

Wifama

P.I. Nº. 85 730

MEMÓRIA DESCRITIVA DO INVENTO

para

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FACTOR DE ESTI-
MULAÇÃO DE MEGACARIÓCITOS"

que apresenta

MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY,

uma universidade privada, com sede

em 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massa-
chusetts 02139

Estados Unidos da América.

RESUMO

O factor de estimulação de megacariócitos (MSF em inglês ou FEM em português), purificado até à homogeneidade, é uma proteína acídica ($pI = 5,1$) com uma massa molecular ... 15 000 dalton que estimula a síntese de proteínas semelhantes a PF4 nas células promegacarioblásticas de rato cerca de 7 vezes e possui uma actividade semi-máxima a uma concentração igual a $0,8 \mu M$. O MSF não possui actividade biológica que corresponde a outros factores de crescimento hemopoiéticos conhecidos e parece ser específico para a linhagem de megacariócitos.

No processo de acordo com a presente invenção, o MSF é purificado até à homogeneidade (como apreciado por SDS-PAGE e focagem isoeléctrica na presença de ureia 9,2 molar) a partir de meio condicionado isento de soro obtido a partir de culturas de células de rim de embriões humanos (HEK em inglês ou REH em português) e até perto da homogeneidade a partir de plasma trombocitopénico. O MSF é isolado precipitando o MSF com sulfato de amónio a 80% de saturação, separando o material

Wifama

insolúvel que é diferente de MSF e aplicando a proteína solúvel a uma coluna contendo aglutinina de gérmen de trigo (WGA)-Sepharose, eluindo a proteína MSF com quitina-oligossacarídeos, aplicando o eluído concentrado contendo MSF a uma coluna de Biogel P200 e cromatografando as frações eluídas contendo MSF numa coluna de exclusão de tamanho de HPLC (cromatografia em fase líquida sob alta pressão) TSK-G3000.

ENQUADRAMENTO GERAL DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se geralmente ao campo hemológico especificamente à área das proteínas das plaquetas.

As plaquetas do sangue são o produto da diferenciação terminal de megacariócitos. Os megacariócitos crê-se serem originados a partir das células de origem pluripotencial primordialmente da medula dos ossos. A forma que se consegue reconhecer mais cedo é o megacarioblasto que possui um núcleo imaturo embebido em citoplasma basofílico com um número mínimo de grânulos. O processo de maturação complexo envolve a formação dum núcleo poliplóide, multilobulado e de grânulos citoplasmáticos distintivos, muito especializados. As plaquetas são desprendidas de megacariócitos maduros por um processo que é mal conhecido.

Muito embora se tenha conseguido fazer algum progresso na identificação da síntese de proteínas específicas de plaquetas e da estrutura subcelular no amadurecimento de megacariócitos, relativamente pouco se sabe sobre a regulação da megacariocitopoiese.

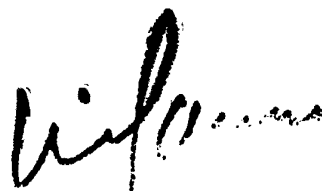
Wifama

Postulou-se que diversos factores humorais controlam a ploidização e a maturação citoplásmica de megacariócitos. Estas substâncias foram obtidas sob a forma bruta e são designadas trombopoietina (TPO) ou factor com actividade de estimulação trombopoietica (TSF), dependendo da fonte de que deriva a actividade. Os ensaios usados para quantificar a actividade biológica destes factores dependem de medições da incorporação de rádio-isótopos, especialmente de (^{75}SE)-selenio-metionina e de ($^{35}\text{SO}_4$, nas proteínas e glicosaminoglicanos de plaquetas recentemente formadas, que são todas sintetizadas pelos megacariócitos. Por consequência, estas medições provavelmente reflectem as taxas de maturação citoplásmica de megacariócitos incluindo o desenvolvimento das estruturas citoplásmicas especializadas integrais com a função das plaquetas.

Dados recentes indicam que um factor de estimulação de colónias de megacariócitos (Meg-CSF) provoca um tremendo aumento de replicações de DNA. A segunda fase, a maturação das células precursoras encarregues de originarem megacariócitos completamente diferenciados, pensa-se que é regulada por um ou por vários factores humorais cuja concentração no sangue é ligeiramente alterada por modificações do nível de plaquetas em circulação.

Este factor (ou factores) aumenta a taxa de transcrição de proteínas para inclusão em múltiplos grânulos secretórios. O citoplasma do megacariócito maduro contém múltiplos grânulos secretórios de plaquetas, incluindo alfa-grânulos, grânulos densos e lisosomas de plaquetas. De maneira particular, sabe-se que os alfa-grânulos contêm factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), beta-tromboglobulina, factor de plaquetas 4 (PF4) e o veículo de proteoglicano de sulfato de condroitina.

Alguns investigadores descreveram anteriormente maneiras de proceder para isolar uma ou mais substâncias trombo-



poieticamente activas parcialmente purificadas incluindo T. P. McDonald e col. em Exp. Hematol. 9, 288-296 (1981), J. Levin e col. em Blood, 54, 166a (abst.) (1979) e T. P. McDonald em Biochem. Med. 21, 146-155 (1979). Estas preparações parcialmente purificadas, aproximadamente 100 vezes purificadas, foram geralmente preparadas por precipitação com sulfato de amónio e cromatografia numa coluna de lectina. Muito embora se tenha verificado que têm um certo papel no estímulo da síntese de proteínas, não se isolou ainda nenhum factor sob a forma pura que permitisse fazer a sua caracterização e estudar a sua aplicação.

Constitui portanto um objectivo da presente invenção identificar e isolar um factor que regula a maturação de células progenitoras de megacariócitos com obtenção de megacariócitos completamente diferenciados, particularmente, um factor que aumenta a velocidade de síntese das proteínas.

É um outro objectivo da presente invenção proporcionar um método para isolar factor de estimulação de formação de megacariócitos muito puro.

É ainda um outro objectivo da presente invenção proporcionar métodos para ensaiar especificamente o factor de estimulação de megacariócitos.

É um outro objectivo da presente invenção proporcionar sequências de nucleótidos que codificam proteínas do factor de estimulação de megacariócitos.

Wifama 5

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a um factor de estimulação de megacariócitos (MSF) que foi purificado até à homogeneidade e ensaiado relativamente à sua capacidade para aumentar a velocidade de síntese de proteínas semelhantes ao factor de plaquetas 4 numa linha de células de promegacarioblastos de ratazana (RPM) e numa fracção enriquecida em megacariócitos derivada da medula de ossos da ratazana (Meg-D).

Nos exemplos descritos, purifica-se o MSF até à homogeneidade ($7,5 \times 10^5$ vezes) a partir de meio condicionado isento de soro obtido a partir de células de rim de embriões humanos (HEK) cultivadas ou até próximo da homogeneidade ($1,44 \times 10^7$) a partir de plasma trombocitopénico. No primeiro exemplo, isola-se o MSF preparando um lisato de células de HEK isento de soro, centrifugando e concentrando o lisato, precipitando o MSF com sulfato de amónio a 80 % de saturação, dialisando com tampão de tris fisiológico para eliminar a matéria insolúvel diferente de MSF, aplicando a proteína solúvel a uma coluna de WGA-Sepharose e eluindo a proteína de MSF com quitina oligossacáridos, preferivelmente trímeros de N-acetil-glucosamina, aplicando o eluído concentrado contendo a actividade de MSF a uma coluna com Biogel P200, eluindo e concentrando as fracções que contêm actividade de MSF usando um tampão com elevada força iónica, cromatografando aquelas fracções numa coluna de exclusão de tamanhos TSK-G3000 para HPLC e eluindo o MSF com um tampão de pequena força iónica. No segundo exemplo, usa-se uma maneira de proceder de purificação semelhante com a omissão da coluna de Biogel P200 para isolar o MSF do plasma trombocitopénico.

O MSF marcado com ^{125}I , preparado a partir de meio condicionado por células de HEK, é homogéneo como apreciado por SDS-PAGE e por concentração dos valores do ponto isoeléc-

Winfans⁶

trico na presença de ureia 9,2 molar. O MSF é uma proteína acídica ($p^I = 5,1$) com um valor de $M_r = 15\ 000$ que estimula a síntese de proteínas semelhantes a PF4 em células promegacarioblásticas de ratazana 7 vezes e possui uma actividade semi-máxima a uma concentração de 0,8 picomolar. Usando megacariócitos normais (Meg-D), demonstrou-se uma estimulação aproximadamente tripla da síntese de proteína por acção de MSF. O MSF não possui actividade biológica que corresponda a outros factores de crescimento hemopoiéticos e parece ser específico em relação à linhagem de megacariócitos.

As sequências de nucleótidos que codificam a proteína do factor que estimula a formação de megacariócitos são isolados por métodos conhecidos pelos peritos no assunto. No método preferido, isola-se RNA de células que produzem o factor estimulante de megacariócitos, sintetiza-se cDNA a partir do RNA, insere-se o cDNA num fago indutível que é depois empacotado e introduzido num hospedeiro apropriado tal como E. coli, o fago é induzido e as células são escolhidas relativamente à proteína de MSF e isola-se o DNA das células que produzem proteína de MSF e caracteriza-se. O gene e as sequências de cDNA que codificam total ou parcialmente o MSF são úteis na produção de MSF e de porções de MSF que podem ser usados como antígenos para a produção de anticorpos ou como alvos específicos de medicamentos. As sequências genéticas ou de nucleótidos podem também ser modificadas para produzir MSF com actividade incrementada ou alterada.

A proteína purificada tem um certo número de aplicações potenciais como, por exemplo, potenciar a função das plaquetas em pacientes com trombocitopenia ou arteriosclerose, na cura de feridas, em pacientes com anticorpos contra as plaquetas ou na preparação de medicamentos para reforçar, alterar ou diminuir a função das plaquetas.



DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA
INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um factor de estimulação de megacariócitos (MSF) purificado até homogeneidade aparente. No primeiro exemplo, o MSF é obtido a partir de células de rins de embriões humanos usando um esquema de purificação que envolve o fraccionamento com sulfato de amónio, cromatografia de afinidade em WGA-Sepharose, filtração através de gel de Biogel P200 e cromatografia em fase líquida sob alta pressão em TSK G3000. O MSF marcado com ^{125}I tem um valor de $M_r = 15\ 000$ determinado por SDS-PAGE mas migra como uma proteína de $M_r = 9\ 000$ no ensaio de cromatografia em fase líquida sob alta pressão de exclusão de tamanhos analíticos o que concorda com uma extensa glicosilação. É necessário marcar com ^{125}I o MSF purificado porque o factor não pode ser visualizado por manchamento com prata. A falta de manchamento com prata também se observou para outras glicoproteínas. O MSF, quando é examinado por focagem do ponto isoeléctrico na presença de ureia 9,2 molar, apresenta uma apertada banda a pH 5,1 (largura da banda menor do que 0,1 unidade de pH). O MSF purificado tem uma forte tendência para se auto-associar em condições não desnaturantes. Muito embora o MSF seja recuperado consistentemente como uma proteína de $M_r = 9\ 000$ em condições apropriadas por cromatografia em fase líquida sob alta pressão por filtração com gel, 16 % do MSF marcado com ^{125}I migra como um componente de elevado peso molecular quando recromatografado nas mesmas condições. In vitro, o MSF é activo em concentrações sub-picomolares estimulando a produção de proteínas semelhantes a PF-4 por uma linha de células promegacariocíticas de ratazana e a síntese de PF-4 autêntico ao fim de pouco tempo em culturas de megacariócitos de medula óssea de ratazana.

No segundo exemplo, utiliza-se um procedimento de

8
Wifama

purificação idêntico, sem a operação de tratamento com Biogel P200, para isolar preparações quase homogêneas de MSF de plasma trombocitopénico. O ^{125}I -MSF de plasma trombocitopénico no ensaio de SDS-PAGE e de cromatografia em fase líquida de alta pressão analítica em TSK G3000, comporta-se de maneira idêntica ao preparado a partir de células de HEK. No entanto, no produto derivado do plasma encontram-se presentes impurezas como é demonstrado por SDS-PAGE e pela actividade específica três vezes menor deste material quando se compara com o factor derivado de HEK. Isso provavelmente deve-se à omissão de operação de filtração através de gel de Biogel P200 que serve para eliminar os contaminantes de baixo peso molecular de MSF derivado de HEK. A operação de fraccionamento com Biogel P200 não foi usada durante a purificação do factor de estimulação de plasma visto que o conhecimento aproximado da actividade específica de MSF no plasma trombocitopénico, aproximadamente sessenta vezes menor do que nos sobrenadantes HEK isentos de soro, sugeria que as extremamente pequenas quantidades de proteína activa seriam difíceis de remover. A concentração de MSF no plasma trombocitopénico calcula-se que seja aproximadamente igual a 0,08 pM.

O MSF é específico para megacariócitos. As preparações que contêm MSF não possuem qualquer efeito de estimulação de colónias hemopoiéticas, nem actividade de CSF macrófago granulócito, nem actividade de promoção da ruptura, nem de Meg-CSF nem actividade de multi-CSF. O factor de estimulação não é activo no ensaio mitogénico das células 3T3 nem em ensaios que detectam a interleucina-1 e a interleucina-2. Os factores de estimulação hemopoiéticos que foram purificados até ao presente sabe-se que são funcionais a concentrações comparáveis com a gama indicada para este factor. Eles incluem Hemopoitina-1 (1,5 pM), GM-CSF (3 pM) e interleucina-3 (5-25 pM). As determinações das concentrações de MSF no soro normal demonstra que os níveis basais deste factor variam em cerca

Wifama 9

de 1,5 a 2 vezes. As concentrações de MSF no plasma parecem responder a alterações nos níveis de plaquetas em circulação. Os resultados sugerem que o MSF aumenta aproximadamente três a seis vezes nos animais agudamente trombocitopénicos.

Utilizam-se as mesmas operações iniciais para a purificação de TPO de plasma trombocitopénico como descrito por J. Levin e col. em Blood. 54, 166a (resumo), P. Cohen e col. em J. Clin. Invest. 44, 1036 (resumo) (1965) e R. E. Stanley em Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2764-2768 (1985) na purificação parcial de MSF de meio condicionado de células de HEK isentas de soro. No entanto, o MSF obtido como produto final é aproximadamente 1000 vezes mais puro do que as misturas isoladas por Levin e col., Cohen e col. e Stanley, devido à seleção das condições para a cromatografia em WGA-Sepharose (um gradiente linear de trómeros de N-acetilglucosamina) e às operações adicionais que usam uma coluna de Biogel P200 (tampão de elevada força iónica) e uma coluna de exclusão de tamanhos (tampão de baixa força iónica).

Purificou-se e caracterizou-se MSF proveniente de duas origens: meios condicionados isentos de soro obtidos a partir de células de rins de embriões humanos e plasma trombocitopénico obtido de coelhos da Nova Zelândia. Usaram-se os seguintes materiais e métodos.

Produtos químicos: Os produtos químicos para a eletroforese foram adquiridos à firma Bio-Rad Laboratories. O $\text{Na } ^{125}\text{I}$ foi adquirido à firma Amersham Radiochemicals Inc. A (^{14}C) -leucina foi comprada à firma New England Nuclear. O hidrolisado de lactalbumina foi obtido na firma Gibco. Todos os outros produtos químicos eram do grau reagente ou mais puros.

Proteínas e hidratos de carbono: A aglutinina de gérmen de trigo (WGA), ovomucóide, quitina, N-acetil-glucosamina, albumina de soro bovino, ovalbumina, anidrase carbónica,



aprotinina e outras enzimas foram adquiridas na firma Sigma Chemical Corp. A heparina de intestino de porco bruta (121,0 U/mg) foi obtida na firma Biosynth. O sulfato de condroitina-4 e o 6-N-sulfato de condroitina foram obtidos na firma ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio, Estados Unidos da América.

Linhas de células: As células RPM, como descritas por Cicoria e Hempling em J. Cell. Physiol., 105, 105-127 (1980) foram propagadas em Meio de Eagle modificado por Dulbecco complementado com 10 % de soro de feto de vitela. As células foram desenvolvidas a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5 % de CO₂. Em todos os meios de cultura estava presente penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 microgramas/ml). As células de HEK foram obtidas de M. A. Biologicals e cultivadas em larga escala pelo Centro de Cultura de Células do M.I.T., Cambridge, MA, Estados Unidos da América. As células foram semeadas a uma densidade de 6×10^3 células/cm em sessenta e três balões cilíndricos de 850 cm² e desenvolvidas até à confluência (5×10^7 células/balão) num meio M199 contendo 10 % de soro de fetos bovino. Depois de se ter atingido a confluência, as células foram mantidas em meio M199 isento de soro mas contendo 0,5 % de hidrolisado de lactalbumina, descrito por T. P. McDonald em J. Lab. Clin. Med. 85, 59-66 (1975). Os sobrenadantes foram retirados semanalmente para processamento e o meio de soro substituído ao fim dum intervalo de seis semanas. A contagem das células realizou-se com um contador de Coulter (Coulter Electronics).

Determinação de proteína: As concentrações de proteína foram determinadas usando o Estojo de Ensaio de Proteínas Bio-Rad (ligação de corante Azul de Coomassie) com a excepção do material purificado em que as determinações da concentração se fizeram pelo método de Lowry e col., J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951). Como padrão, utilizou-se albumina de soro bovino em ambos os casos.



Electroforese em gel de poliacrilamida: Realizou-se o ensaio com SDS-PAGE pelo processo de U. K. Laemmli, Nature (Londres) 227, 680 - 685. A electroforese com gel de focagem do ponto isoeléctrico na presença de ureia 9,2 molar realizou-se pelo método de P. H. O'Farrell, J. Biol. Chem. 250, 4007-4021 (1975).

Quantificação rádio-isotópica: A contagem das cintilações do líquido realizou-se com um Contador de Cintilações Beckmann LS 6800. Para a auto-radiografia, expôs-se película Kodak XAR-5 a -70°C e revelou-se de acordo com as instruções do fabricante. A densitotria realizou-se usando um Densitómetro de Laser LKB. A densidade óptica total da escala foi regulada para 1,0.

Matrizes cromatográficas: Sephadex G-25, Sephadex G-75, DEAE Sephadex A-25 e Sepharose foram adquiridas à firma Pharmacia Chemicals. Biogel P-200 foi adquirido à firma Bio-Rad. As colunas TSK-G3000 SW foram compradas a Toya Soda.

Preparou-se aglutinina de gérmen de trigo (WGA)-Sepharose pelo método de Mintz e Glaser, Anal. Biochem., 97, 423-427 (1979). A capacidade de ligação da coluna era igual a 1,1 mg de ovumucóide/ml de gel. Preparou-se heparina-Sepharose a partir de heparina precipitada com cloreto de cetilpiridínio e Sepharose-4B activada com brometo de cianogénio como foi descrito por R. D. Rosenberg e col. em J. Biol. Chem. 248, 6490-6505 (1973).

Radiomarcção da proteína: A radiomarcção da proteína com Na^{125}I realizou-se a 25°C com cloramina-T de acordo com o método de Greenwood e Hunter, Nature (London) 194, 495 (1962). A cromatografia realizou-se usando um caudal igual a 0,25 ml/minuto e colectaram-se fracções de 0,75 ml.

Indução de trombocitopenia imune e preparação plasma trombocitopénico: Obteve-se plasma trombocitopénico a partir



de coelhos brancos da Nova Zelândia (3 kg) que foram tornados agudamente trombocitopénicos (contagem de plaquetas inferiores a 5 % do normal) por injeção de 3 ml de antissoro de plaquetas anticoelho de cabra comprado à firma East Acres Biologicals (Southbridge, Mass., Estados Unidos da América) numa veia da orelha. A injeção de antissoro não provocou nenhum efeito significativo sobre as contagens de hematócitos nem de glóbulos brancos. As contagens dos glóbulos brancos e das plaquetas realizaram-se pelo processo de Brecher e de Cronkite em J. Appl. Physiol. 3, 365-377 (1950). Colheu-se o sangue 4 horas depois da injeção por punctura cardíaca (aproximadamente 70 ml/coelho). Neste momento, as contagens das plaquetas tinham descido de $500\ 000/\text{mm}^3$ para $20\ 000/\text{mm}^3$. As amostras foram obtidas com seringas que continham citrato de sódio a 3,8 % (9 partes de sangue : 1 parte de solução de citrato) e centrifugados a $3\ 000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C .

Medição da actividade de MSF

A actividade de MSF foi ensaiada como se descreve em seguida usando ou uma linha de células RPM ou medula óssea isentada da maior parte dos megacariócitos maduros por elutriação centrífuga em contracorrente e centrifugação com gradiente de densidade de Percool e selectivamente enriquecidas nos megacariócitos citoplasmicamente imaturos. A incorporação de (^{14}C)-leucina na proteína dos alfa-grânulos específica das plaquetas, factor de plaquetas 4, assim como a incorporação de ^{35}S -sulfato nos proteoglicanos das plaquetas sintetizados pelos megacariócitos em amadurecimento são controladas para servir como marcadores da maturação citoplasmática. A incorporação de ambos os radiomarcadores nos componentes das plaquetas sintetizadas por megacariócitos específicos é aumentada de três vezes de uma maneira que depende da dose pelo factor de estimulação de megacariócitos purificado (MSF) sem se



verificar um aumento cocomitante da síntese geral de proteína. O factor de plaquetas 4 de ratazana é especificamente isolado e caracterizado pela sua elevada afinidade em relação a heparina-Sepharose e pela sua identidade da sequência de amino terminal com o factor de plaquetas 4 humano e do coelho. Os proteoglicanos marcados com ^{35}S -sulfato são primariamente compostos por glicosaminoglicanos de 4-sulfato de condroitina e são identificados como componentes dos grânulos de plaquetas pela sua secreção pelos megacariócitos em resposta a trombina ou a A23187. A incorporação do marcador demonstra que o MSF purificado regula a síntese de componentes de grânulos de plaquetas por megacariócitos e sugere que este factor pode ser necessário para controlar a velocidade e/ou a extensão do desenvolvimento citoplasmático durante a maturação dos megacariócitos.

As células de promegacariócitos de ratazana (RPM) usadas no ensaio foram isoladas e clonadas a partir de medula óssea duma ratazana Long-Evans por Cicoria e Hempling na Universidade de South Caroline. Estudos prévios caracterizaram a célula RPM como um progenitor da linhagem de megacariócitos visto que contém diversos marcadores específicos das plaquetas tais como antigene relacionado com o factor VIII, fibrinogénio e acetilcalineesterase. Estes estudos demonstraram também que a célula RPM possui outras características do megacariócitos tais como a capacidade de adsorver (^3H)-setrotonina por um mecanismo que pode ser induzido por trombina e a sua capacidade para segregar substâncias mitogénicas potentes.

Os efeitos do MSF purificado sobre a síntese de componentes de alfa-grânulos de plaquetas in vitro foram também ensaiadas em megacariócitos de ratazanas isolados. A elutriação e a centrifugação com gradiente de densidade de Percoll foram usadas para se obter uma população de megacariócitos, Meg-D, que eram citoplasmaticamente não desenvolvidos como



foi evidenciado por microscopia luminosa e electrónica. A população de Meg-D possui inúmeras características de megacariócitos imaturos incluindo uma distribuição de relação volume do núcleo:volume do citoplasma relativamente, grande relativamente poucos grânulos de plaquetas e um sistema canalicular ligado superficialmente fracamente desenvolvido. No entanto, a análise da sua extensão de ploidização por citometria sob caudal demonstra que Meg-D tem a mesma distribuição ploídica que Meg-Lt, a população mais madura de megacariócitos isolada por elutriação e centrifugação de densidade de Percoll. Observou-se que a população de Meg-D amadureceu durante a cultura in vitro a curto prazo com a aparência de grânulos e o extenso sistema de membrana canalicular aberta ligada superficialmente assim como por uma diminuição substancial da distribuição de volume do núcleo:volume do citoplasma, indicando que a população tinha completado o processo de poliploidização mas ainda não gerou a maior parte do seu complemento final de componentes citoplasmáticos específicos das plaquetas.

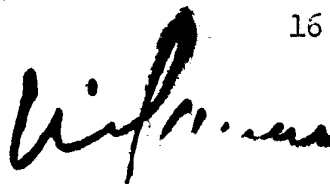
Ensaio de RPM relativamente à actividade
de MSF

Centrifugaram-se células de RPM, ressuspenderam em Meio Mínimo de Eagle isento de leucina contendo 10 % de soro de feto bovino e semearam-se em placas com 24 depressões com uma densidade de 3×10^5 por mililitro (1 ml/depressão). Realizaram-se duas a nove determinações incluindo o controlo. As depressões adicionaram-se quantidades variáveis das fracções de proteína a ser ensaiada, sendo o volume total adicionado inferior a 100 microlitros. Utiliza-se plasma normal identicamente fraccionado como controlo para o material precipitado com sulfato de amónio derivado do plasma trombocitopénico. Quando se ensaiam amostras mais purificadas, as fracções são diluídas com um veículo de proteína (0,6 mg de albumina de ovo/



/ml) antes de se misturar com as células a fim de se minimizar a adsorção não específica. Adiciona-se um volume igual de solução veicular às culturas de controlo. Subsequentemente, a cada depressão adicionam-se 20 microcuries de (^{14}C)-leucina (340 mCi/mole) e incuba-se as placas durante 24 horas. Transferem-se as células para tubos de polipropileno e centrifuga-se a $400 \times g$ durante 5 minutos a 25°C . Removem-se os sobrenadantes isentos de células e rejeitam-se. As células assim obtidas são de novo suspensas em 1 mililitro de P_i /salina. A fim de se determinar os números de células dentro de cada tubo, diluem-se 200 microlitros de células ressuspensas com 10 mililitros de P_i /salino e contam-se num Contador de Coulter. Aos 800 microlitros de células suspensas que ficam em cada tubo adicionam-se 200 microlitros de NaCl 1,0 molar e 50 microlitros de veículo semelhante a PF4 não marcado (0,2 mg/ml em NaCl 1,0 molar) (NaCl final = 0,4 molar). As suspensões de células são em seguida arrefecidas a 4°C , submetidas à acção de ultrassons durante 30 segundos com a potência de 30 watts e centrifugada a $10\,000 \times g$ durante 5 minutos a 4° para separar os fragmentos das células. Os lisados resultantes são aplicados a colunas com 1,0 mililitro de Sepharose-heparina equilibradas com tris-HCl 0,01 molar, NaCl 0,5 molar, de pH 8,6. Lavam-se as colunas com tampão de equilíbrio com um caudal de 6,0 ml/hora até as contagens radioactivas que são eluídas de cada coluna individual serem menores que 150 cpm/50 microlitros. As contagens radioactivas que ficam ligadas às colunas são eluídas com um único gradiente linear desde NaCl 0,5 molar até NaCl 2,0 molar em tris-HCl 0,01 molar, pH 8,6 (15 ml/reservatório/coluna) e colectam-se fracções de 1,25 mililitros.

Os perfis de eluição radioactiva do material que sai de cada coluna de Sepharose-heparina durante o gradiente de NaCl 0,5 molar até 2,0 molar demonstra a presença dum único pico radioactivo por cada coluna que é eluído a uma condu-



tividade que corresponde a $[NaCl] = 1,0$ molar. A proporção de estimulação é avaliada de duas maneiras: 1) pelo quociente entre as contagens radioactivas no pico de NaCl 1,0 molar das amostras de células que são incubadas com fracções de proteína derivadas de plasma trombocitopénica pelas contagens no pico 1,0 molar da amostra de controlo acima mencionada; e 2) pelo quociente das densidades ópticas de autorradiogramas das proteínas semelhantes a PF-4 depois de SDS-PAGE de amostras de células estimuladas e de controlo.

Em geral, o aumento observado por meio da densitometria é ligeiramente maior do que o observado por intermédio das contagens radioactivas possivelmente devido à ligação de proteínas radiomarcadas não semelhantes a PF4 nas colunas de Sepharose-heparina. O estímulo é aproximadamente igual a 3,1 vezes quando determinado pelo primeiro método e aproximadamente igual a 5,2 vezes quando determinado pela segunda técnica. A adição desta actividade estimulante às culturas de células RPM não tem absolutamente nenhum efeito sobre a velocidade de crescimento das células (tempo de duplicação = 24 horas). Ela também não altera a incorporação de radioactividade na proteína determinada pela medição das contagens precipitáveis com ácido tricloroacético.

O factor estimulante de megacariócitos (MSF purificada apresenta uma capacidade, dependendo da concentração, para aumentar a síntese de proteínas semelhantes a (PF4) quando apreciado pelo ensaio das células de promegacarioblastos de ratazana (RPM). O estímulo máximo varia entre 4 e 7 vezes dependendo do método de quantificação. Os resultados mostram que metade do estímulo máximo ocorre a uma concentração de 0,0125 ng/ml (0,8 pM); o estímulo máximo médio é igual a cerca de 3,9 vezes e a proporção máxima de estímulo mantém-se relativamente constante a concentração de MSF de até 0,625 ng/ml (41,7 pM). Além disso, esta substância retém a actividade



biológica completa durante um ano se fôr armazenada a -80°C .

Determinam-se as curvas de resposta à dose para os produtos obtidos em cada uma das fases dos processos de purificação. Uma diminuição acentuada na resposta estimulatória ocorre para as fracções menos purificadas quando as suas concentrações no ensaio são suficientemente altas, como é evidenciado pela curva de resposta à dose determinada para uma fracção de sulfato de amónio a 60 - 80 % preparada a partir de plasma trombocitopénico. Os valores para a parte ascendente das curvas de resposta adaptam-se bem a uma linha recta determinada com base na análise dos quadrados mínimos dos valores. Uma unidade de actividade biológica é portanto definida como quantidade de factor que origina um estímulo igual a metade do máximo da porção ascendente duma dada curva de resposta à dose.

Ensaio de megacariócitos isolados da ratazana relativamente à actividade de MSF

A capacidade de MSF para estimular a biossíntese de PF4 é examinada usando megacariócitos preparados a partir de ratazana derivadas de Sprague-Dawley (CD) (Charles River Breeding Laboratories, Inc., Wilmington, MA, Estados Unidos da América) com a idade de 2 1/2 a 5 meses. Medula do osso obtida a partir de 12 animais anestesiados com éter é suavemente retirada de cada tibia e fémur para dentro duma cápsula de Ptri esterilizada contendo tampão de HATCH (uma modificação do meio de CATCH (J. Cell. Biol., 69, 159 - 172 (1976)), solução salina equilibrada de Hank isenta de cálcio e magnésio contendo adenosina 1 mM, tiofilina 20 mM e citrato de sódio a 0,38 % e mais HEPES 10 mM, dextrose a 0,1 %, albumina de soro de boi a 0,5 % e 0,15 % de unidades de apirase/ml. A medula é extraída com uma agulha do tamanho 18 por diversas vezes, fil-



trada através de redes de malhas de nylon com 155 micron (Spectramesch, Spectrum Medical In., Los Angeles, CA, Estados Unidos da América) e diluída com tampão de HATCH de maneira a obterem $2 \text{ a } 5 \times 10^5$ células/ml para introduzir na câmara de separação de Sanderson dum sistema de elutriação de Beckman (Beckmen Instruments, Inc., Palo Alto, CA, Estados Unidos da América). Antes de ser utilizado, o sistema é esterilizado com uma solução de etanol a 70 %, lavado com água destilada esterilizada e preparado com tampão de HATCH. Depois de $2 \text{ a } 5 \times 10^8$ células de medula terem sido carregadas para o sistema usando um caudal de tampão igual a 12 a 15 ml/minuto à temperatura de 18°C e, a uma velocidade de rotor de 1400 rotações por minuto, lava-se com 80 a 100 mililitros com um caudal de 20 a 25 mililitros/minuto. As células arrastadas para fora da câmara de elutriação com caudais de 12 a 15 ml/minuto e 20 a 25 ml/minuto são designadas como fracções 1 e 2, respectivamente. Neste momento, inverte-se o caudal de passagem do tampão para remover a população de células enriquecidas em megacariócitos da câmara de separação através da tubagem de entrada. As operações de carregamento e de contralavagem são repetidas até todas as células de medula terem sido elutriadas. As suspensões de células enriquecidas em megacariócitos são reunidas e colectadas em tubos de centrifugação de plástico esterilizados conservados em gelo.

As suspensões de células enriquecidas em megacariócitos reunidas são centrifugadas a $400 \times g$ durante 10 minutos a 4°C e ressuspensas numa solução de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, Estados Unidos da América), diluídas com meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) até uma massa volúmica final igual a $1,050 \text{ g/cm}^3$. Prepara-se um gradiente descontínuo com três fases aquosas: 10 mililitros de tampão de HATCH, 15 mililitros de suspensão de células em Percoll com $1,050 \text{ g/cm}^3$ e 15 mililitros de Percoll com $1,085 \text{ g/cm}^3$ em tampão de HATCH. Os gradientes são centrifuga-



dos a 18°C durante 20 minutos a 400 x g e as células são colectadas em três fracções. A população de células enriquecidas em megacariócitos mais leve (Meg-It) é colectada da interface entre a fase de Percoll com 1,050 g/cm³ e a fase de tampão que a recobre (massa volúmica menor que 1,050 g/cm³). A população de megacariócitos mais densa (Meg-D) consiste na camada de células que se forma na interface entre as duas fases de Percoll, assim como as células existentes na camada de Percoll com 1,050 g/cm³ sobrejacente. A fracção da pelele consiste em células existentes na camada de Percoll com 1,085 g/cm³ e inferior. Cada população de células é diluída quatro vezes e lavada uma vez por centrifugação (400 x g, 8 minutos, 4°C) com tampão de HATCH e uma vez com DMEM para remover a solução de Percoll. As células são contadas numa câmara dum hemocítometro ou usando um contador Coulter (Coulter Electronics).

Os diâmetros das células são determinados com um micrómetro óptico calibrado e calcula-se a massa citoplásmica dos megacariócitos como uma proporção da massa total de células da cultura. Podem-se reconhecer morfologicamente com certeza como megacariócitos as células com o diâmetro igual ou maior que 12,5 micron e a sua identidade ser confirmada relativamente à sua actividade por manchamento com acetilcolinesterase durante 6 horas de acordo com o método de Karnovsky e Roots, J. Histochem, Cytochem., 12, 219 - 221 (1964) modificado por Jackson, Blood 42, 413 - 421 (1973). A quantificação da actividade de acetilcolinesterase de megacariócitos realiza-se de acordo com o método de Ellman e col. Biochem. Pharmac. 7, 88 - 95 (1961), modificado por Burstein e col. J. Cell Physiol. 122, 159 - 165 (1985). Analisam-se suspensões enriquecidas com megacariócitos cultivados ou recentemente isolados relativamente ao grau de ploidia por citometria bidimensional de passagem como descrito por Jackson, Blood, 63, 768 - 778 (1984).



Os megacariócitos isolados são suspensos em Meio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM) contendo 10 % (volume/volume) de soro de cavalo (Grand Island Biological Co., Grand Island, NY, Estados Unidos da América ou em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco suplementado com HEPES 10 mM. As suspensões de megacariócitos são cultivadas em placas com 24 depressões (Costar, Cambridge, MA, Estados Unidos da América) em 1,5 ml de meio de cultura com 5 % de CO₂ a 37°C durante períodos de até 3 dias.

Para marcar radioativamente as proteínas de megacariócitos, incubam-se as células durante as últimas 24 horas de cultura na presença de 40 microCi/ml de (¹⁴C)-leucina (New England Nuclear, Boston, MA, Estados Unidos da América contendo 10 % de soro de cavalo, MSF e mais 10 % de meio condicionado por cultura de megacariócitos antes do período de marcação radioativa. A fim de marcar radioativamente proteoglicanos de megacariócitos, adiciona-se à cultura ³⁵SO₄ isento de veículo em DMEM ou IMDM isentos de sulfato contendo soro de cavalo, MSF e meio condicionado.

Depois da cultura, adiciona-se EDTA dez milimolar, 100 unidades de aprotinina por ml e 10 microgramas de inibidor de tripsina de soja por ml, centrifugam-se as células de megacariócitos isoladas a 400 × g durante 10 minutos e ressuspendem-se em 100 microlitros de tampão de HATCH. Adiciona-se proteína veicular (50 microgramas) preparada a partir de PF4 de plaquetas de ratazanas não marcadas radioativamente, submetendo as células a lise em NaCl 1,5 molar (por adição de um volume igual de NaCl 3 molar), submete-se à ação de ultrassons e centrifuga-se a 10 000 × g durante 3 minutos para remover os fragmentos celulares. Precipitam-se alíquotas com ácido tricloroacético, neutraliza-se com NaOH 1 normal e contam-se as cintilações num Contador de Cintilações Beckman LS 6800 usando fluido de cintilações Ultrafluor (National Diagnos-



tics, Somerville, NJ, Estados Unidos da América). As restantes suspensões de células lisadas com um elevado teor de sal são diluídas até NaCl 0,15 molar e purificadas por cromatografia de afinidade com Sepharose-heparina. A quantificação de PF4 marcado radioactivamente na coluna de Sepharose-heparina é então utilizada para determinar a taxa de síntese de PF4 em função de MSF em culturas de megacariócitos a curto prazo.

Os estudos estruturais mostram que o PF4 de ratazana é bastante homólogo do PF4 humano e de coelho, respectivamente. A maior espécie molecular de PF4 de megacariócitos marcado radioactivamente isolada por cromatografia com Sepharose-heparina possui características de tamanho e carga idênticas a PF4 de ratazana como se pode apreciar por electroforese bidimensional e possui epítomos inumoquímicos semelhantes a PF4 de ratazana como julgado por análise de mancha de imunidade e precipitação com anticorpos dirigidos contra a última proteína de grânulos alfa. A molécula de PF4 de plaquetas de ratazana predominante tem um M_r aproximadamente igual a 9670 por análise de aminoácidos e com SDS-PAGE. No entanto, encontra-se frequentemente presente uma forma de peso molecular igual a 19 000 dalton em quantidades variáveis e provavelmente representa um dímero não dissociável da espécie de menor peso molecular.

Prepara-se antissoro para PF4 para uso em análise imunoquímica a partir de coelhos inicialmente inoculados com uma mistura 1:1 de 50 a 100 microgramas de PF4 de ratazana ou em adjuvante de Freund completo (Grand Island Biological Company, Grand Island, NY, Estados Unidos da América) e subsequentemente em adjuvante de Freund incompleta em intervalos semanais. Retira-se sangue dos coelhos na veia da orelha periodicamente para se controlar o nível de anticorpos produzidos. Quando se usa antissoro não fraccionado na análise por imunomancha de lisados de plaquetas integrais, são aparecem duas

bandas com os mesmos pesos moleculares que o PF4 da ratazana purificado. Ambas as espécies do Pf4 de ratazana purificado são reconhecidas por anticorpos preparados contra qualquer das espécies de pesos moleculares e fraccionados por afinidade em Sepharose 2B com conjugado de Pf4.

A comparação dos autorradiogramas e dos cromatogramas manchados por imunidade do material segregado por activação da trombina com os do material que fica na pele de células revela a presença de proteínas de maior peso molecular na pele que podem ser formas precursoras ainda não empacotadas para a secreção no grânulo alfa do megacariócito. Estão também presentes proteínas não-imunorreactivas em pequenas quantidades e são indubitavelmente devidas a contaminantes em quantidade menores. Os níveis de PF4 de ratazana produzidos por megacariócitos são determinados isolando componentes marcados com ^{14}C destas células poliplóides por cromatografia em heparina-Sepharose e quantificando as quantidades de componentes radiomarcados presentes dentro das regiões apropriadas dos autorradiogramas SDS-PAGE por varrimentos densitométricos.

O MSF estimula a síntese de PF4 de ratazana por megacariócitos poliplóides cultivados de uma maneira que depende da dose sem alternar a extensão da síntese geral de proteína nem a viabilidade das células dentro das culturas. O efeito estimulante máximo sobre a síntese de PF4 é igual a cerca do triplo em resposta a 0,625 ng/ml de MSF.

O PF4 humano é empacotado em grânulos alfa de plaquetas com um veículo de proteoglicano sulfato de condroitina num complexo estequiométrico que consiste em 8 moles de PF4 e 2 moles de proteoglicano. Os megacariócitos de ratazana absorvem ^{35}S -sulfato rapidamente tanto em condições in vivo como in vitro e incorporam-se nos componentes da membrana e de grânulos alfa. O sulfato de condroitina foi identificado como sendo o glicosaminoglicano sulfatado mais importante presente nas



plaquetas de ratazana. O MSF estimula a protecção do veículo de sulfato de condroitina assim como de PF4 de ratazana. Cultivaram-se Meg-D e Meg-Lt na presença de $^{35}\text{SO}_4$; as células e os meios de cultura foram extensivamente proteolizados e utilizou-se a cromatografia com DEAE-Sephadex para se isolar os glicosaminoglicanos. O produto final é predominantemente 4-sulfato de condroitina. Uma proporção tão elevada como 70 % do 4-sulfato de condroitina radioactivamente marcado é especificamente libertado dos megacariócitos cultivados pelos agonistas das plaquetas, o que indica que os glicosaminoglicanos se encontram presentes dentro dos grânulos. Estes ensaios, repetidos na presença de várias concentrações de MSF revelam que a síntese de 4-sulfato de condroitina é estimulada pelo factor acima referido de uma maneira que depende da dose sendo uma quantidade tão pequena como 0,625 ng/ml de MSF suficiente para aumentar a produção do glicosaminoglicano para cerca do triplo.

Com base nestes resultados, o MSF é capaz ou de intensificar a síntese de maiores números de cadeias de 4-sulfato de condroitina por núcleo de protoglicano ou, mais provavelmente, aumentar a produção de maior números de proteoglicanos de 4-sulfato de condroitina dentro dos grânulos alfa de megacariócitos de ratazana em amadurecimento.

O MSF purificado foi também ensaiado num sistema de coágulo de plasma concebido para medir as actividades do factor de estimulação de colónias (CSF). Actividade de blastos-unidade de formação-CSF, de granulócito-macrófago-CSF ou megacariócito-CSF não são detectadas quando se adiciona 0,025 ng/ml do factor de estimulação ao sistema de ensaio. Além disso, o MSF não é activo no ensaio mitogénico 3T3 e o gama-interferão puro não é potente no ensaio de MSF.

Purificação de proteína MSF a partir de sobrena-



dantes de células de rins de embriões humanos (HEK)

Todas as operações do modo operatório de purificação se realizam a 4°C, a não ser que se especifique outra temperatura. Concentram-se os sobrenadantes (15 litros/semana, 0,5 mg/ml) 300 vezes usando um sistema de ultrafiltração com cassete Pellicon (Millipore), precipita-se com sulfato de amônio a 80 % da saturação, centrifuga-se a 15 000 × g durante 20 minutos e armazena-se a -70°C. Depois de uma acumulação durante seis semanas, as pletes são ressuspensas em 120 mililitros dum tampão contendo tris-HCl 0,05 molar, NaCl 0,15 molar, pH 7,4 (tampão A) e fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 milimolar e dialisa-se contra 3 mudanças de 4 litros de tampão A. Depois da diálise, separa-se a matéria insolúvel que corresponde a 90 % da proteína inicial por centrifugação a 5000 × g durante 10 minutos a 4°C.

Divide-se em alíquotas o material obtido a partir da operação de tratamento com sulfato de amônio (5 696 mg, 400 mililitros). Aplica-se cada alíquota a colunas contendo 25 ml de WGA-Sepharose equilibradas com tampão A. As colunas, operadas a um caudal igual a 10 mililitros/minuto, são lavadas com o tampão de equilíbrio até que A_{280} seja menor que 0,02 e depois eluídas com quitina-oligosacáridos preferivelmente trímeros de N-acetilglucosamina, a uma concentração igual a 12 milimolar (concentração da extremidade redutora, número médio de unidades de sacárido/extremidade redutora = 2,5) em tampão A. A proteína activa eluída na operação de eluição com WGA-Sepharose (25,3 mg, 0,3 mg/ml) é concentrada sob pressão reduzida usando uma membrana de ultrafiltração YM5 (Amicon).

O volume final, aproximadamente 8 ml, é dividido em alíquotas de 2,0 mililitros, cada uma das quais é aplicada a uma coluna contendo Biogel P200 (120 cm × 1,4 cm de diâme-

tro, 185 mililitros) equilibrada com tampão A, um tampão com uma força iónica relativamente grande. A cromatografia realiza-se a um caudal igual a 6 mililitros/hora e colectam-se fracções de 4 mililitros. Reunem-se as fracções apropriadas e concentram-se em sacos de diálise que são postos em contacto com Sephadex G-75 seco. O concentrado da operação com P200 (5,0 ml, 0,7 mg/ml) é dialisado contra tampão A e cromatografado numa coluna de exclusão (7,5 mm x 60 mm) TSK-G3000 por cromatografia em fase líquida sob alta pressão (HPLC). Realizam-se injeções múltiplas de 300 ml. As colunas são equilibradas com tris-HCl 5 milimolar, pH 7,2, um tampão com pequena força iónica, com um caudal de 1,0 ml/minuto.

Na Tabela 1, encontram-se indicados os valores obtidos num ensaio de purificação de MSF usando precipitação com sulfato de amónio, cromatografia de afinidade com WGA-Sepharose, filtração através de gel Biogel P200 e cromatografia com filtração através de gel HPLC em TSK G3000. Os resultados apresentados representam a média de três fraccionamentos diferentes

TABELA 1
Purificação de MSF de células de HEK

<u>Operação</u>	<u>Quantidade de proteína (mg)</u>	<u>Actividade total (unidades)</u>	<u>Actividade específica (unidades/mg)</u>	<u>% de recupera- ção total</u>	<u>Factor de purificação total</u>
Sobrena- tante de HEK	50 000,00	$1,0 \times 10^6$	20	--	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de precipitado	5 696,00	$1,7 \times 10^6$	300	100	15
WGA-Sepharose	25,30	$10,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	60	$2,0 \times 10^3$
Biogel P200	5,00	$9,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	56	$8,0 \times 10^3$
TSK-G3000 SW	0,23	$3,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	209	$7,5 \times 10^5$

Wilfama



Resumindo, a precipitação com sulfato de amónio e a subsequente diálise proporciona uma purificação de 8,2 vezes. A operação com WGA-Sepharose proporciona uma purificação de 70 vezes com a recuperação de 60 % da actividade aplicada. 90 % da actividade estimulante é eluída da coluna contendo Biogel P200 no rebordo de saída do volume vazio. Esta operação proporciona uma purificação de 4 vezes e uma recuperação de 88 % da actividade aplicada. Mais significativamente, a filtração com Biogel P200 elimina os contaminantes de pequeno peso molecular que seriam difíceis de separar do produto final durante a subsequente cromatografia em TSK G3000. A maior parte da actividade recuperável (maior que 90 %) é eluída como um pico nítido de proteína com um peso molecular $M_r = 9\ 000$ e uma actividade específica = $1,4 \times 10^7$ unidades/mg numa coluna TSK G300 SW. Com base na actividade específica do produto final, o factor de purificação total conseguido usando esta maneira de proceder é igual a $7,5 \times 10^5$.

Purificação de Plasma Trombocitopénico

Prepara-se plasma trombocitopénico (300 ml) a partir de coelhos que tinham sido previamente tornados agudamente trombocitopénicos mediante injeção de antissoro anti-plaquetas, como se descreveu acima. A actividade específica deste material de partida é igual a 0,33 unidade/mg. A combinação de fraccionamento com sulfato de amónio, cromatografia em WGA-Sepharose e cromatografia com filtração em gel TSK permite que o MSF seja purificado cerca de $1,44 \times 10^7$ vezes a partir de plasma trombocitopénico com uma recuperação global da actividade aplicada igual a cerca de 45 %. Detecta-se mais que 90 % da actividade biológica na região do perfil A_{270} da coluna TSK-3000 correspondendo a proteína com $M_r = 9\ 000$. Recupera-se aproximadamente 0,4 micrograma de proteína com uma actividade específica igual a $4,8 \times 10^6$ unidade/mg. Esta actividade espe-



cífica é 3 vezes menor do que a obtida em sobrenadantes de células de HEK.

Na presente invenção preparações fisicamente homogêneas de factor de estimulação de megacariócitos (MSF) isoladas a partir do meio de produção de células de rins embrionicos humanos ou a partir de soro trombopoietico mostram que concentrações picomolares de MSF são capazes de estimular a síntese de factor de plaquetas 4 e do veículo de sulfato de condroitina que se encontram nos grânulos alfa de plaquetas e de megacariócitos. Com base nesse facto, hipotetizou-se que o MSF é envolvido de maneira crítica na regulação da capacidade funcional de plaquetas em circulação pelo seu efeito sobre a síntese de componentes de grânulos específicos de plaquetas na medula dos ossos. Segue-se que o factor purificado tem múltiplas aplicações na prática incluindo o tratamento de pacientes trombocitopénicos, pacientes com saramento diminuído de feridas e no desenvolvimento de drogas e anticorpos para uso na regulação da actividade MSF in vivo.

As sequências de nucleótidos quer de DNA quer de cDNA que codificam o MSF podem ser isolados por métodos conhecidos pelos técnicos no assunto. O gene é mais difícil de isolar do que muitos outros porque é isento de metionina e a região N-terminal é bloqueada.

O método preferido usado para isolar o gene ou outras sequências de nucleótidos que codificam MSF é o seguinte. Prepara-se RNA total a partir de 5×10^7 células de HEK que estão a produzir MSF como se determina pelos ensaios previamente descritos por extracção com guanidina-HCl. Extrai-se então RNA poliadenilado por dois ciclos de cromatografia em oligo(dT)-celulose. Sintetizam-se cDNAs de primeira fibra com transcriptase inversa usando oligo(dT) como primário e gera-se cDNA de segunda fibra com polimerase e ribonuclease H de DNA de E. coli de acordo com o método de Okayama e Berg, Mol. Cell

Wifama

Biol. 2, 161 - 170 (1982), modificado por Gubler e Hoffman, Gene 25, 263-269 (1983) com a diferença de se empregar Actinomicina D na mistura reaccional final a uma concentração de 50 mg/ml. Para produzir extremidades cegas utiliza-se polimerase de DNA de T₄. Os cCDNAs reparados são acoplados a ligantes EcoRI sintéticos depois da protecção dos sítios internos com EcoRI-metilase. Os CDNAs ligados aos ligantes são digeridos com EcoRI e separados de ligantes livres usando cromatografia com Sepharose CL 4B. Este material é então ligado ao vector de expressão 1 GT11 do fago tratado com fosfatase alcalina digerido com EcoRI, empacotado in vitro e placado na estirpe hospedeira E. coli Y1088 (Gene 25, 263 - 269, (1983); DNA Cloning techniques: A practical approach, eds. D. Glover (IRL Press Oxford, 1984); Science 222, 778 - 782 (1983)).

Para detectar clones de bactérias que possuem proteína de fusão de MSF pode-se utilizar heteroanticorpo IgG MSF anti-ratazana de coelho. Para esta finalidade, podem-se separar clones recombinantes como placas de fago na estirpe hospedeira E. coli Y1090 de acordo com a técnica de Young e Davis, Science, 222, 778 - 782 (1983). As placas candidatas podem então ser submetidas a várias séries de operações de separação imunoquímicas e de purificação da placa. As proteínas de fusão podem ainda ser caracterizadas preparando lisogenes de 1GT-MSF e 1GT11 não recombinante na estirpe hospedeira de E. coli Y1089, como descrito por Young e Davies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194 - 1198 (1983). O fago é induzido alterando a temperatura para 45°C para inactivar o repressor e a produção de b-galactosidase ou de proteína de fusão iniciada com IPTG a uma concentração final igual a 5 mM. Os lisados de células são precipitados a 4°C com 33 % (em volume/volume) de sulfato de amónio saturado e depois examinados por SDS-PAGE assim como com análise de mancha de Western, utilizando heteroanticorpo IgG MSF anti-ratazana fraccionado por afinidade

Wifama³⁰

seguida por IgG anti-coelho marcada com ouro como descrito nas instruções do fabricante.

O DNA isolado do fago recombinante pode ser submetido a digestão com EcoRI para se obter fragmentos de inserto, subclonados em M13mp8 e sequenciado pelo método de terminação da cadeia de didesoxi de Biggin e col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2963 - 3965 (1983). Caso isso seja necessário, os insertos podem ser usados para resseparar a livreria de cDNA pela técnica de Benton e Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1194 - 1198 (1983) a fim de se obter clones com comprimento completo.

A confirmação da estrutura de MSF é conseguida clivando a proteína com enzimas proteolíticas como por exemplo tripsina, separando os polipéptidos resultantes por HPLC em fase inversa e determinando a sequência de aminoácidos dos componentes por sequenciamento em fase gasosa. No caso improvável de as amostras de heteroanticorpos não serem capazes de identificar clones com insertos de MSF, os dados da sequência de aminoácidos obtidos com MSF são empregados para planejar oligonucleótidos apropriados de tal maneira que estas amostras podem ser utilizadas para obter os recombinantes iniciais com insertos de MSF. A tentativa para isolar clones de comprimento completo é depois idêntica ao método acima esboçado.

Estas sequências de nucleótidos podem ser usados para produzir MSF em organismos geneticamente planeados. O gene pode também ser modificado para produzir MSF com actividade alterada.

Muito embora a presente invenção tenha sido descrita com referência às suas formas de realização preferidas, outras variações e modificações são óbvias para os peritos no assunto. Pretende-se incluir todas essas variações e modificações dentro do âmbito das reivindicações anexas.



REIVINDICAÇÕES

1ª. - Processo para a preparação dum factor de estimulação de megacariócitos purificado, mediante isolamento, caracterizado pelo facto de compreender as seguintes operações:

- a) a preparação duma solução isenta de células compreendendo proteínas de promegacariócitos e de megacariócitos incluindo um facto de estimulação de megacariócitos;
- b) a precipitação do referido factor a partir da mencionada solução com sulfato de amónio a uma concentração superior a 50 % da saturação;
- c) a aplicação da proteína solúvel resultante da citada precipitação com sulfato de amónio a uma coluna de lectina-Spharose;
- d) a eluição do referido factor da mencionada coluna de lectina-Sepharese com uma solução compreendendo quitina-oligossacáridos;
- e) a aplicação das fracções eluídas da coluna de lectina-Sepharese contendo o citado factor a uma coluna cromatográfica de exclusão do tamanho; e
- f) a recolha das fracções eluídas contendo o referido factor.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a mencionada solução ser plasma trombocitopénico.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender ainda a cromatografia das fracções contendo o citado factor proveniente da coluna de exclusão de tamanho numa coluna de exclusão do tamanho de

Winfan

32

cromatografia em fase líquida sob alta pressão (HPLC).

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a referida solução ser constituída por meio de cultura de células de rins de embriões humanos.

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se adicionar sulfato de amónio à mencionada solução até 80 % da saturação.

6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o enchimento de lectina-Sepharose da citada coluna ser aglutinina de gérmen de trigo-Sepharose.

7ª. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de se eluir o referido factor com uma solução que compreende trímeros de N-acetil-glucosamina.

8ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a mencionada coluna de exclusão de tamanho possuir capacidade de exclusão de 200 000 dalton.

9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se eluir o citado factor a uma elevada força iónica.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a referida coluna de exclusão de tamanho de cromatografia em fase líquida de alta pressão ser uma coluna TSK-G3000.

11ª. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo facto de se eluir o citado factor a uma pequena força iónica.



12ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se obter um factor de estimulação de megacariócitos purificado tendo um peso molecular igual a 15 000 dalton de acordo com SDS-PAGE e um ponto isodéctrico igual a 5,1 que estimula a síntese de proteínas em células da linhagem de megacariócitos.

13ª. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o referido factor apresentar a actividade semimáxima a uma concentração da ordem de grandeza de 0,8 pM.

14ª. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o mencionado factor compreender hidrato de carbono.

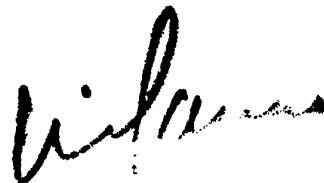
15ª. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de se purificar o citado factor a partir de meio condicionado isento de soro de células de rins de embriões humanos cultivadas.

16ª. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de se isolar o referido factor a partir de plasma trombocitopénico.

17ª. - Processo para a obtenção de factor de estimulação de megacariócitos purificado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em

a) obter-se uma solução compreendendo proteínas de promegariócitos e megacariócitos, incluindo o factor de estimulação de megacariócitos;

b) precipitar-se o referido factor na mencionada solução de



proteínas com sulfato de amónio a uma concentração maior do que 50 % da saturação;

c) aplicar-se a proteína solúvel depois da citada precipitação com sulfato de amónio a uma coluna de cromatografia contendo lectina-Sepharose;

d) eluir-se o referido factor com uma solução contendo quiti-na-oligossacáridos;

e) aplicar-se o eluente concentrado proveniente da mencionada coluna de cromatografia contendo lectina-Sepharose e que contém o referido factor a uma coluna de cromatografia de exclusão dos tamanhos;

f) cromatografar-se o mencionado eluente aplicado e

g) colectar-se as fracções que contêm o citado factor.

18ª. - Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo facto de, ao isolar-se o referido factor, se separar ainda por cromatografia as mencionadas fracções que contêm o citado factor provenientes da coluna de exclusão do tamanho numa coluna de exclusão de tamanho de HPLC (cromatografia em fase líquida sob alta pressão).

19ª. - Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo facto de se eluir o referido factor de uma coluna de aglutinina de gérmen de trigo-Sepharose com uma solução que compreende trómeros de N-acetil-glucosamina.

20ª. - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de a coluna de exclusão do tamanho possuir uma propriedade de exclusão de peso molecular na gama de 200 000 dalton.

21ª. - Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de se eluir o mencionado factor com



um tampão de grande força iónica.

22ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a coluna de exclusão de tamanho de cromatografia em fase líquida sob alta pressão (HPLC) ser uma coluna de exclusão de tamanho de TSK G 3000.

24ª. - Processo para a obtenção duma sequência de nucleótidos que codifica um factor de estimulação de megacariócitos, caracterizado pelo facto de originar uma proteína com um peso molecular de 15 000 dalton no ensaio de SDS-PAGE, um ponto isoeléctrico de 5,1 e estimular a síntese de proteínas em células promegacarioblásticas.

25ª. - Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de se obter a referida sequência derivada dum gene que tem a extremidade N bloqueada e é isenta de metionina.

26ª. - Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de

se isolar RNA de células que produzem factor de estimulação de megacariócitos;

se sintetizar cDNA a partir do mencionado RNA;

se ligar o citado cDNA a um vector de expressão do fago;

se embalar e introduzir o referido vector numa célula hospedeira apropriada;

se ensaiar e escolher as mencionadas células hospedeiras relativamente à produção de proteínas do factor de estimulação de megacariócitos; e

se isolar e sequenciar DNA a partir das citadas células que produzem proteína do factor que estimula megacariócitos.

27ª. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de a referida sequência ser identificada por amostras de oligonucleótidos que codificam partes da sequência de aminoácidos do factor de estimulação de megacariócitos.

28ª. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de se ensaiar e escolher as mencionadas células hospedeiras contendo DNA que codifica factor de estimulação de megacariócitos relativamente a anticorpos de factor que estimula antimegacariócitos.

29ª. - Método para o ensaio da actividade de factor de estimulação de megacariócitos, caracterizado pelo facto de compreender

cultivar-se células de megacariócitos;

adicionar-se a solução a ser ensaiada;

adicionar-se aminoácidos marcado com radio-isótopos a cada amostra de células;

incubar-se durante aproximadamente 24 horas;

lavar-se as células incubadas;

efectuar-se a lise da suspensão das células a 4°C;

aplicar-se o lisado a uma coluna de heparina-Sepharose equilibrada com tampão de tris-NaCl a aproximadamente pH 8,6;

lavar-se a coluna para remover o material radioactivo não ligado;

eluir-se o material radioactivo ligado com um gradiente linear de cloreto de sódio de aproximadamente 0,5 M de NaCl a 2,0 M de NaCl em tampão de tris a pH aproximadamente igual a 8,6;

medir-se a radioactividade eluída; e

determinar-se a quantidade de aminoácido marcado radioactiva-



mente incorporado.

30ª. - Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo facto de as células de megacariócitos serem preparadas por centrifugação das células de megacariócitos; ressuspensão das células em meio isento do aminoácido marcado com radio-isótopos contendo 10 % de soro de fetos bovinos; e sementeira das células em cavidade de placas de ensaio a uma densidade de aproximadamente 3×10^5 células por mililitro antes de se adicionar a solução a ser ensaiada.

31ª. - Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo facto de compreender comparar-se a incorporação de aminoácido marcado com radio-isótopos no caso da solução a ser ensaiada com a incorporação do aminoácido marcado com radioisótopos no caso duma solução de controlo.

32ª. - Método para o ensaio de factor de estimulação de megacariócitos, caracterizado pelo facto de compreender isolar-se e lavar-se células de medula dos ossos; elutriar-se as células da medula dos ossos isoladas e lavadas; separar-se as células por densidade usando a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll; cultivar-se as células na presença da proteína a ser ensaiada e de aminoácido marcado com radio-isótopos durante aproximadamente 24 horas; adicionar proteínas semelhantes ao factor 4 de plaquetas não marcado com radio-isótopos; proceder à lise das células e à remoção dos resíduos celulares; e precipitar as proteínas no lisado com ácido tricloroacético; e proceder à contagem da radioactividade precipitada.



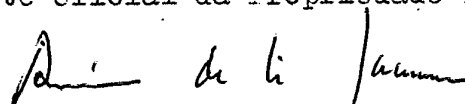
33ª. - Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo facto de as citadas células terem um peso volúmico maior do que aproximadamente $1,050 \text{ g/cm}^3$.

34ª. - Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo facto de compreender ainda a adição de $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ à cultura de células que contêm aminoácido marcado com radio-isótopos para marcar proteoglicanos de megacariócitos.

35ª. - Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo facto de compreender ainda a purificação das proteínas no lisado por cromatografia de afinidade com heparina-Sepharose.

Lisboa, 16 de Setembro de 1987

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



AMÉRICO DA SILVA CARVALHO
Agente Oficial da Propriedade Industrial
Rua Castilho, 201, 3.º-E.
1000 LISBOA