Exemplos seguintes tem como finalidade ilustrar a presente invenção apenas a título de exemplo, não devendo ser considerados de qualquer modo como restringindo o seu âmbito.

Reagentes -- Os meios de cultura de tecido e os reagentes foram obtidos da Gibco (Grand Island, N.Y.). O acetonitrilo e o 2-propanol foram adquiridos na Fischer Sci. (Fair Lawn, NJ). A heparina-Sepharose (H-S) foi obtida de Pharmacia (Piscataway, N.J.). As colunas de HPLC Vydac foram de Separation Group (Hesperia, CA). Os marcadores de peso molecular para PAGE e o conjunto de determinações de proteína foram da Bio Rad Labs (Richmond, CA). As placas de cultura de tecido foram adquiridas a Coster, excepto para as placas de Nunc de grande escala (24,5 x 24,5 cm), que foram da Applied Sci. (San Francisco, CA). Todos os outros reagentes foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) ou da Applied Biosystems (Foster City, CA).

EXEMPLO A


A intenção deste exemplo era a determinação do peso molecular do factor de crescimento de células endoteliais segregado no meio por células foliculares.

Incubaram-se culturas confluentes de células foliculares foram incubadas durante três dias num meio isento de soro constituído por meio de Eagle modificado por Dulbecco de baixo teor em glucose suplementado com transferrina (10 μ l/ml), insulina (5 μ g/ml), glutamina 2 mM e antibióticos. O meio condicionado (CM) (150) ml foi então recolhido, centrifugado (1000 xg, 15 min. 4°C) no sentido de remover os resultados das células e depois apli-

~~SECRETARIA DE SAUDE~~

cado a uma coluna de Heparina-Sepharose que tinha sido equilibrada previamente com Tris/Cl 10 mM de pH 7.0. A coluna foi então séquentialmente eluída com Tris/Cl 10 mM de pH 7.0 que continha NaCl 0,6, 1 e 3 M. O caudal foi de 2l ml/h. Recolheram-se fracções de 700 μ l e analisaram-se aliquotas para a bioactividade em células endoteliais microvasculares derivadas do cortex adrenal. A maioria da bioactividade foi eluída na presença de NaCl 0,6 M. Este comportamento cromatográfico é diferente do dos factores aFGF ou bFGF que são conhecidos por serem eluídos, respectivamente, na presença de NaCl 0,9-1.1 M e NaCl 1,8-2.2 M.

As fracções de NaCl 0,6 mais bioactivas foram reunidas e examinadas adicionalmente para determinação do peso molecular da actividade do factor de crescimento. Preparou-se uma placa de gel SDS de poliácridamida a 12,5% normal. Adicionou-se glicerol a dez por cento às fracções reunidas. Cinquenta por cento da amostra foi tratada com 2-mercaptoetanol a 2,5 %. Os 50% restantes não foram expostos a 2-mercaptoetanol ou outros agentes redutores. As amostras e os marcadores de peso molecular pré-corados foram então incubados durante 3 min a 37°C e submetidos a electroforeses durante toda a noite com uma corrente de 10 mA. Quando a electroforese ficou completa, o gel foi rapidamente lavado em PBS e a distância dos marcadores de peso molecular desde o cimo do gel foi imediatamente medida. Foram cortadas tiras horizontais de vinte centímetros e meio com uma lamina de barbear tanto das pistas que foram eluídas sob condições redutoras como das eluídas sob condições não redutoras. As tiras foram em seguida lavadas duas vezes com 1 ml de PBS e depois agitadas durante a noite a duas vezes com 1 ml de PBS e depois agitadas durante a noite a 4°C em tubos individuais que continham 500 μ l de gelatina a 0,2 % em PBS para eluição da actividade biológica. As tiras do gel foram em seguida removidas dos tubos, que foram em seguida centrifugados com o



fim de remover partículas que estivessem presentes. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. Ensaia-ram-se aliquotas de 20 microlitros de cada uma das fracções paraverificação da actividade biológica nas células endoteliais.

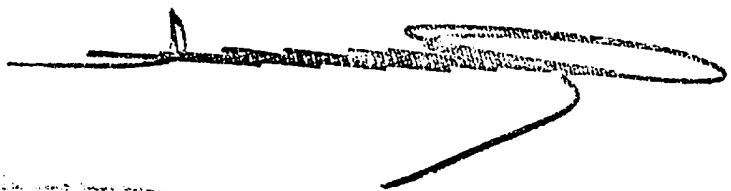
Observou-se um único pico de bioactividade no grupo não exposto a 2-mercaptoetanol. O peso molecular aparente, conforme determinado comparando a posição dos marcadores de peso molecular com a das tiras, foi de cerca de 43 000. Não se recuperou qualquer bioactividade das tiras expostas a 2-mercaptoetanol.

Estes resultados deram uma boa determinação do peso molecular do factor de crescimento, que tinha sido confirmado com a molécula purificada até homogeneidade, e também indicaram que esta actividade é destruída pelos agentes redutores.

EXEMPLO I

CULTURA DE CÉLULAS FOLICULARES E RECOLHA DE MEIO

Estabeleceram-se culturas primárias de pituitária de bovino FC como anteriormente descrito (20,41). Numa forma de concretização, na cultura de soro de bovino fetal a 20 % na referência 20 foi reduzido para 10 %. As concentrações de 5 a 20% devem ser eficazes. Também não se usou ADNase. Todas as outras componentes são idênticas. Na confluência, as células foram passadas para placas de cultura de tecido em larga escala na presença de meio de Eagle modificado por Dulbecco com baixo teor de glucose (DMEM) suplementado com 10% de soro de bovino fetal, glutamina 2 mM e antibióticos. Imediatamente depois de atingir a confluência, as culturas foram completamente lavadas com PBS a fim de remover as componentes do soro. Incubaram-se em seguida as células num meio isento de soro cons-



tituido por DMEM mais transferrina (10 ul/ml), insulina (5 ug/ml), selênio (10^{-9} M), glutamina 2 mM e antibióticos. Depois de três ou quatro dias, recolheu-se o meio e substituiu-se por meio fresco isento de soro. O meio recolhido foi centrifugado (1000 g, 15 min, a 4°C) e armazenado a -70°C. O meio condicionado (CM) foi em seguida recolhido de três em três ou de quatro em quatro dias até seis semanas.

EXEMPLO 2

CONCENTRAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO


Lotes de quatro a seis litros de meio condicionado (CM) foram submetidos a precipitação por sulfato de amônio. Adicionou-se com agitação constante sulfato de amônio (500 g/l). até dissolução completa do sal. Depois de 8 a 12 horas na câmara frigorífica, o produto foi centrifugado (20 000 xg, 45 min a 4°C). Separou-se o sobrenadante e o sólido foi ressuspendido com Tris/Cl 10 mM de pH 7,2 e NaCl 50 mM e dialisado a 4°C contra o mesmo tampão durante 8 a 12 h. O volume final foi 50 a 60 vezes menos que o original.

Em alternativa, o CM é concentrado usando uma célula de agitação Amecon (unidade de 2,5 litros) usando uma membrana que tem um limiar de separação de peso molecular de 10 000 Daltons com resultados semelhantes.

EXEMPLO 3

CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DE HEPARINA-SEPHAROSE

O CM concentrado foi aplicado a uma coluna de H-S (14) (10 ml) pré-equilibrado com Tris/Cl 10 mM de pH 7,2 e NaCl 50 mM. A coluna foi em seguida lavada com o mesmo tampão até a absorvância a 280 nm ser desprezável e depois eluiu-se por fases com Tris/Cl 10 mM de pH 7.2 con-



tendo NaCl 0,15, 0,9 e 3 M. O caudal foi de 1.5/min. Reco-
lheram-se fracções de 1,5 ml e ensaiaram-se aliquotas diluí-
das com gelatina a 0,2 % em PBS para verificação da activi-
dade mitogénica em células endoteliais.

EXEMPLO 4


HPLC DE FASE INVERSA

- (a) As fracções de H-S mais bioactivas (conjunto de NaCl 0,9 M) foram diluídas quatro vezes com ácido trifluoroacético (TFA) em água e aplicadas a uma coluna de HPLC Vydac C₄ (10 x 250 mm) pré-equilibrada com TFA 0,1/acetoneitrilo a 20%. A coluna foi eluída com um gradiente linear de acetoneitrilo (20) a 45% em 115 min) a um caudal de 2 ml/min. A absorvância foi monitorizada a 21 nm, As fracções de 2 ml foram diluídas em gelatina a 0,2 % em PBS para análise em células endoteliais.
- (b) As fracções mais bioactivas foram reunidas, diluídas duas vezes em TFA a 0,1 % em água e aplicadas a uma coluna de HPLC Vydac C₄ (4,6 x 250 mm) pré-equilibrada em TFA a 0,1 %-2-propanol a 20%. Eluiu-se a coluna com um gradiente linear de 2-propa-
nol (20 a 45% em 113 min). O caudal foi de 0,6 ml/
/min. Diluíram-se aliquotas das fracções para bio-
análise. O restante das fracções foi seco num Speed-
-Va para SDS/PAGE (29) e análise estrutural.

EXEMPLO 5

BIOANALISE

Células endoteliais capilares de cortex
adrenal ou derivados do cérebro de bovino. células endoteliais
da aorta de bovino fetal ou adulto, células endoteliais da



veia umbilical humana, células endoteliais corneais de bovino, células do cortex adrenal, células eptiteliais do cristalino, fibroblastos BHK-21 e queratinocitos humanos foram cultivados e mantidos como anteriormente descrito (17,47,48,50,51, 52,26,53). Para as bioanalises, as células foram inoculadas na presença do seu respectivo meio de crescimento a uma densidade de 2×10^4 por placa de 35 mm ou 1×10^4 /alvéolo em 12 placas multialveolares. Adicionaram-se fracções às células em aliquotas de 5 ul/ml. Depois de 4 ou 5 dias, as células foram dissociadas por exposição a tripsina e contados num contador Counter.

EXEMPLO 6

MICROSSEQUENCIAÇÃO DAS PROTEINAS


Aproximadamente 20 pmol de proteína das fracções mais bioactivas obtidas da segunda fase de C_4 foram aplicadas directamente a um sequenciador de proteínas de fase gasosa Model 470A (Applied Bisystems). Os ciclos de degradação de Edman foram realizados e a identificação dos derivados dos acidos aminados foi feita por uma coluna de HPLC em linha (54),

EXPRESSÃO

A purificação de factores de crescimento está também descrita nas Patentes dos E.U. 4 708 948; 4 376 071; 4 350 687; 4 444 760; e 4 722 998.

A produção de ADN recombinante de factores de crescimento está descrita nas Patentes dos E.U. 4 670 394; 4 721 672; 4 738 927; 4 783 412; e 4 801 542; todas elas são aqui incorporadas por referência.

Antecipou-se que os factores de crescimento descritos aqui seriam capazes de ser clonados e produ-



zidos de acordo com os métodos descritos nas Patentes e referências mencionadas na presente memória descritiva.

Deverá entender-se que o factor de crescimento descrito na presente memória descritiva pode ser quer o dímero (43 000 até 46 000 kDa) ou o monómero (cerca de 23 kDa).


Embora apenas algumas formas de concretização da invenção tenham sido apresentadas e descritas na presente memória descritiva, torna-se evidente para os especialistas na matéria que podem ser feitos várias modificações e mudanças na presente invenção para o novo factor de crescimento de células endoteliais, nos seus métodos de isolamento, de produção usando métodos de ADN recombinante e nos seus usos na terapia (cicatrização de feridas) sem se desviar do espírito e do âmbito da presente invenção. Existe a intenção de que todas estas modificações e alterações abrangidas no âmbito das reivindicações em anexo possam ser realizadas de acordo com a presente invenção,

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de factor de crescimento derivado de folículo stellate (FSdGF) substancialmente puro sob forma isolada caracterizado por compreender as fases de:

- (a) proporcionar uma amostra biológica que contenha FSdGF;
- (b) extrair a porção solubilizada da amostra;
- (c) purificar parcialmente o FSdGF a partir do extracto usando uma fase de precipitação por um sal em meio aquoso;

- 
- (d) fraccionar o extracto purificado usando cromatografia de afinidade por meio de fracções de heparina ligadas a um suporte insolúvel como fase estacionária e empregando uma fase móvel de gradiente num sal de concentração em sal crescente;
 - (e) fraccionar o extracto usando cromatografia de exclusão em gel;
 - (f) fraccionar a amostra usando cromatografia líquida; e opcionalmente
 - (g) purificar o extracto usando cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por na fase (c) o sal de precipitação em meio aquoso ser sulfato de amónio.


- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o produto obtido ser uma proteína dimerica com um peso molecular de aproximadamente 43 kDa por determinação por electroforese em gel de SS-poliacrilamida sob condições não redutoras e conter na sua extremidade N-terminal a sequência de ácidos aminados ¹Ala-Pro-Met-Ala-Glu-Gly-Gly-Gln-Lys-Pro-His-Glu.

- 4ª -

Processo de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por o produto obtido conter adicionalmente uma sequência interna de ácidos aminados obtível por digestão trípica seleccionada de entre o grupo constituido por:

- 66 -



Ser-Phe-Cys-Arg-Pro-Ile-Glu-Thr-Leu-Val-SSp-Ile-Phe-Gln-
-Glu-Tyr-Pro-Asp-Glu-Ile; e
Ser-Phe-Cys-Arg-Pro-Ile-Glu-Thr-Leu-Val-Ssp-Ile-Phe-Gln-
-Glu-Tyr-Pro-Asp/Ile Glu.

- 5ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4 caracterizado por o produto obtido ser uma glicoproteína constituída essencialmente por duas sub-unidades substancialmente homólogas tendõ cada uma um peso molecular de cerca de 23 000 Daltons.

- 6ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o produto obtido ser eficaz na cicatrização de feridas num ser humano numa concentração entre cerca de 10 picogramas/mililitro e cerca de 500 picogramas/mililitro.

- 7ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por

- na fase de purificação parcial o FSdGF ser feito contactar com uma solução aquosa de sulfato de amónio;
- na fase de fraccionamento (d) a heparina estar ligada a Sepharose; e
- na fase de purificação (g) a cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa ser conduzida usando um gradiente de acetonitrilo;

- 67 -



- 8ª -

Processo para a preparação de factor de crescimento derivado de folliculo stellate sob forma isolada caracterizado por se proporcionar um vector de expressão replicável com capacidade para expressar a sequência de ADN que codifica para o factor de crescimento derivado de folliculo stellate num hospedeiro adequado, transformar o referido hospedeiro de modo a obter um hospedeiro recombinante e manter o referido hospedeiro recombinante sob condições que permitam a expressão da referida sequência de ADN que codifica para o referido factor de crescimento derivado de folliculo stellate.

- 9ª -

Processo de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por o produto obtido ter um peso molecular de cerca de 43 000 Da.


- 10ª -

Processo de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o produto obtido ser uma proteína com um peso molecular de aproximadamente 43 a 45 kDa por determinação por electroforese em gel de SS-poliacrilamida sob condições não redutoras.

- 11ª -

Processo de acordo com a reivindicação 10 caracterizado por o produto obtido conter na sua extremidade N-terminal a sequência de ácidos aminados Ala-Pro-Met-Ala-Glu-Gly-Gly-Gln-Lys-Pro-His-Glu-Val-Val-Lys-Phe-Met-Asp-Val-Tyr-Gln.

- 68 -



- 12ª -

Processo de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o produto obtido sob condições redutoras produzir um dímero substancialmente homólogo que tem um peso molecular de cerca de 23 000 Daltons.

- 13ª -

Processo para a preparação de factor de crescimento derivado de folículo stellate concentrado sob forma isolada caracterizado por compreender as fases de:

- (a) obter uma amostra de um sobrenadante líquido biológico que contém FSdGF usando o meio de condicionamento de uma cultura;
- (b) fraccionar a amostra da fase (a) usando fracções de heparina ligadas a um suporte insolúvel como fase estacionária e usando uma fase móvel de gradiente num sal de concentração salina crescente; e
- (c) purificar a fracção bioactiva da fase (b) usando electroforese em gel.

- 14ª -

Processo de acordo com a reivindicação 13 caracterizado por na fase de fraccionamento o factor de crescimento ser eluído numa concentração de cloreto de sódio entre cerca de 0,6 e 1,0 Molar.

- 15ª -

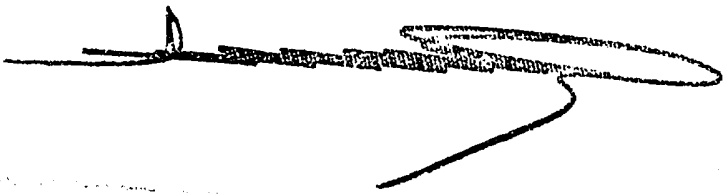
Processo de acordo com a reivindicação 14 caracterizado por na fase de purificação o gel ser uma poliacrilamida adequada.

Processo de acordo com a reivindicação 13 caracterizado por o produto obtido ter um peso molecular de cerca de 43 000 Da.

Processo para a preparação de factor de crescimento derivado de folículo stellate (FSdGF) sob forma isolada caracterizado por compreender as fases de:

- (a) proporcionar uma amostra biológica que contém FSdGF;
- (b) extraír a porção solubilizada da amostra;
- (c) purificar parcialmente o FSdGF a partir do extracto usando uma fase de precipitação por um sal em meio aquoso;
- (d) fraccionar o extracto purificado usando cromatografia de afinidade empregando fracções de heparina ligadas a um suporte insolúvel como fase estacionária e empregando uma fase móvel de gradiente de sal com uma concentração salina crescente;
- (a) fraccionar o extracto usando cromatografia de exclusão de gel; e
- (f) purificar o extracto usando cromatografia líquida de alta pressão de fase invertida.

Processo de acordo com a reivindicação 17 caracterizado por o produto obtido ter um peso molecular entre cerca de 43 000 e 45 000 Da.



- 19ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 17 ou 18 caracterizado por o produto obtido ser uma glicoproteína constituída essencialmente por duas sub-unidades substancialmente homólogas tendo cada uma um peso molecular de cerca de 23 000 Dantons.

- 20ª -

Processo de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o produto obtido ser eficaz na cicatrização de feridas num ser humano numa concentração entre cerca de 10 picogramas/mililitro e cerca de 500 micogramas/mililitro.

- 21ª -


Processo de acordo com a reivindicação 17 caracterizado por na fase de purificação (f) a cromatografia líquida de alta pressão de fase inversa ser conduzida usando um gradiente de acetonitrilo aquoso.

- 22ª -

Processo de acordo com a reivindicação 17 caracterizado por compreender adicionalmente a fase de:

- (g) purificar o produto concentrado da fase (f) usando cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa com um gradiente de isopropanol aquoso.

- 71 -



- 23ª -

Processo de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o produto obtido ter a seguinte sequência de ácidos aminados interna N-terminal: Ala-Pro-Met-Ala-Glu-Gly-Gly-Gln-Lys-Pro-His-Glu-Val-Val-Lys-Phe-Met-Asp-Val-Tyr-Gln-(Arg)-Ser-Phe-X-Arg-Pro-Ile-Glu-Thr-Leu-(Val)-X-Ile-X-(Gln)-Glu-Tyr-(Pro)- em que os ácidos aminados entre parêntesis são certos e o sinal -X- indica um ácido aminado de identidade desconhecida.


- 24ª -

Processo para a preparação de factor de crescimento de células endoteliais humanas caracterizado por se proporcionar um vector de expressão replicável com capacidade para expressar a sequência de ADN que codifica para o factor de crescimento de células endoteliais humanas num hospedeiro adequado, transformar o referido hospedeiro a fim de obter um hospedeiro recombinante e manter o referido hospedeiro recombinante sob condições que permitem a expressão da referida sequência de ADN que codifica para o referido factor de crescimento de células endoteliais a fim de produzir o factor de crescimento de células endoteliais.

- 25ª -

Processo de acordo com a reivindicação 24 caracterizado por incluir uma fase adicional de recuperação do referido factor de crescimento de células endoteliais.

- 72 -



- 26ª -

Processo de acordo com a reivindicação 25 caracterizado por o referido vector de expressão ser um bacteriófago.

- 27ª -

Processo de acordo com a reivindicação 25 caracterizado por o referido vector de expressão ser um plasmídeo.

- 28ª -

Processo para promover a proliferação de células endoteliais caracterizado por compreender a aplicação a tais células de uma quantidade mitogénica de factor de crescimento derivado de folículo stellato obtido de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 24.


- 29ª -

Processo de acordo com a reivindicação 28 caracterizado por as células crescerem numa cultura de células.

- 30ª -

Processo para promover a endotelialização vascular caracterizado por compreender a aplicação a superfícies vasculares de um hospedeiro que necessita de tal tratamento de uma quantidade de factor de crescimento derivado de folículo stellate obtido de acordo com qualquer

- 73 -



das reivindicações 1 a 24 suficiente para promover a endotelialização.

- 31ª -

Processo de acordo com a reivindicação 30 caracterizado por o factor de crescimento derivado de folliculo stellate ser aplicado no período pós-operatório a superfícies vasculares a seguir a angioplastia de balão.

- 32ª -

Processo de acordo com a reivindicação 30 caracterizado por o factor de crescimento derivado de folliculo stellate ser aplicado às superfícies de vasculatura e/ou a superfícies de enxertos vasculares durante ou antes da cirurgia de enxerto vascular.

- 33ª -

Processo de acordo com a reivindicação 30 caracterizado por o factor de crescimento derivado de folliculo stellate ser administrado a um hospedeiro a seguir a infarto do miocárdio.

- 34ª -

Processo para promover a cicatrização de feridas caracterizado por compreender a administração a uma ferida de uma quantidade de factor de crescimento derivado de folliculo stellate quando obtido de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 24 suficiente para promover angiogénese no local da ferida.

- 74 -



- 35ª -

Processo para a preparação de uma composição farmacêutica caracterizado por se incorporar como ingrediente activo factor de crescimento derivado de folículo stellate quando obtido de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6 em conjunto com uma substância veicular farmacêuticamente aceitável.

- 36ª -

Processo para a preparação de uma composição farmacêutica caracterizado por se incorporar como ingrediente activo factor de crescimento derivado de folículo stellate quando obtido de acordo com a reivindicação 13.

- 37ª -

Processo para a preparação de uma composição farmacêutica caracterizado por se incorporar como ingrediente activo factor de crescimento derivado de folículo stellate quando obtido de acordo com a reivindicação 7 em conjunto com uma substância veicular farmacêuticamente aceitável.

- 38ª -

Processo de acordo com a reivindicação 37 caracterizado por a referida composição ter como substância veicular uma substância veicular parenteral.

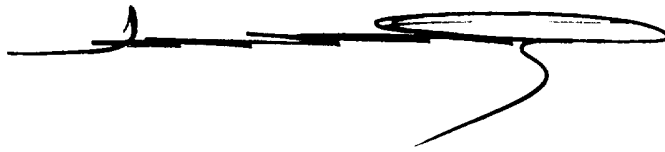
A requerente reivindica as prioridades dos pedidos norte-americanos apresentados em 24 de Março

- 75 -

de 1989, 2 de Maio de 1989 e em 1 de Junho de 1989, sob os números de série 328,181, 346,165 e 360,235, respectivamente.

Lisboa, 23 de Março de 1990

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FACTOR DE CRESCIMENTO DE
CELULAS ENDOTELIAIS E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE O
CONTEM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de factor de crescimento derivado de folículo stellate (FSdGF) substancialmente puro sob forma isolada que compreende as fases de:

- (a) proporcionar uma amostra biológica que contenha FSdGF;
- (b) extrair a porção solubilizada da amostra;
- (c) purificar parcialmente o FSdGF a partir do extracto usando uma fase de precipitação por um sal em meio aquoso;
- (d) fraccionar o extracto purificado usando cromatografia de afinidade por meio de fracções de heparina ligadas a um suporte insolúvel como fase estacionária e empregando uma fase móvel de gradiente num sal de concentração em sal crescente;
- (e) fraccionar o extracto usando cromatografia de exclusão em gel;
- (f) fraccionar a amostra usando cromatografia líquida; e
- (g) purificar o extracto usando cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa.