

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 98 935**

**REQUERENTE:** THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, norte-americana, com sede em 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, Califórnia 92037, Estados Unidos da América

**EPÍGRAFE:** "Processo de preparação de análogos de polipéptidos de local activo de interleucina-8, de anticorpo de, detecção da presença de IL-8 e de composições terapêuticas"

**INVENTORES:** Ingrid U. Schraufstatter e Charles G. Cochrane

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

EUA em 12 de Setembro de 1990 sob o nº 07/581673; e em 6 de Setembro de 1991 sob o nº 07/755824

"Processo de preparação de análogos de polipéptidos de local activo de interleucina-8, anticorpos, de detecção da presença de IL-8 e de composições terapêuticas"

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de análogos de polipéptido do local activo de interleucina-8 (IL-8) e de anticorpos para o local activo, que compreende a adição sequencial de resíduos de aminoácido à cadeia peptídica em crescimento, estando o terminal amino ou o terminal carboxilo protegido com um grupo protector selectivamente removível, adequado, até se ter preparado o análogo polipeptídico desejado.

O invento refere-se ainda ao processo para a detecção da presença de IL-8 num fluido corporal, o qual compreende:

(a) misturar uma alíquota de fluido corporal com uma composição de anticorpo que imunorreage com um segmento do terminal carboxi de IL-8 ou com um anticorpo que imunorreage com um segmento do terminal amino de IL-8,

(b) manter a referida mistura de imunorreacção sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção;

e

(c) detectar a presença do referido produto de imunorreacção e assim a presença de IL-8.

O invento refere-se ainda ao processo de preparação de composições terapêuticas dos análogos de polipéptido preparados.

MEMÓRIA DESCRITIVACampo Técnico

O presente invento refere-se a citocinas e ao seu papel em reacções inflamatórias. Mais especificamente, o presente invento refere-se ao processo de preparação de um análogo de polipéptido do local activo de IL-8 de anticorpos para o local activo e a métodos adequados para inibir inflamação por neutralização do local de interacção de receptor de IL-8.

Arte Anterior

As células imuno-competentes e o endotélio vascular interatuam produzindo hemostase bem como reacções inflamatórias e imunitárias. Os mediadores destas interacções bidireccionais intrincadas entre os leucócitos e as células vasculares são as citocinas que são produzidas e actuam nas células endoteliais (Immunol. Today, 10:370-375 (1989)). As citocinas exercem a sua influência nas células endoteliais fazendo com que estas libertem quimioattractores que induzem a quimiotaxia e a extravasão de células polimorfonucleares e de monócitos. [Broudy et al., J. Immunol., 139:464-468 (1987); Sieff et al., Blood, 72:1316-1323 (1988)]. Este recrutamento e activação de leucócitos quebra gravemente a arquitectura das paredes dos vasos e dos tecidos subjacentes, provocando a lesão.

Pertencendo a uma família crescente de citocinas de péptido monomérico induzidas por lipopolissacáridos (LPS), pelo factor de necrose de tumor (TNF) ou por outras citocinas, a IL-8 é um mediador putativo de lesões de tecidos no choque séptico, a síndrome da dificuldade respiratória aguda (ARDS) e, geralmente, durante doenças ou condições inflamatórias associadas com a produção aumentada de TNF. A IL-8 tem sido detectada, recentemente, em fluido de lavagem broncoalveolar de pacientes com ARDS prematuro.

A nomenclatura para o novo grupo de citocinas compreendendo IL-8 não foi estabelecida. A IL-8 intacta parece ser idêntica ao factor quimiotático de neutrófilo derivado de monócito (MDNCF)

[Matsushima et al., J. Exp. Med., 167:1883-1893 (1988)], ao factor activador de neutrófilo (NAF) [Lindley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:9199-9203 (1988); PCT N<sup>o</sup> WO 89/04836] e ao factor quimiotático de neutrófilo (NCF) (PCT N<sup>o</sup> WO 89/10962).

O bloqueamento da quimiotaxia e da activação de neutrófilos durante uma doença inflamatória é um objectivo terapêutico principal. É necessária a intervenção terapêutica em vários pontos da cascata inflamatória para evitar a lesão dos tecidos. A indução da produção de IL-1 e de TNF ocorre em 30 minutos após a exposição, por exemplo, a LPS. Os anticorpos contra o local activo de interacção de receptor do TNF, são intervenientes eficazes em vários modelos animais, por exemplo, num modelo de porco para o choque séptico. Contudo, para serem eficazes, os anticorpos anti-TNF têm de ser administrados muito cedo no decurso da doença.

Deste modo, o que é necessário é um anticorpo bloqueador dirigido contra uma proteína inflamatória de actuação tardia. Isto permitiria a intervenção ao nível secundário da resposta, subsequente à produção de TNF, resultando num quadro alargado para diagnóstico e preparação para o tratamento. Adicionalmente, uma abordagem terapêutica em tandem, utilizando anticorpos anti-IL-8 conjuntamente com anticorpos anti-TNF, aumentaria a eficácia nos casos em que as pequenas quantidades de TNF, que se escapam à ligação anti-TNF, seriam secundariamente neutralizadas.

#### Breve Sumário do Invento

Verificou-se agora que o local activo de interacção de receptor da IL-8 nativa humana, intacta, se localiza num segmento de 18 resíduos de aminoácido no terminal carboxilo da proteína madura de 72 resíduos de aminoácido.

Um aspecto contemplado no presente invento é um análogo de polipéptido do local de interacção de receptor de IL-8, possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-  
Val-Glu-Lys-Phe-Leu-Lys, designado por p 50-67.

O presente invento contempla também um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondentes à fórmula:

(3-20), designado por p 3-20.

Outro aspecto do presente invento é um anticorpo que imuno-reage (a) com o local de interacção de receptor de IL-8 e (b) com um análogo de polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula para o p 50-67.

Uma concretização preferida do presente invento é um anticorpo monoclonal que imuno-reage com o local de interacção de receptor de IL-8 e como análogo de polipéptido, anteriormente descrito, designado por p 50-67.

Um aspecto relacionado do presente invento é um anticorpo que imuno-reage (a) com IL-8 e (b) com um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

(3-20), designado por p 3-20.

Uma concretização preferida deste aspecto é um anticorpo monoclonal que imuno-reage com IL-8 e com o polipéptido p 3-20.

Um processo, para detectar a presença de IL-8 em fluidos corporais, é outro aspecto contemplado pelo presente invento. Este processo compreende a mistura de uma alíquota de fluido corporal com uma composição de anticorpo compreendendo uma molécula de anticorpo que imuno-reage com um segmento do terminal carboxilo de IL-8 possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

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

O contacto do fluido corporal com a composição de anticorpo é mantido durante um tempo suficiente para que se forme um produto de imuno-reacção. O produto de imuno-reacção formado, contendo IL-8, é depois detectado.

Um aspecto relacionado contempla um processo para detectar a presença de IL-8 em fluidos corporais compreendendo a mistura de uma alíquota de fluido corporal com uma composição de anticorpos compreendendo moléculas de anticorpo que imuno-reagem com um segmento do terminal amino de IL-8 possuindo uma sequência de resíduos aminoácido correspondente à fórmula:

(3-20).

O contacto do fluido corporal com a composição de anticorpos é mantido como anteriormente e o produto de imuno-reacção formado, contendo IL-8, é depois detectado.

O presente invento contempla ainda um sistema de diagnóstico na forma de um conjunto de diagnóstico. O sistema compreende uma embalagem contendo, numa quantidade suficiente para realizar pelo menos um ensaio, uma composição de anticorpos contendo uma população de moléculas de anticorpos que imuno-reage com um determinante antigénico numa molécula de IL-8. Esta composição de anticorpos pode estar numa solução líquida ou pode estar ligada a uma matriz de fase sólida. O sistema contém também um marcador para indicar a presença de moléculas de anticorpos no produto de imuno-reacção formado.

Numa concretização preferida, a composição de anticorpos contém um anticorpo monoclonal.

No presente invento é também contemplada uma composição terapêutica que é adequada para evitar inflamações. Uma tal composição compreende um anticorpo que imuno-reage (a) com o local de interacção de receptor da IL-8 e (b) com um análogo de polipeptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondentes à fórmula:

Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-  
Val-Glu-Lys-Phe-Leu-Lys,

ou com seus equivalentes biológicos num excipiente farmacêuticamente aceitável.

Uma composição terapêutica relacionada contemplada pelo pre-

sente invento compreende um anticorpo que imuno-reage (a) com IL-8 e (b) com um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

(3-20),

ou com os seus equivalentes biológicos, num excipiente farmacêuticamente aceitável.

Adicionalmente, é contemplado um método para evitar inflamações num paciente. Este método compreende a administração ao indivíduo de uma composição contendo um anticorpo que imuno-reage com IL-8 e com os polipéptidos anteriormente descritos designados por p 50-67 ou por p 3-20, ou com seus equivalentes biológicos, num excipiente farmacêuticamente aceitável.

O presente invento tem certas vantagens, nomeadamente, a) a intervenção a um nível secundário na cascata inflamatória é agora possível, permitindo um tempo adicional para diagnóstico e preparação para tratamento e b) uma intervenção mais completa e eficaz é possível combinando o método anteriormente conhecido, utilizando anticorpos anti-TNF, e o método do presente invento para neutralizar secundariamente as moléculas de TNF que escapam à ligação de anticorpos anti-TNF.

Ainda outras concretizações e vantagens do invento tornar-se-ão evidentes para os peritos na arte após a leitura de todas as revelações aqui contidas.

#### Breve Descrição dos Desenhos

Nos desenhos que constituem parte do presente invento:

A Figura 1 ilustra os efeitos da IL-8 ou dos polipéptidos sintéticos, correspondentes à sequência de resíduos de aminoácido 50-67 e 57-72 da IL-8, na activação de neutrófilos tal como são medidos por mobilização de cálcio. A razão F, que é igual ao valor do cálcio intracelular, é representada no eixo dos Y em função do tempo, em segundo após o tratamento com IL-8 ou com péptido representado no eixo dos X. A IL-8 e o polipéptido sintético 50-67, também designado por Pep-1, induzem a mobilização de cálcio em neutrófilos, enquanto que o polipéptido

sintético 57-72, também designado por Pep-2, não o faz. A mobilização de cálcio, induzida pelo tratamento de neutrófilos com Pep-1, é inibida por anticorpos policlonais anti-Pep-1.

A Figura 2 ilustra a curva de ligação não saturável de concentrações crescentes de IL-8 iodada a neutrófilos. A ligação específica é calculada na presença de um excesso molar de 100 vezes de IL-8 não marcada e é subtraída à ligação total para calcular a ligação específica representada por quadrados a cheio. Cada ponto é a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM) de três experiências independentes. A ligação de IL-8 é inibida por anticorpos dirigidos contra o polipéptido sintético 50-67, Pep-1, (ilustrado pelos triângulos a cheio) relacionado com a IL-8. Os fragmentos FAB do anticorpo anti-Pep-1 são mais eficazes do que os anticorpos intactos na inibição da ligação de IL-8 aos neutrófilos (ilustrados pelos quadrados a branco).

A Figura 3 é um gráfico de barras que ilustra os efeitos de composições de anticorpos, anti-IL-8, anti-Pep-1 (anti-50-67) e anti-Pep-3 (anti-3-20), imuno-específicos para as regiões de polipéptidos definidas da IL-8, na ligação de IL-8 iodada ( $^{125}\text{I}$ -IL-8) a neutrófilos (PMN), tal como se descreve no Exemplo 5A (2). O anticorpo anti-11-29, serviu como um controlo na experiência uma vez que não consegue evitar a inibição da ligação de  $^{125}\text{I}$ -IL-8 a PMN, quando comparado com a inibição observada com os anticorpos específicos de IL-8.

#### Descrição Detalhada

##### A. Definição de Termos

Aminoácido: todos os resíduos de aminoácido aqui identificados estão na configuração natural L. Mantendo a nomenclatura padrão dos polipéptidos, J. Biol. Chem., 243:3557-59, (1969), as abreviaturas para os resíduos de aminoácido são as que se mostram na Tabela de Correspondência seguinte:

## TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

Símbolo		Aminoácido
<u>1 letra</u>	<u>3 letras</u>	
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	L-leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	ácido L-glutâmico
W	Trp	L-triptofano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	ácido L-aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

Será de notar que todas as sequências de resíduos de aminoácido são aqui representadas por fórmulas cuja orientação da esquerda para a direita está no sentido convencional, do terminal amino para o terminal carboxilo. Adicionalmente, será de notar que um traço no princípio ou no fim de uma sequência de resíduos de aminoácido indica uma ligação a um radical tal como H e OH (hidrogênio e hidroxilo), no terminal amino e carboxilo, respectivamente, ou uma sequência adicional de um ou mais resíduos de aminoácido, até um total de cerca de cinquenta resíduos na cadeia de polipéptido.

Polipéptido e Péptido: Polipéptido e péptido são termos aqui

usados intermutavelmente para uma sequência de massa molecular relativamente baixa, i.e., de cerca de 210 dalton a cerca de 10 kD, e designam uma série linear de não mais do que cerca de 50 resíduos de aminoácido ligados uns aos outros por ligações peptídicas entre os grupos alfa-amino e carboxilo de resíduos adjacentes.

Proteína: Proteína é um termo aqui usado para designar uma série linear de mais do que 50 resíduos de aminoácido ligados uns aos outros tal como num polipéptido.

Farmacologicamente aceitável refere-se a entidades moleculares e a composições que não produzem uma reacção alérgica ou indesejável similar, tal como perturbações gástricas, tonturas e similares, quando administradas a um humano.

#### B. Análogo de Polipéptido

No presente invento é contemplado um polipéptido relacionado com a IL-8 que mimetiza certas funções do local activo de interacção com receptor da molécula de IL-8 nativa, possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

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

O polipéptido mimetiza as funções da IL-8 promovendo a mobilização do cálcio em neutrófilos polimorfonucleares, induzindo a libertação de elastase, e, quando injectado em coelhos, promovendo a quimiotaxia de neutrófilos para uma concentração de  $10^{-11}$  M. ao contrário da IL-8, o polipéptido não promove a polimerização de F-actina que resulta sob a ocupação do receptor de IL-8.

O polipéptido do presente invento contém cerca de 18 resíduos de aminoácido. São contemplados polipéptidos adicionais, com um comprimento menor do que 18 resíduos de aminoácido, de modo a definir mais exactamente o local activo preciso. É agora conhecido, por exemplo, que um análogo de polipéptido contendo os resíduos de aminoácido 57 a 72 da IL-8 nativa é inactivo. Assim, uma porção do local activo tem de residir ou ser dirigida

conformacionalmente pelos resíduos de aminoácido que se encontram nos primeiros sete resíduos do local activo como presentemente se definiram.

Uma sequência polipeptídica do presente invento pode diferir da sequência natural pelo facto da sequência estar modificada por uma acilação do terminal  $\text{NH}_2$ , p.e., acetilação ou amidação com ácido tioglicólico, por amidação do terminal carboxilo, p.e., com amoníaco, metilamina e similares.

#### 1. Síntese de Polipéptido

Um polipéptido do presente invento pode ser sintetizado por qualquer das técnicas que são conhecidas dos peritos na arte dos polipéptidos, incluindo técnicas de ADN recombinantes. Preferem-se as técnicas de química sintética tais como síntese de fase sólida de tipo Merrifield, por razões de pureza, especificidade antigénica, isenção de produtos laterais indesejados, facilidade de produção e outras. Um excelente sumário das muitas técnicas disponíveis pode ser encontrado em J.M. Steward e J.D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; M. Bodanszky, et al., "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, segunda edição, 1976 e J. Meienhofer, "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983 para a síntese de péptidos em fase sólida e E. Schroder e K. Kubke, "The Peptides", Vol. 1, Academic Press (New York), 1965 para a síntese clássica em solução, cada uma das quais é aqui incorporada como referência. Grupos protectores apropriados, utilizáveis nestas sínteses, são descritos nos textos anteriores e em J.F.W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, New York, 1973, que é aqui incorporada como referência.

De um modo geral, estes processos compreendem a adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos a uma cadeia de péptido crescente. Normalmente, quer o grupo amino, quer o grupo carboxilo do primeiro resíduo de aminoácido estão protegidos por um grupo protector adequado, removível selectivamente. Um grupo

protector diferente, removível selectivamente, é utilizado para aminoácidos contendo um grupo lateral reactivo tal como a lisina.

Usando uma síntese em fase sólida como exemplo, o aminoácido protegido ou derivado é ligado a um suporte sólido inerte através do seu grupo carboxilo ou amino não protegido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é depois removido selectivamente e o aminoácido seguinte na sequência, possuindo o grupo complementar (amino ou carboxilo) adequadamente protegido é misturado e feito reagir sob condições adequadas para formação da ligação amida com o resíduo já ligado ao suporte sólido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é depois removido deste resíduo de aminoácido acabado de adicionar e o aminoácido seguinte (adequadamente protegido) é depois adicionado e assim sucessivamente. Após todos os aminoácidos desejados terem sido ligados na sequência adequada, quaisquer grupos protectores terminais ou grupos laterais restantes (e o suporte sólido) são removidos, sequencialmente ou concurrentemente, para se obter o polipéptido final.

## 2. Ensaio de Actividade

Os análogos de polipéptido sintetizados quimicamente tem de possuir o carácter activo da região de interacção de receptor da IL-8. Para assegurar que essa actividade está presente realizam-se os testes seguintes.

1) Mobilização de  $Ca^{2+}$  em neutrófilos marcados com indo-1-AM,

2) Libertação de elastase em neutrófilos usando um método fluorescente anteriormente descrito [J. Biol. Chem., 260:11461 (1985)],

3) Medição da modificação da forma de neutrófilos pela diminuição do desvio do ângulo direito da luz (realizado em paralelo com a determinação de  $Ca^{2+}$ ),

4) Capacidade quimiotática medida por injeção na pele de coelho e microscopia óptica de uma biópsia 4 horas mais tarde.

## 3. Polipéptidos

Também contemplado pelo presente invento é um polipéptido

possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

(3-20), designado por p 3-20.

O polipéptido p 3-20 é útil para induzir anticorpos do presente invento que imuno-reagem com IL-8, tal como aqui depois se descreve.

### C. Anticorpos

O termo "anticorpo" refere-se a uma molécula de receptor, produzido por células B, que imuno-reage com, e se liga a um ligando de antigénio para formar um imuno-reagente. É um membro de uma família de proteínas glicosiladas, designadas por imunoglobulinas, que se podem combinar especificamente com um antigénio.

O termo "anticorpo", nas suas várias formas gramaticais, é também aqui usado para designar porções imunologicamente activas de moléculas de imunoglobulina, i.e., moléculas que contêm um local de combinação de anticorpo ou paratopo.

Exemplos de moléculas de anticorpo incluem moléculas de imunoglobulina intactas, moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas e aquelas porções de uma molécula de imunoglobulina que contêm o paratopo, incluindo as porções conhecidas na arte como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e F(v).

As porções Fab e F(ab')<sub>2</sub> de anticorpos são preparadas pela reacção proteolítica de papaína e de pepsina, respectivamente, com anticorpos substancialmente intactas, por processos que são bem conhecidos. Ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. nº 4342566 de Theofilopolous e Dixon. As porções de anticorpo Fab' são também bem conhecidas e são produzidas a partir das porções F(ab')<sub>2</sub> seguindo-se a redução das ligações dissulfureto que ligam as duas porções de cadeia pesada, tal como um mercaptoetanol e seguindo-se a alquilação do mercaptano de proteína resultante com um reagente tal como iodoacetamida. Prefere-se um anticorpo contendo moléculas de anticorpo intactas e são utilizadas como aqui se ilustra.

A frase "anticorpo monoclonal" (MoAb) designa um anticorpo produzido por clones de uma única célula, designada por hibridoma, que segrega apenas um tipo de molécula de anticorpo. A célula de hibridoma é formada por fusão de uma célula produtora de anticorpos e de uma linha de células de mieloma ou outra linha de células auto-perpetuante. Estes anticorpos foram descritos em primeiro lugar por Kohler e Milstein, Nature, 256:495-497 (1975), cuja descrição é incorporada como referência.

Anticorpos "policlonais" (Pab) são anticorpos produzidos por clones obtidos a partir de células diferentes que segregam anticorpos diferentes que se ligam a uma pluralidade de epítopos da molécula imunogénica.


1. Imunogénio de Polipéptido

O termo "imunogénio", tal como é aqui usado, descreve uma entidade que induz a produção de anticorpos no animal hospedeiro. Em alguns casos, o antigénio e o imunogénio são a mesma entidade, enquanto que, noutros casos, as duas entidades são diferentes.

A palavra "inóculo", nas suas várias formas gramaticais, é aqui usada para descrever uma composição contendo um polipéptido do presente invento, preferivelmente, Pep-1 ou Pep-3, como se mostram na Tabela 1, como ingrediente activo usado para a preparação de anticorpos contra IL-8. Quando se usa um polipéptido para induzir anticorpos, está pressuposto que o polipéptido pode ser usado sozinho, ligado a um transportador ou na forma de um multímero, mas para facilidade de expressão, estas alternativas não serão aqui sempre referidas expressamente.

Para um polipéptido que contém menos do que cerca de 35 resíduos de aminoácido, é preferível usar o péptido ligado a um transportador com o propósito de induzir a produção de anticorpos.

Quando acoplado a um transportador para formar o que é conhecido na arte como um conjugado transportador-hapteno, um polipéptido do presente invento é capaz de induzir anticorpos que



imuno-reagem com e neutralizam a IL-8. São bem conhecidos na arte transportadores úteis e são, geralmente, as próprias proteínas. Exemplos destes transportadores incluem a hemocianina de lapa *Fissurella* (KLH), a edestina, a tiroglobulina, albuminas tais como a albumina de soro de bovino (BSA) ou a albumina de soro de humano (HSA), glóbulos vermelhos tais como os eritrocitos de carneiro (SRBC), a toxóide do tétano, a toxóide da cólera, bem como poliaminoácidos, tais como o poli(D-lisina:ácido D-glutâmico), e similares.

Como é também bem conhecido na arte é muitas vezes benéfico ligar um polipéptido sintético ao seu transportador usando um grupo intermediário de ligação. Tal como anteriormente se referia, o glutaraldeído é um destes grupos de ligação. Contudo, quando se usa cisteína, o grupo intermediário de ligação é, preferivelmente, uma m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBS).

Adicionalmente, pode-se adicionar a MBS, em primeiro lugar, a um transportador por uma reacção de permuta éster-amida, como descrito por Liu et al., supra. Depois, a adição pode ser seguida pela adição de um grupo mercapto bloqueado, tal como o ácido tiolacético ( $\text{CH}_3\text{COSH}$ ), à ligação dupla maleimido. Após a clivagem do grupo acilo bloqueante, forma-se uma ligação dissulfureto entre o grupo mercaptano de ligação, não bloqueado, e o mercaptano do resíduo cisteína adicionado, do polipéptido sintético.

Outros meios de imuno-potenciação incluem o uso de lipossomas e de partículas de complexo imuno-estimulante (ISCOM). A versatilidade única dos lipossomas reside no facto de se poder ajustar a sua dimensão, nas suas características de superfície, na composição de lípido e nas várias formas como podem acomodar antígenos. Nas partículas de ISCOM a matriz do tipo gaiola é composta por Quil A, extraído da casca de uma árvore da América do Sul. Uma forte resposta imunitária é evocada por proteínas ou péptidos antigénicos ligados, por uma interacção hidrofóbica, à superfície da matriz.

A escolha do transportador está mais dependente do uso final do imunogénio do que da porção determinante do imunogénio, e é baseada em critérios não particularmente envolvidos no presente invento. Por exemplo, se um inóculo é para ser usado em animais, deverá ser seleccionado um transportador que não gere uma reacção adversa no animalicular.

Numa concretização preferida do presente invento, o inóculo compreende o polipéptido anteriormente descrito acoplado a KLH via MBS.

## 2. Anticorpos Policlonais

Para induzir anticorpos neutralizadores de IL-8, administra-se uma quantidade imunogénica de um inóculo do presente invento, contendo, preferivelmente, o péptido Pep-1 ou Pep-3 como imunogénio activo, tipicamente, por injeção subcutânea ou intramuscular, a um mamífero tal como um ratinho, coelho, cabra, cavalo, humano e outros. Numa concretização preferida do presente invento, a administração foi realizada por injeções subcutâneas, em locais múltiplos, em coelhos nos dias 1, 14 e 21.

O mamífero administrado (inoculado) é depois mantido durante um período de tempo suficiente para que o polipéptido, presente como ingrediente activo no inóculo, induza a formação de anticorpos neutralizadores, anti-IL-8. Se desejado, os anticorpos formados podem depois ser colhidos, usando técnicas bem conhecidas, e usadas em preparações para a imunização passiva (administração terapêutica de anticorpos neutralizantes) contra o local activo da IL-8, ou em ensaios ou em sistemas de diagnóstico para detectar IL-8 em amostras corporais.

O anticorpo anti-péptido assim produzido é oligoclonal em relação à IL-8 e, deste modo, possui uma especificidade de epí-topo restrita em relação a antissoros policlonais anti-IL-8.

Preferivelmente, um anticorpo policlonal do presente invento está numa forma imuno-purificada. As composições de anticorpos policlonais imuno-purificados são produzidas por imuno-reacção

(adsorção) de um antissoro policlonal sobre uma fase sólida contendo o imunogénio de polipéptido usado para induzir os antissoros policlonais, removendo, por lavagem da fase sólida, os anticorpos não imuno-reactivos ou fracamente imuno-reactivos, e eluindo, subsequentemente, e recolhendo os anticorpos imuno-reagidos especificamente para formar o anticorpo imuno-purificado. A imuno-purificação é um processo, de um modo geral, bem conhecido na arte e pode ser realizado sob várias condições concebidas para produzir uma composição de anticorpos policlonais possuindo uma afinidade líquida mais elevada pelo imunogénio da fase sólida imuno-purificante, do que a afinidade dos antissoros policlonais de partida. No Exemplo 3D descreve-se um exemplo de imuno-purificação.

### 3. Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos adequados na forma monoclonal tipicamente anticorpos inteiros, podem ser preparados usando a tecnologia de hibridoma descrita por Nimam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953 (1983), cuja descrição é aqui incorporada como referência. Resumidamente, para formar o hibridoma a partir do qual a composição de anticorpos monoclonais é produzida, funde-se uma linha de células de mieloma ou outra linha de células auto-perpetuante, com linfocitos obtidos a partir do baço de um mamífero hiper-imunizado com um polipéptido do presente invento.

Prefere-se que a linha de células de mieloma seja da mesma espécie que os linfocitos. Tipicamente, um ratinho da estirpe 129 GLX<sup>+</sup> é o mamífero preferido. Mielomas de ratinho adequados para uso no presente invento incluem as linhas de células, sensíveis à hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), P3X63-Ag8.653 e Sp2/0-Ag14 que estão disponíveis na American Type Culture Collection, Rockville, MD, com as designações CRL 1580 e CRL 1581, respectivamente.

Tipicamente, os esplenócitos são fundidos com células de mieloma usando polietilenoglicol (PEG) 1500. Os híbridos fundidos são seleccionados pela sua sensibilidade a HAT. Os hibridomas segregando as moléculas de anticorpo do presente invento são iden-



tificados usando um doseamento radio-imunológico de fase sólida (RIA) descrito no Exemplo 4.

Uma composição de anticorpos monoclonais do presente invento pode ser produzida iniciando uma cultura de hibridoma monoclonal compreendendo um meio nutriente contendo um hibridoma que segrega moléculas de anticorpo com a especificidade de polipéptido apropriada. A cultura é mantida sob condições e durante um período de tempo suficientes para que o hibridoma segregue as moléculas de anticorpo para o meio. O meio contendo anticorpo é depois recolhido. As moléculas de anticorpo podem depois ser isoladas por técnicas bem conhecidas.

Os meios úteis para a preparação destas composições são ambos bem conhecidos na arte e estão disponíveis comercialmente, e incluem meios de cultura sintéticos, ratinhos consanguíneos e outros. Um exemplo de um meio sintético é o meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco et al., Virology 8:396 (1959)) suplementado com 4,5 g/l de glucose, 20 mg/l de glutamina e 20% de soro de vitela fetal. Um exemplo de uma estirpe de ratinho consanguíneo é a Balb/c.

As composições de anticorpos monoclonais produzidas pelo processo anterior podem ser usadas, por exemplo, em modalidades de diagnóstico e terapêuticas nas quais a formação de um produto de imuno-reacção contendo IL-8 é desejada.

#### D. Processos de Diagnóstico

O presente invento contempla qualquer processo que resulte na detecção, num fluido corporal tal como o plasma sanguíneo ou o soro, de um local de interacção de receptor de IL-8 e, deste modo, da IL-8, ou da IL-8, usando uma composição de anticorpos do presente invento.

O processo para a detecção de IL-8 por estes meios compreende a formação de um produto de imuno-reacção entre um segmento do terminal carboxilo da IL-8 no fluido vascular colhido e uma molécula de anticorpo anti-local activo da IL-8, tal como

aqui se descreveu, e a detecção subsequente do produto de imuno-reacção assim formado.

Alternativamente, o processo para a detecção de IL-8 compreende a formação de um produto de imuno-reacção entre um segmento do terminal amino da IL-8, nomeadamente, a região definida p 3-20, no fluido vascular colhido e uma molécula de anticorpo anti-IL-8, tal como aqui se descreveu, e a detecção subsequente do produto de imuno-reacção assim formado.

Os peritos na arte compreenderão que existem numerosos procedimentos de química de diagnóstico clínico bem conhecidos, que podem ser utilizados para formar imuno-complexos detectáveis. Deste modo, embora se descrevam aqui exemplos de processos de ensaio, o presente invento não está a eles limitado.

Um processo contemplado para detectar a presença de IL-8 num fluido corporal, compreende os passos de:

a) mistura de uma alíquota de fluido corporal com uma composição de anticorpos que imuno-reage com um segmento do terminal carboxilo da IL-8 possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

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

b) a manutenção da mistura de imuno-reacção sob condições biológicas de ensaio durante um período de tempo suficiente para se formar um produto de imuno-reacção; e

c) a detecção da presença do referido produto de imuno-reacção e, deste modo, a presença da IL-8.

Num processo de detecção de IL-8 relacionado, realizam-se os passos anteriores com a excepção de a composição de anticorpos, misturada no passo (a), conter moléculas de anticorpo que imuno-reagem com um segmento do terminal amino da IL-8 possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:  
(3-20).

Para realizar os ensaios de diagnóstico, como anteriormente

se descreveu, são contemplados sistemas de diagnóstico na forma de um conjunto de diagnóstico.

E. Sistemas de Diagnóstico


É contemplado um sistema de diagnóstico do presente invento para a detecção in vitro da presença de IL-8 in vivo. O sistema compreende uma composição contendo moléculas de anticorpo que imuno-reagem com um local activo de interacção de receptor da IL-8. As moléculas de anticorpo estão ligadas a meios indicadores in vitro, tais como meios indicadores de enzima.

O sistema de diagnóstico compreende uma embalagem contendo moléculas de anticorpo que imuno-reagem com um epítipo presente num segmento do terminal carboxilo da IL-8. Os anticorpos mais preferidos são anticorpos capazes de imuno-reagir com um epítipo presente numa sequência de não mais do que 18 aminoácidos de comprimento e incluindo a sequência de resíduos de aminoácido da molécula de IL-8 nativa, desde o resíduo 50 ao resíduo 67.

Um sistema de diagnóstico do presente invento, na forma de um conjunto, inclui, numa quantidade suficiente para realizar pelo menos um ensaio, uma composição contendo moléculas de anticorpo do local de interacção de receptor, activas, anti-IL-8, policlonal ou monoclonal, ou seus fragmentos, na forma de um reagente embalado em separado, conjuntamente com um marcador que indica a presença de um produto de imuno-reacção. Tipicamente, incluem-se também as instruções para uso do reagente embalado.

Um sistema de diagnóstico relacionado, útil para a detecção in vitro da presença de IL-8, compreende uma composição contendo moléculas de anticorpo que imuno-reagem com um epítipo presente no segmento do terminal amino da IL-8, definido pelo polipéptido p 3-20.

Este sistema de diagnóstico relacionado na forma de um conjunto, inclui, numa quantidade suficiente para realizar pelo menos um ensaio, uma composição contendo moléculas de anticorpo, policlonal ou monoclonal, anti-IL-8, ou seus fragmentos,



imuno-específicos para o polipéptido p 3-20, conjuntamente com um marcador que indica a presença de um produto de imuno-reacção. Tipicamente, incluem-se também as instruções para uso do reagente embalado desta concretização.

"Instruções para uso", incluem, tipicamente, uma expressão tangível descrevendo a concentração de reagente ou pelo menos um parâmetro do processo de ensaio, tal como as quantidades relativas de reagente e de amostra a serem misturadas, os períodos de tempo de manutenção para misturas de reagente/amostra, a temperatura, as condições tampão e outros. Incluem-se também, numa forma ou noutra, cartas, gráficos e similares de níveis de concentração predeterminados correlacionando condições fisiológicas específicas com níveis de IL-8.

Um sistema de diagnóstico do presente invento inclui também um marcador ou meios indicadores capazes de assinalar a formação de um complexo, ligado especificamente, contendo uma molécula de anticorpo do presente invento.

Adicionalmente, preferem-se os conjuntos nos quais as moléculas de anticorpo estão ligadas a meios indicadores de enzima, tais como a peroxidase de rábano silvestre (HRPO).

Tal como são aqui usados, os termos "marcador" e "meios indicadores", nas suas várias formas gramaticais, referem-se a átomos simples e a moléculas que estão envolvidas, quer directamente quer indirectamente, na produção de um sinal detectável para indicar a presença de um complexo. Quaisquer marcador ou meios indicadores podem ser ligados ou incorporados numa molécula de anticorpo que é parte de um anticorpo ou de uma composição de anticorpos monoclonais do presente invento, ou podem ser usados em separado, e esses átomos ou moléculas podem ser usados sozinhos ou em conjunto com reagentes adicionais. Estes marcadores são eles próprios bem conhecidos da química de diagnóstico clínico e constituem parte do presente invento apenas na medida em que são utilizados com novos processos e/ou sistemas.

A ligação de marcadores, i.e., a marcação de polipéptidos e de proteínas é bem conhecida na arte. Por exemplo, as moléculas de anticorpo produzidas por um hibridoma podem ser marcadas pela incorporação metabólica de aminoácidos contendo um radio-isótopo fornecidos como componente do meio de cultura. Ver, por exemplo, Galfre et al., Meth. Enzymol., 73:3-46 (1981). As técnicas de conjugação de proteínas ou de acoplamento através de grupos funcionais activados, são particularmente aplicáveis. Ver, por exemplo, Avrameas, et al., Scand. J. Immunol., Vol. 8, Suppl. 7:7-23 (1978), Rodwell et al., Biotech., 3:889-894 (1984), e Patente dos E.U.A. nº 4493795.

Os sistemas de diagnóstico podem incluir também, preferivelmente, na forma de uma embalagem separada, um agente de ligação específico. Um "agente de ligação específico" é uma entidade molecular capaz de se ligar selectivamente a uma espécie reagente do presente invento, mas que não é, ele próprio, uma molécula de anticorpo do presente invento. Exemplos de agentes de ligação específicos incluem moléculas de anticorpo, proteínas de complemento ou seus fragmentos, proteína A e outros. Preferivelmente, o agente de ligação específico pode-se ligar à molécula de anticorpo do presente invento quando esta está presente como parte de um complexo.

Em concretizações preferidas, o agente de ligação específico está marcado. Contudo, quando o sistema de diagnóstico inclui um agente de ligação específico que não está marcado, o agente é usado, tipicamente, como meio ou reagente de amplificação. Nestas concretizações, o agente de ligação específico, marcado, é capaz de se ligar especificamente ao meio de amplificação quando o meio de amplificação está ligado a um complexo contendo a espécie reagente.

Os conjuntos de diagnóstico do presente invento podem ser usados num formato "ELISA" para detectar, por exemplo, a presença ou a quantidade de IL-8, por determinação das moléculas imuno-reactivas numa amostra de fluido corporal, tal como o soro ou o

plasma. "ELISA" refere-se a um ensaio de imunossorção de enzima ligado que utiliza um anticorpo ou um antigénio, ligado a uma fase sólida, e um conjugado enzima-antigénio ou enzima-anticorpo para detectar e quantificar a quantidade de um antigénio ou de um anticorpo, presente numa amostra. Uma descrição da técnica de ELISA pode ser encontrada no Capítulo 22 da 4ª edição de Basic and Clinical Immunology de D.P. Sites et al., publicada por Lange Medical Publications de Los Altos, CA, E.U.A. em 1982, e nas Patentes dos E.U.A. nº 3654090; nº3850752; e nº 4016043, que são aqui todas incorporadas como referência.

Deste modo, em concretizações preferidas, o componente reagente de anticorpo ou de antigénio pode ser afixado a uma matriz sólida para formar um suporte sólido que é embalado em separado nos referidos sistemas de diagnóstico. Tipicamente, o reagente é afixado à matriz sólida por adsorção a partir de um meio aquoso, ainda que se possam usar outros modos de afixação, bem conhecidos dos peritos na arte.

São bem conhecidos na arte matrizes sólidas úteis. Estes materiais incluem o dextrano reticulado disponível com a marca comercial SEPHADEX da Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NY, E.U.A.); agarose; pérolas de poliestireno com um diâmetro de cerca de 1 micron a cerca de 5 milímetros, disponíveis em Abbott Laboratories of North Chicago, IL, E.U.A.; telas à base de poli(cloreto de vinilo), poliestireno, poli(acrilamida reticulada, nitrocelulose ou "nylon", tais como folhas, fitas ou almofadas; ou tubos, placas ou as cavidades de uma placa de microtitulação tais como as constituídas de poliestireno ou de poli(cloreto de vinilo).

A espécie reagente, o agente de ligação específico, marcado, ou o reagente de amplificação, de qualquer sistema de diagnóstico aqui descrito, pode ser fornecido em solução na forma de uma dispersão líquida ou na forma de um pó substancialmente seco, p.e., na forma liofilizada. Quando o meio indicador é uma enzima, o substrato da enzima pode ser também fornecido numa embalagem, em separado, de um sistema. Um suporte sólido tal como a placa de

microtitulação, anteriormente descrito e um ou mais tampões, podem ser também incluídos como elementos embalados, em separado, neste sistema de ensaio de diagnóstico.

As embalagens aqui descritas relativamente aos sistemas de diagnóstico são as normalmente usadas em sistemas de diagnóstico. Estas embalagens incluem garrafas de vidro e de plástico (p.e., polietileno, polipropileno e policarbonato), frascos, invólucros de plástico e de folha de plástico laminado, e outros.

F. Composições Terapêuticas

É também contemplada no presente invento uma composição terapêutica adequada para inibir a ligação de IL-8 e, deste modo, evitar a inflamação, compreendendo um anticorpo que imuno-reage com (a) o local de interacção de receptor da IL-8 e com (b) um análogo de polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-  
Val-Glu-Lys-Phe-Leu-Lys,

ou seus equivalentes biológicos, num excipiente farmacologicamente aceitável. Esta composição consegue o seu efeito terapêutico combinando-se e neutralizando o local activo da IL-8.

É contemplada uma composição terapêutica relacionada que é adequada para inibir a ligação de IL-8 e, deste modo, para a prevenção de acontecimentos mediados pela IL-8 tais como a inflamação, compreendendo um anticorpo que imuno-reage (a) com a IL-8 e com (b) um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

(3-20),

ou seus equivalentes biológicos, num excipiente farmacologicamente aceitável. Esta composição consegue o seu efeito terapêutico pela imuno-reacção com a IL-8 e, deste modo, interferência com (neutralização) o local activo da IL-8. Uma vez que o p 3-20 se localiza no terminal amino da IL-8, em comparação com o análogo de polipéptido p 50-67 e que não foi eficaz como análogo do local activo da IL-8, crê-se que o p 3-20 não representa um análogo do local activo. Deste modo, os anticorpos antipéptido imuno-espe-

cíficos do p 3-20 não imuno-reagem com o local activo, per se, mas ligam-se (imuno-reagem) com a IL-8 de uma forma que interfere e que, deste modo, neutraliza a actividade de ligação da IL-8.

Deste modo, numa outra concretização, é contemplada uma composição terapêutica que é adequada como análogo da IL-8, possuindo a capacidade de funcionar como aqui se define para um análogo de polipéptido, compreendendo um análogo de polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

(50-67),

ou seus equivalentes biológicos num excipiente farmacologicamente aceitável. Esta composição consegue o seu efeito terapêutico mimetizando o local activo da IL-8 e, deste modo, exibindo a actividade biológica da IL-8, tal como aqui se definiu para um análogo de polipéptido.

A preparação de composições terapêuticas que contêm moléculas de anticorpo ou polipéptidos, como ingredientes activos, é bem conhecida na arte. Tipicamente, estas composições são preparadas como injectáveis, quer como soluções líquidas, quer como suspensões. Contudo, podem-se também preparar formas sólidas adequadas para dissolução ou suspensão em líquido antes da injeção. A preparação pode ser também emulsionada. O ingrediente terapêutico activo é muitas vezes misturado com excipientes que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo. Excipientes adequados incluem, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou outros, e suas combinações. Adicionalmente, se desejado, a composição pode conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tamponantes de pH, que potenciam a eficácia do ingrediente activo.

Um anticorpo ou polipéptido pode ser formulado numa composição terapêutica como forma de sais farmacologicamente aceitáveis, neutralizados. Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres da molécula de anticorpo) e que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, os ácidos clorídrico ou fosfórico, ou com

ácidos orgânicos tais como os ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico e outros. Os sais formados com os grupos carboxilo livres podem ser também obtidos a partir de bases inorgânicas tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio ou férrico, e de bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína e outras.

G. Processos para Inibir a Resposta Inflamatória

É também contemplado pelo presente invento um processo para inibição da actividade da IL-8 e, deste modo, prevenção da inflamação num paciente, compreendendo a administração a um paciente de uma composição contendo um anticorpo que imuno-reage (a) com o local de interacção de receptor da IL-8 e (b) com um análogo de polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-  
Val-Glu-Lys-Phe-Leu-Lys,

ou seus equivalentes biológicos, num excipiente farmacologicamente aceitável.

Numa concretização relacionada, o invento contempla um processo para inibição da actividade da IL-8 e, deste modo, prevenção da inflamação num paciente, compreendendo a administração ao paciente de uma composição contendo um anticorpo que imuno-reage (a) com a IL-8 e com (b) um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

(3-20),

ou seus equivalentes biológicos, num excipiente farmacologicamente aceitável.

As composições terapêuticas contendo moléculas de anticorpos são, convencionalmente, administradas intravenosamente, por exemplo, por injeção de uma dose unitária. O termo "dose unitária", quando usado relativamente a uma composição terapêutica do presente invento, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias contendo, cada unidade, uma quantidade predeterminada de material activo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com o diluente

requerido; i.e., transportador ou veículo.

As composições são administradas de um modo compatível com a formulação de dosagem e numa quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade a ser administrada depende do sujeito a ser tratado, da capacidade do sistema do sujeito em utilizar o ingrediente activo sem efeitos laterais adversos, e do grau de inibição da interacção desejado entre a IL-8 e o tipo de células apropriado. As quantidades precisas de anticorpo activo, requeridas para administração, dependem do julgamento do médico e são particulares para cada indivíduo. Contudo, gamas de dosagem adequadas são da ordem de 0,1 a 40 miligramas, preferivelmente, de 10 a 20 miligramas e, muito preferivelmente, de cerca de 15 miligramas, de anticorpo por quilograma de peso corporal do indivíduo, e dependem da via de administração.

Será de esperar que uma única dose de cerca de 15 mg/kg de peso corporal de um indivíduo seja eficaz. Os regimes adequados para injeções de reforço, se requerido, são também variáveis mas, tipicamente, incluem uma administração inicial seguida de doses repetidas com intervalos predeterminados, por injeção subsequente ou por outra administração. Alternativamente, é contemplada a infusão intravenosa contínua, suficiente para manter concentrações de 15 miligramas por quilograma de peso corporal, no sangue.

Pretende-se que os exemplos seguintes sejam ilustrativos e não limitativos do presente invento.

#### EXEMPLOS

Pretende-se que os exemplos seguintes sejam ilustrativos mas não limitativos do presente invento.

##### 1. Síntese de Polipéptidos

Os polipéptidos correspondentes à sequência de resíduos de aminoácido 3-20, 50-67 e 57-72, aqui depois designados, respectivamente, por Pep-3, Pep-1 e Pep-2 da IL-8, foram sintetizados pe-

la técnica de fase sólida clássica descrita por Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-296 (1969) adaptada para uso com um sintetizador de péptidos automático Modelo 430A (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.). As resinas-polipéptido foram clivadas usando fluoreto de hidrogénio, extractadas e analisadas, para determinar a pureza, por cromatografia líquida de alta eficiência sobre uma coluna C18 de fase inversa fabricada por Water Associates, Milford, MA, E.U.A.

Na Tabela 1 mostram-se as sequências de resíduos de aminoácido dos polipéptidos anteriormente referidos.

TABELA 1

Designação da Fórmula <sup>1</sup>	Sequência de origem da IL-8	Sequência de resíduos de aminoácido
Pep-1	50-67	CLDPKENWVQRVVEKFLK
Pep-2	57-72	WVQRVVEKFLKRAENS
Pep-3	3-20	KELRCQCIKTYSKPFHPH

<sup>1</sup> Os polipéptidos Pep-1, Pep-2 e Pep-3 são também aqui designados por p 50-67, p 57-72 e p 3-20, respectivamente.

2. Activação de Neutrófilos por um Polipéptido Sintético  
Relacionado com a IL-8

A. Ensaio In Vitro

(1) Preparação de células

Recolheu-se sangue, após o consentimento informado, de voluntários normais isentos de medicação e anti-coagulou-se com uma mistura de ácido cítrico 0,14 M, citrato tri-sódico 0,2 M e dextrose 0,22 M. O sangue anti-coagulado foi centrifugado a 800 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente e rejeitou-se o sobrenadante de plasma rico em plaquetas. Ressuspenderam-se os eritrócitos sedimentados e as células mononucleares e polinucleares, e diluíram-se com um volume igual ao volume de

sangue de partida com PBS 0,14 M frio, pH 7,4. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram depois removidas da suspensão de células diluída por centrifugação em Ficoll-Hypaque (Sigma Chem. Corp., St. Louis, MO, E.U.A.) de baixo teor em endotoxina, a 400 x g durante 10 minutos a 18 graus C (18°C).

As células polinucleares (neutrófilos), na suspensão de células desprovida de PBMC, foram depois recuperadas por sedimentação em dextrano. Ressuspendeu-se o sedimento de células resultante, contendo neutrófilos, numa concentração de  $1,5 \times 10^7$  células/mililitro (ml), em Solução Salina Equilibrada de Hanks (HBSS) (Sigma Chem. Corp.) isenta de cálcio. A suspensão de células ressuspendidas foi mantida em gelo e usada nas duas horas seguintes após o isolamento.

## (2) Mobilização de Cálcio

A suspensão de células resultante, contendo neutrófilos, que exprimem o receptor de IL-8, isoladas, foi marcada por fluorescência com Indo-1-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, E.U.A.). Misturou-se uma solução cinco micromolar ( $\mu\text{M}$ ) de Indo-1-AM dissolvido numa concentração final de 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) com  $1 \times 10^7$  neutrófilos/ml em HBSS isento de cálcio, preparados no passo (1) anterior, e manteve-se a mistura durante 30 minutos a 37°C para formar neutrófilos marcados por fluorescência. Após este período, lavou-se a suspensão de células, marcadas com Indo-1-AM, duas vezes com HBSS isento de cálcio. Ressuspendem-se os neutrófilos resultantes, marcados por fluorescência e lavados, em HBSS contendo HEPES 10 mM, cálcio 1,5 mM e 1 grama de glucose, até uma concentração final de  $2 \times 10^6$  células/ml. A suspensão de células foi depois pré-aquecida por manutenção a 37°C durante 2 minutos.

Misturaram-se, separadamente, alíquotas da suspensão de células de neutrófilos, marcados por fluorescência, pré-aquecida, com  $1 \times 10^{-12}$  M do polipéptido sintético, Pep-1, produzido no Exemplo 1, (TABELA 1), de IL-8 recombinante humana obtida, quer a partir de células endoteliais (Biosource, Westlake Village, CA,

E.U.A.) quer a partir de monocitos (Sandoz, Basel, Suíça), ou com  $1 \times 10^{-8}$  M do polipéptido sintético, Pep-2 produzido no Exemplo 1. Cada mistura foi submetida a fluorometria de células, pela qual se avaliaram os efeitos dos péptidos sintéticos ou da IL-8 na mobilização do cálcio em neutrófilos. A mobilização do cálcio foi medida em cada mistura pela detecção de variações na fluorescência com o tempo, num fluorometro SLM 8000. O fluorometro estava equipado com um filtro de excitação com um comprimento de onda de 340 nanometro (nm), com um filtro de emissão com um comprimento de onda de 400 nm no canal A, que representa o Indo-1-AM ligado ao cálcio, e com um filtro de emissão com um comprimento de onda de 485 nm no canal B que representa o Indo-1-AM livre. A razão entre a fluorescência detectada no canal A e a detectada no canal B (representada pela razão F) é igual ao valor da quantidade de cálcio intracelular.

Os resultados deste ensaio, que se mostram na Figura 1, indicam que a mobilização do cálcio, em neutrófilos marcados com Indo-1-AM, aumentou dez segundos após o tratamento com o polipéptido sintético, Pep-1, tal como foi medido por fluorometria e cálculo das razões F como anteriormente se descreveu. Os resultados são comparados com as razões F calculadas a partir de neutrófilos tratados, quer com IL-8 recombinante humana, quer com o péptido sintético, Pep-2. Tanto o Pep-1 como a IL-8 recombinante humana, induzem a mobilização de cálcio que satura 20 segundos após o tratamento. Por contraste, o péptido sintético, Pep-2, não promove a mobilização do cálcio. O efeito do Pep-1 na mobilização do cálcio em neutrófilos mimetiza a IL-8 recombinante humana intacta, enquanto que o Pep-2 não promove a mesma resposta.

Os resultados deste estudo indicam que os primeiros sete resíduos de aminoácido do terminal amino do Pep-1 são responsáveis pela capacidade do Pep-1 em se ligar ao receptor da IL-8. Deste modo, polipéptidos adicionais do presente invento possuem um comprimento da sequência de resíduos de aminoácido na gama de 7 a 30 e, preferivelmente, não mais do que 20 a 25 resíduos, e contêm a sequência CLDPKEN. Preferivelmente, estes péptidos possuem uma sequência global que corresponde, e que é,

preferivelemente, idêntica, à da IL-8. Preferem-se também que estes péptidos se liguem ao receptor da IL-8, tal como é evidenciado pela sua capacidade em inibir competitivamente a ligação da IL-8 ao receptor, mas não induzem a activação de neutrófilos, tal como se descreveu na secção B2 anterior, Ensaio de Actividade. Na Tabela 2 seguinte mostram-se exemplos de péptidos.

TABELA 2

CLDPKEN  
CLDPKENW  
CLDPKENWV  
CLDPKENWVQ  
CLDPKENWVQR  
CLDPKENWVQRV  
CLDPKENWVQRVV  
CLDPKENWVQRVVE  
CLDPKENWVQRVVEK  
CLDPKENWVQRVVEKF  
CLDPKENWVQRVVEKFL

(3) Desvio da Luz em Ângulo Recto

Trataram-se alíquotas de neutrófilos isolados, preparados no passo (1) anterior, com  $1 \times 10^{-12}$  M de qualquer dos polipéptidos sintéticos relacionados com a IL-8, tal como no passo (2) anterior. Os neutrófilos tratados, submetidos a fluorometria no passo (2) anterior, foram também analisados, concorrentemente, para determinar modificações morfológicas em resposta à activação celular. A medição do desvio da luz em ângulo recto, para um espectro de excitação e emissão de 340 nm, é um meio indirecto para determinar modificações da forma. O tratamento de neutrófilos com Pep-1 resultou numa diminuição do desvio da luz em ângulo recto comparável ao que se observa com a IL-8 intacta. Deste modo, o Pep-1, efectuou uma modificação de forma, em paralelo com a mobilização de cálcio aumentada, em neutrófilos, mimetizando a activação por IL-8.



#### (4) Libertação de Elastase

A libertação da elastase foi determinada com o substrato fluorescente oMe-succinimida-Ala-Ala-Pro-Val-metil-coumarilamida (Peninsula Laboratories). Mantiveram-se alíquotas de  $2 \times 10^6$  neutrófilos isolados/ml, preparados como no passo (1) anterior, a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 minutos, na presença de  $2 \times 10^{-5}$  M do substrato fluorescente dissolvido em DMSO a 0,1% e de 1 micrograma ( $\mu\text{g/ml}$ ) de citocalasina B. As alíquotas de neutrófilos, tratadas com substrato, foram depois misturadas, em separado, com os polipéptidos sintéticos preparados no Exemplo 1.

A mistura resultante foi depois submetida a análise fluorométrica, realizada como no passo (2) anterior num fluorómetro SIM 8000 equipado com um filtro de excitação com um comprimento de onda de 380 nm e com um filtro de emissão de 4900 angstrom. A elastase libertada dos neutrófilos tratados com péptido foi medida cineticamente durante um período de 2 minutos numa "cuvette" agitada mantida a  $37^\circ\text{C}$ . O teor total em elastase dos neutrófilos foi determinado por lise das células com Triton X-100 a 1%. A libertação espontânea de elastase foi subtraída ao total para se obter a libertação de elastase corrigida.

Os resultados do ensaio de libertação de elastase indicam que o Pep-1, para uma concentração de  $1 \times 10^{-9}$  M, promoveu uma libertação de elastase em neutrófilos comparável à que se observa com IL-8 recombinante humana intacta. Estes resultados constituem suporte adicional para o facto de o Pep-1 conter o local activo da IL-8, mimetizando assim a activação de neutrófilos pela IL-8.

#### B. Ensaio In Vivo

O Pep-1, preparado no Exemplo 1, foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) isenta de lipopolissacárido e as soluções, em concentrações compreendidas entre  $1 \times 10^{-9}$  M e  $1 \times 10^{-11}$  M, foram injectadas na pele de um coelho. A IL-8 recombinante humana, preparada de um modo similar, foi injectada numa área de pele separada do mesmo coelho. As injecções de PBS sozinha serviram como controlo negativo. Um segundo coelho recebeu injecções similares das soluções.



A pele correspondente às áreas das injeções com Pep-1, IL-8 e PBS foi excisada dos coelhos quatro horas após a injeção. As amostras de pele excisada foram analisadas, por microscopia óptica, para avaliar a quimiotaxia de neutrófilos na área da injeção. As injeções de Pep-1 resultaram numa quimiotaxia de neutrófilos, dependente da dose, que não se distinguiu do influxo induzido pelas mesmas concentrações de IL-8. Os neutrófilos não prevaleceram em áreas que receberam injeções de PBS.

### 3. Preparação de Anti-soros Policlonais Contra um Polipéptido Sintético Relacionado com a IL-8

#### A. Preparação do Imunogénio

O polipéptido sintético, Pep-1, preparado no Exemplo 1, foi acoplado à hemocianina de lapa *Fissurella* (KLH) pelo resíduo cisteína do terminal N do Pep-1 para formar conjugados Pep-1-KLH. A KLH foi dialisada contra uma solução de PBS 10 mM e ajustou-se a solução de KLH dialisada resultante até uma concentração de 20 miligramas (mg)/ml. Dissolveram-se 3 mg de éster *m*-maleimidobenzóil-*N*-hidroxissuccinimida (MBS) (Pierce Biochemicals, Rockford, IL, E.U.A.) em 5 ml de dimetilformamida (Pierce Biochemicals). Misturaram-se 85 microlitros ( $\mu$ l) da solução de MBS resultante com 200  $\mu$ l da solução de KLH, para formar uma mistura de KLH-MBS que foi mantida a 25°C durante 30 minutos.

Depois, submeteu-se a mistura de KLH-MBS através de uma coluna Sephadex G-25 (Pharmacia, Piscataway, NJ, E.U.A.) e colheram-se fracções de 1 ml de KLH tratada com MBS. Depois misturou-se 1 ml da KLH cromatografada com 1 ml de uma solução de 5 mg/ml de Pep-1, previamente dissolvido em PBS, para formar um imunogénio de conjugado Pep-1-KLH. O pH da mistura Pep-1-KLH foi depois ajustado até pH 7,0 e, depois, manteve-se a mistura a 25°C durante três horas.

Preparou-se um imunogénio de conjugado Pep-3-KLH como anteriormente, com a excepção de se ter usado o polipéptido sintético Pep-3 em vez do Pep-1.

#### B. Imunização e Colheita dos Antissoros Policlonais

O imunogénio de Pep-1-KLH, preparado no Exemplo 3A, foi



emulsionado em adjuvante completo de Freund (CFA) e os antigénios de Pep-1-KLH foram incorporados na emulsão numa concentração de 200  $\mu\text{g}/1,5$  ml. Injectaram-se dois coelhos, cada um, com 1,5 ml da emulsão preparada, após se terem colhido amostras de soro antes da imunização. O volume total da dose de emulsão foi dividido, em partes iguais, para administração subcutânea no dorso, espáduas e ancas de um coelho.

No dia 14, os coelhos receberam uma injeção de reforço do imunogénio de Pep-1-KLH emulsionado em adjuvante de Freund incompleto (IFA). No dia 21, cada coelho recebeu uma injeção intraperitoneal de 1 ml de uma solução de 10 mg/ml de Pep-1 livre dissolvido em 1,2 ml de PBS contendo 0,8 ml de hidróxido de alumínio. Colheram-se amostras de soro de cada coelho imunizado, 7 e 14 dias após a terceira injeção, e analisaram-se por transferência de Western como se descreve a seguir em C para a detecção de anticorpos específicos do Pep-1.

De um modo similar, prepararam-se amostras de soro usando coelhos imunizados com o imunogénio de Pep-3-KLH do Exemplo 3A, para formar anticorpos específicos do Pep-3, que foram caracterizados como a seguir se descreve em C.

C. Análise de Antissoros Policlonais por Análise de Transferência de Western

Separaram-se amostras de IL-8 recombinante humana, de Pep-1 e de Pep-3, numa concentração de 100 ng/ml, por electroforese em gel, e transferiram-se para nitrocelulose para análise de imuno-transferência subsequente. Misturou-se o filtro de nitrocelulose com tampão de bloqueamento de anticorpo (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,5, cloreto de sódio 0,5 M, 1% de albumina de soro de bovino e 0,05% de Tween 40) durante 3 a 12 horas à temperatura ambiente. Diluíram-se os soros colhidos a partir dos coelhos, preparados no Exemplo 3B, que se crê que contém anticorpos imuno-reactivos com Pep-1 ou com Pep-3, 1:500 no tampão de bloqueamento anticorpo e misturou-se com a nitrocelulose. A mistura resultante foi mantida durante 12 horas à temperatura ambiente para permitir a formação de um produto de



imuno-reacção sobre a fase sólida.


Os soros pré-ímenes dos mesmos coelhos foram testados simultaneamente em amostras separadas para servirem como controlo negativo. A nitrocelulose foi depois lavada três vezes com volumes em excesso de tampão de bloqueamento de anticorpo. As lavagens foram seguidas da mistura da nitrocelulose com IgG anti-coelho conjugada com peroxidase de rábano silvestre (HRP) (Sigma Chem. Corp.), numa diluição 1:500 em tampão de bloqueamento de anticorpo, durante uma hora à temperatura ambiente, para permitir que a IgG marcada com HRP se ligue a qualquer produto de imuno-reacção, presente na fase sólida sobre a nitrocelulose. Depois, lavou-se a nitrocelulose como aqui se descreveu e revelou-se por tratamento com 4-cloro-1-naftol como substrato, de modo a visualizar o marcador e, deste modo, qualquer produto de imuno-reacção sobre a nitrocelulose.

Os antissoros policlonais contendo anticorpos imuno-reactivos com a IL-8, Pep-1 e Pep-3 foram depois avaliados quanto à sua capacidade em inibirem a função da IL-8 como se descreve no Exemplo 5.

#### D. Purificação por Imunoafinidade dos Anticorpos Policlonais

Os anticorpos anti-Pep-1 e anti-Pep-3, preparados com antissoros policlonais como se descreveu no Exemplo 3C, foram purificados por imunoafinidade, usando polipéptido imobilizado na fase sólida como se segue.

Os polipéptidos Pep-1 e Pep-3 foram acoplados, cada um em separado, a brometo de cianogénio (CNBr)- Sepharose 4B activada (Pharmacia), numa concentração de 3 mg de proteína para 1 ml de gel, em tampão de acoplamento (NaCl 0,5 M e borato 0,05 M, a pH 8,5), de um dia para o outro a 4°C, para formar uma suspensão de polipéptido - Sepharose. A suspensão foi empacotada numa coluna e lavada com tampão de acoplamento para remover polipéptido não ligado, de acordo com as instruções do fabricante. Os antissoros policlonais foram misturados com uma solução tampão contendo NaCl




0,1 M, ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) 2 mM, benzamidina 2 mM, 0,02% de  $\text{NaN}_3$ , 0,02% de Tween-20 e Tris-HCl a pH 7,4. Depois, fizeram-se passar os soros tamponados sobre a coluna de polipéptido preparado - Sepharose, para imobilizar os anticorpos anti-polipéptido sobre a coluna de anticorpo e separar os anticorpos específicos de polipéptido dos anticorpos não específicos ou fracamente específicos, e outros componentes do soro. A coluna de polipéptido contendo anticorpo imobilizado foi lavada, subsequentemente para remover mais anticorpos não ligados e outras proteínas. O anticorpo imobilizado foi depois eluído da coluna com tiocianato de sódio ( $\text{NaSCN}$ ) 3M em NaCl 1,0 M, benzamidina 4 mM, EDTA 2 mM, 0,02% de  $\text{NaN}_3$  e Tris-HCl 0,05 M a pH 7,0. Determinou-se que o anticorpo eluído e purificado tinha uma pureza superior a 95% quando analisado usando electroforese em dodecilsulfato de sódio-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4. Preparação de Anticorpos Monoclonais Contra um Polipéptido Sintético Relacionado com a IL-8

A. Geração de Hibridomas anti-Pep-1

O polipéptido sintético, Pep-1, é preparado na forma de um imunogénio, de acordo com o Exemplo 3. Imunizam-se ratinhos Balb/c ByJ (Scripps Clinic and Research Foundation Vivarium, La Jolla, CA, E.U.A.), intraperitonealmente (i.p.), com 50  $\mu\text{g}$  de imunogénio de Pep-1-KLH preparado, em CFA, seguindo-se uma segunda e uma terceira imunização, usando o mesmo imunogénio de Pep-1-KLH, cada uma separada de cerca de três semanas, em IFA. Os ratinhos recebem um reforço de 50  $\mu\text{g}$  de imunogénio do Pep-1-KLH preparado, intravenosamente (i.v.), em solução salina normal, 4 dias antes da fusão e um segundo reforço, por perfusão, similar um dia mais tarde.

Os animais assim tratados são sacrificados e colhe-se o baço de cada ratinho. Prepara-se depois uma suspensão de células de baço. Depois, extraem-se as células de baço da suspensão de células de baço, por centrifugação, durante cerca de 10 minutos a 1000 rpm, a 23°C. Após a remoção do sobrenadante, ressuspende-se o sedimento de células em 5 ml de tampão de lise de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , e incuba-se durante cerca de 10 minutos.



À suspensão de células lisadas adicionam-se 10 ml de Meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (GIBCO) e tampão HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperidino-etanossulfônico] e essa mistura é centrifugada, durante cerca de 10 minutos, a 1000 rpm, a 23°C.

Decanta-se o sobrenadante, ressuspende-se o sedimento, em 15 ml de DMEM e HEPES, e centrifuga-se, durante cerca de 10 minutos, a 1000 rpm, a 23°C. Repete-se o procedimento anterior.

Depois, ressuspende-se o sedimento em 5 ml de DMEM e HEPES. Remove-se então uma alíquota da suspensão de células de baço para contagem. As fusões são realizadas do seguinte modo, usando a linha de células de mieloma de ratinho não segregante P3X63Ag8.653.1, um subclone da linha de células P3X63Ag8.653 (ATCC 1580). Usando uma proporção de células de mieloma para células de baço de cerca de 1 para 10 ou de cerca de 1 para 5, centrifuga-se uma quantidade suficiente de células de mieloma para formar um sedimento, lava-se duas vezes, em 15 ml de DMEM e HEPES, e centrifuga-se durante 10 minutos a 1000 rpm a 23°C.

Combinam-se as células de baço e as células de mieloma em tubos de 15 ml de fundo redondo. Centrifuga-se a mistura de células, durante 10 minutos, a 1000 rpm, a 23°C, e remove-se o sobrenadante por aspiração. Depois, misturam-se 200 µl de uma solução aquosa a 50 por cento (peso por volume) de polietilenoglicol de massa molecular 4000 (PEG; ATCC Baltimore, MD, E.U.A.) a cerca de 37°C, usando uma pipeta de 1 ml, com agitação vigorosa, para a quebra do sedimento, e misturam-se as células, gentilmente, durante um período entre 15 e 30 segundos. Centrifuga-se a mistura de células durante 4 minutos a 700 rpm.

Cerca de 8 minutos antes de se adicionar o PEG, misturam-se, lentamente, 5 ml de DMEM mais tampão de HEPES, com o sedimento, sem perturbar as células. Após 1 minuto, quebra-se a mistura resultante, com uma pipeta de 1 ml, e incuba-se durante mais 4 minutos. Esta mistura é centrifugada durante 7 minutos a 1000 rpm. Decanta-se o sobrenadante, misturam-se, lentamente, 5 ml de meio HT (hipoxantina/timidina) com o sedimento, e mantem-se a mistura

não perturbada durante 5 minutos. O sedimento é depois quebrado em grandes bocados e a suspensão final de células é colocada em balões T75 (2,5 ml por balão) nos quais se tinham colocado previamente 7,5 ml de meio HT. A suspensão de células resultante é incubada, a 37°C, para desenvolver as células fundidas. Após 245 horas, adicionam-se 10 ml de meio HT aos balões, seguidas de 0,3 ml de aminopterina 0,04 mM, 6 horas mais tarde. Quarenta e oito horas após a fusão, adicionam-se 10 ml de meio HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina) aos balões.

Três dias após a fusão, plaqueiam-se as células viáveis em placas de cultura de tecidos de 96 cavidades com cerca de  $2 \times 10^4$  células viáveis por cavidade (um total de 768 cavidades), em meio tampão de HAT, tal como se descreve em Kennett et al., Curr Top. Microbiol. Immunol., 81:77 (1978). As células são alimentadas sete dias após a fusão com meio HAT e, depois, com intervalos de aproximadamente 4-5 dias, conforme necessário, com meio HT. O crescimento é seguido microscopicamente, e os sobrenadantes da cultura são colhidos cerca de duas semanas mais tarde e analisados para determinar a presença de anticorpo, específico do Pep-1, por doseamento radio-imunológico (RIA) em fase sólida.

Resumidamente, adicionam-se 50  $\mu$ l de PBS, contendo 5  $\mu$ g/ml de imunogénio de Pep-1-KLH preparado, às cavidades de placas de microtitulação. As placas são mantidas de um dia para o outro (cerca de 16 horas) a 4°C, para permitir que o imunogénio de Pep-1-KLH adira às paredes das cavidades. Após lavagem das cavidades, quatro vezes com tampão SPRIA (KCl 2,68 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,47 mM, NaCl 137 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,03 mM, 0,05% de Tween-20, 0,1 KIU/ml de Traysol, 0,1% de BSA e 0,015% de  $\text{NaN}_3$ ), adicionam-se 200  $\mu$ l de tampão SPRIA contendo 3% de soro de cabra normal (NGS) e 3% de albumina de soro de bovino (BSA), a cada cavidade, para bloquear os locais de ligação de proteína em excesso. As placas são mantidas durante 30 minutos a 20°C, vazam-se as cavidades por agitação e secam-se por absorção para formar um suporte sólido, i.e., uma matriz sólida à qual se fixa operativamente o imunogénio de Pep-1-KLH.

A cada cavidade, adicionam-se depois 50  $\mu$ l de sobrenadante de cultura de tecidos de hibridoma para formar uma mistura de imuno-reacção em fase sólida-líquida. A mistura é mantida, durante 2 horas a 37°C, para permitir a formação de produtos de imuno-reacção em fase sólida. Após lavagem das cavidades como aqui anteriormente se descreveu, adicionam-se 50  $\mu$ l de IgG de cabra anti-ratinho, marcada (Cappel Laboratories, Downington, PA, E.U.A.), com 0,25  $\mu$ g de proteína por ml, a cada cavidade, para formar uma mistura reaccional de marcação. Essa mistura é mantida durante 1 hora a 37°C para permitir a formação de produtos de imuno-reacção em fase sólida, marcados com  $^{125}$ I. Após lavagem das cavidades como anteriormente se descreveu, a quantidade de produto, marcado com  $^{125}$ I, ligado a cada cavidade, é determinada por detecção gama.


Os hibridomas são seleccionados, a partir de culturas de hibridoma que segregam anticorpos anti-Pep-1 para os seus meios de cultura, e caracterizados adicionalmente como aqui se descreveu.

Os hibridomas são produzidos e seleccionados a partir de culturas de hibridoma que segregam anticorpos anti-Pep-3, usando os processos que anteriormente se descreveram com excepção de se usar o Pep-3 em vez do Pep-1, como o polipéptido de imunização e de pesquisa.

#### B. Produção e Purificação do Anticorpo Monoclonal Pep-1

O hibridoma anti-Pep-1 é cultivado numa atmosfera humidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C, em DMEM contendo L-glutamina 2 mM, 50  $\mu$ g de gentamicina por ml, 10% de soro fetal de bovino e 10% de soro de cavalo, todos da Grand Island Biological Co., Lawrence, MA, E.U.A., 10% de meio NCTC de Microbiological Associates, Rockville, MD, E.U.A., hipoxantina, 1 mM e timidina 0,3 mM, ambos da Sigma Chemical Corp. A concentração de células é mantida na gama de cerca de  $1-2 \times 10^5$  células por ml de meio a cerca de  $1-2 \times 10^6$  células por ml de meio, para o crescimento e divisão das células e produção de anticorpo.

Para produzir fluido ascítico de tumor contendo moléculas de



anticorpo anti-Pep-1, sensibilizaram-se imunologicamente ratinhos Balb/c, com 10 semanas de idade, por injeção intraperitoneal com 0,3 ml de óleo mineral e, subsequentemente, injectaram-se intraperitonealmente com  $3-5 \times 10^5$  células de hibridoma anti-Pep-1. Os ratinhos inoculados são depois mantidos durante um período de tempo suficiente para se acumularem fluidos ascíticos de tumor, contendo anticorpos, p.e., durante cerca de 10 a cerca de 21 dias. O fluido ascítico é recolhido e clarificado por centrifugação a 15 000 x g durante 1 hora a 4°C e armazenado congelado a -20°C.

As moléculas de anticorpos anti-Pep-1 são isoladas a partir do fluido ascítico, submetendo o fluido a cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) sobre uma coluna de permuta aniónica Pharmacia Mono QHR 5/5, num sistema de FPLC da Pharmacia (ambos da Pharmacia, Inc.) usando um gradiente de NaCl de 0-0,5 M, em Tris 10 mM, pH 8,0, e seguindo as instruções fornecidas com a coluna. As moléculas de anticorpo anti-Pep-1 assim isoladas podem depois ser transferidas, para qualquer diluente fisiologicamente tolerável, por diálise.

Alternativamente, as moléculas de anticorpo anti-Pep-1 podem ser isoladas, a partir do fluido ascítico de tumor, por precipitação com sulfato de amónio de acordo com o processo descrito por Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, p 100-101 (1983). Resumidamente, esse processo compreende misturar lentamente solução saturada de sulfato de amónio com o fluido ascítico, até se atingir uma concentração de sulfato de amónio de cerca de 45% a cerca de 50%. As imunoglobulinas precipitadas são depois recolhidas por centrifugação a 2000 x g, preferivelmente, a 10 000 x g. O precipitado é lavado 2 ou 3 vezes em solução de sulfato de amónio saturada a 40%. as moléculas de anticorpo anti-Pep-1 precipitadas, são depois dialisadas contra 500-1000 volumes de solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou qualquer outro diluente fisiologicamente tolerável desejado, para remover o sulfato de amónio. O fluido de diálise é mudado várias vezes com intervalos de algumas horas. A concentração de proteína da solução de anticorpo anti-Pep-1 dialisada, recuperada é determinada pelo método de Lowry [Lowry et

al., J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)] usando um padrão de albumina de soro de bovino.

A confirmação da especificidade funcional dos anticorpos anti-Pep-1, quer numa amostra de soro obtida no Exemplo 3, quer no sobrenadante da cultura de hibridoma, é determinada, em ensaios de ligação a neutrófilos exprimindo receptores de IL-8, em ensaios de competição a seguir descritos no Exemplo 5.

O hibridoma anti-Pep-3, preparado como se descreveu no Exemplo 4A, é cultivado como se descreveu anteriormente para o hibridoma anti-Pep-1. As moléculas de anticorpos anti-Pep-3 são purificadas a partir do hibridoma anti-Pep-3 como anteriormente se descreveu para as moléculas de anticorpos anti-Pep-1.

A confirmação da especificidade funcional dos anticorpos anti-Pep-3, quer numa amostra de soro obtida no Exemplo 3, quer no sobrenadante da cultura de hibridoma, é determinada na análise de transferência de Western do Exemplo 3C e nos ensaios de ligação a neutrófilos exprimindo o receptor da IL-8, como se descreve no Exemplo 5.

## 5. Ligação e Inibição da Ligação de IL-8 Iodada a Neutrófilos

### A. Ensaio de Ligação

A IL-8, obtida como se descreveu no Exemplo 2, foi radioiodada seguindo o procedimento de iodação com iodogénio de acordo com as instruções do fabricante (Pierce Biochemicals). A alíquotas separadas dos neutrófilos exprimindo o receptor de IL-8, preparados no Exemplo 1, misturaram-se concentrações crescentes de IL-8 marcada com  $^{125}\text{I}$ , como anteriormente se descreveu. A concentração da IL-8 na mistura estava compreendida entre  $3 \times 10^{-10}$  e  $5 \times 10^{-9}$  M, o que correspondia a um valor de 1000 contagens por minuto (CPM) até 110 000 CPM. A mistura foi mantida durante 20 minutos à temperatura ambiente, período após o qual se atingiu o equilíbrio. Depois, centrifugaram-se alíquotas das misturas, através de uma mistura de óleos de silício, a 12 000 x g, durante 5 minutos à temperatura ambiente, para separar a IL-8 li-

vre da IL-8 ligada a neutrófilos. A radioactividade total associada às células foi determinada por detecção em contador gama.

A ligação específica da IL-8 associada às células, foi calculada subtraindo a radioactividade associada às células, que resultou em misturas mantidas na presença de um excesso molar de 100 vezes de IL-8 não marcada, à radioactividade total. Na Figura 2 mostram-se os resultados líquidos ou específicos da reacção de ligação da IL-8 iodada a neutrófilos, representando, cada ponto, a média  $\pm$  o erro padrão de média (EPM) de três experiências independentes. Os resultados mostram que as suspensões de neutrófilos, contendo receptores de IL-8, se ligam à IL-8 iodada numa reacção específica e não saturável.

#### B. Ensaio de Inibição

##### (1) Anticorpos Policlonais anti-Pep-1

A ligação de IL-8 iodada ao local de interacção de receptor da IL-8 em neutrófilos, foi confirmada realizando ensaios de inibição com anticorpos policlonais anti-Pep-1 preparados no Exemplo 3. A IL-8 foi iodada como se descreveu em A, como anteriormente, e misturaram-se, separadamente, concentrações crescentes da IL-8 marcada, compreendidas entre  $3 \times 10^{-10}$  M e  $1 \times 10^{-9}$  M, com 2 mg/ml de anticorpo policlonal anti-Pep-1 para formar uma mistura de imuno-reacção que foi mantida a 37°C durante 30 minutos. Prepararam-se fragmentos FAB dos anticorpos anti-Pep-1 e avaliaram-se também nos ensaios de inibição seguindo o mesmo procedimento. Os fragmentos Fab foram preparados a partir de soros usando os protocolos do fabricante e o conjunto de preparação, para a preparação de Fab, Immunopure (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, E.U.A.).

Após o período de manutenção, as misturas de imuno-reacção foram misturadas, separadamente, com alíquotas de  $2 \times 10^6$  neutrófilos/ml, preparados no Exemplo 1, para formar uma mistura de imuno-reacção celular. A mistura resultante foi mantida como nos ensaios de ligação da IL-8. A reacção de ligação foi terminada como anteriormente se descreveu.

A ligação específica da IL-8 ao local de interacção de re-

ceptor da IL-8 em neutrófilos e a inibição da ligação por tratamento com anticorpos policlonais anti-Pep-1, foram calculados como se descreveu em A. A ligação da IL-8 ao local de interacção de receptor da IL-8 em neutrófilos foi inibida por tratamento, quer com anticorpos anti-Pep-1 intactos quer com fragmentos Fab anti-Pep-1, para todas as concentrações de IL-8 iodada avaliadas no ensaio, como se mostra na Figura 2. Os resultados indicam que os anticorpos policlonais dirigidos contra a sequência de resíduos de aminoácido 50-67 da IL-8, Pep-1, são eficazes na ligação ao local activo na IL-8, evitando deste modo a ligação da IL-8 ao local de interacção de ligando da IL-8 (receptor) em neutrófilos.

(2) Anticorpos Policlonais anti-Pep-1 e anti-Pep-3  
Purificados por Imuno-afinidade

Determinou-se também a capacidade de composições de anticorpos anti-IL-8 e purificadas por imuno-afinidade, preparados no Exemplo 3D, em inibirem a ligação de IL-8 a neutrófilos contendo receptores de IL-8. Para os ensaios de inibição, os neutrófilos foram isolados como se descreveu no Exemplo 1. Os ensaios de inibição foram realizados misturando primeiramente alíquotas separadas de neutrófilos, numa concentração de  $1 \times 10^7$  células/ml, com 50  $\mu\text{g/ml}$  de fragmentos Fab de anticorpos anti-Pep-1 e anti-Pep-3, purificados por imuno-afinidade, para formar misturas anticorpo-célula. Os fragmentos Fab foram preparados como se descreveu no passo (1) anterior. Neste ensaio testaram-se também o anti-IL-8 e um anticorpo de controlo, anti-11-29. As misturas resultantes foram mantidas, durante 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , antes da adição de aproximadamente 10  $\mu\text{l}$  de  $^{125}\text{I}$ -IL-8, a 40 000 cpm, preparada como se descreveu no Exemplo 5A. As misturas contendo IL-8 foram depois mantidas durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , para permitir que a IL-8 se ligue aos receptores da IL-8 em neutrófilos, se o local de ligação de receptor da IL-8 não estivesse bloqueado pelos anticorpos testados.

As células foram depois centrifugadas, através de uma mistura de óleos de silício, durante 15 minutos, como se descreveu no Exemplo 5A. A radioactividade no sobrenadante resultante e no se-

dimento foi depois medida por detecção gama.

A ligação específica, associada a células, da IL-8 aos neutrófilos, foi calculada como se descreveu no Exemplo 5A, com a excepção de se ter usado um excesso molar de 200 vezes de IL-8 não marcada para calcular a ligação não específica. A percentagem de inibição foi depois determinada pelo cálculo da diferença entre a ligação específica associada às células na presença e na ausência de anticorpos adicionados.

Na Figura 3 mostram-se os resultados dos ensaios de inibição, nos quais ambos os anticorpos anti-IL-8 e anti-Pep-1 inibiram completamente a ligação da IL-8 iodada aos receptores de IL-8 em neutrófilos. O anticorpo anti-Pep-3 era aproximadamente 100% eficaz. Não se observou inibição com o anticorpo de controlo, 11-29. Os resultados indicaram que os anticorpos policlonais purificados por imunoafinidade, Pep-1 e Pep-3, dirigidos contra a sequência de resíduos de aminoácido 50-67 e contra a sequência de resíduos de aminoácido 3-20, respectivamente, da IL-8, eram ambos eficazes na ligação ao local activo da IL-8, evitando, deste modo, a ligação da IL-8 aos receptores da IL-8 em neutrófilos.

### (3) Anticorpos Monoclonais anti-Pep-1

Os anticorpos monoclonais anti-Pep-1 purificados, preparados no Exemplo 4, foram também avaliados como inibidores competitivos da ligação da  $^{125}\text{I}$ -IL-8, no local de interacção de receptor da IL-8 em neutrófilos, em ensaios realizados como se descreveu para os anticorpos policlonais.

### 6. Inibição da Activação de Neutrófilos com Anticorpos de Polipéptido Sintético Relacionado com a IL-8

#### A. Anticorpos policlonais anti-Pep-1

Os anticorpos policlonais anti-Pep-1, preparados no Exemplo 3, foram avaliados pela sua capacidade em inibirem a activação de neutrófilos, medida pela mobilização de cálcio realizada como no Exemplo 2.A.(2). O Pep-1, preparado no Exemplo 1, foi misturado com anticorpos policlonais anti-Pep-1, para formar uma mistura de imuno-reacção de péptido como se descreveu no Exemplo 5A. Mistu-

rou-se uma alíquota de neutrófilos isolados exprimindo o receptor da IL-8, preparada no Exemplo 1, com a mistura Pep-1/anti-Pep-1, e manteve-se como se descreveu no Exemplo 2.A.(2). A mistura foi submetida a fluorometria para medição de mobilização de cálcio, realizada como se descreveu no Exemplo 2.A.(2).

Os anticorpos policlonais anti-Pep-1 inibiram a mobilização do cálcio induzido pelo Pep-1, tal como se mostra na Figura 1. Os resultados indicam que os anticorpos policlonais dirigidos contra a sequência de resíduos de aminoácido 50-67 da IL-8, Pep-1, são eficazes na ligação ao local activo da IL-8, evitando deste modo, a ligação da IL-8 ao local de interacção de receptor da IL-8 em neutrófilos e evitando a consequente activação de neutrófilos medida por mobilização de cálcio.

#### B. Anticorpos Monoclonais anti-Pep-1

Os anticorpos monoclonais anti-Pep-1 purificados, preparados no Exemplo 4, foram também avaliados pela sua capacidade em inibirem a activação de neutrófilos em ensaios de mobilização de cálcio. Os ensaios são realizados como se descreveu para os anticorpos policlonais no ponto A anterior.

Embora o presente invento tenha sido agora descrito em termos de certas concretizações preferidas, e exemplificado relativamente a estas concretizações, um perito na arte entenderá que se podem fazer várias modificações, variações, omissões e substituições, sem sair do espírito do presente invento. Deste modo, pretende-se que o presente invento seja apenas limitado pelo âmbito das reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de um análogo polipeptídico do local de interacção do receptor da interleucina-8 (IL-8), que interacciona com o receptor, possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Cis-Leu-Asp-Pro-Lis-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lis-Fe-Leu-Lis,

caracterizado por se adicionarem sequencialmente os resíduos de aminoácido à cadeia peptídica em crescimento, estando o terminal amino ou o terminal carboxilo protegido com um grupo protector selectivamente removível, adequado, até se ter preparado o análogo polipeptídico desejado.

2 - Processo de preparação de um anticorpo monoclonal que imunorreage com o local de interacção do receptor de IL-8 e com um análogo de polipeptídico possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Cis-Leu-Asp-Pro-Lis-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lis-Fe-Leu-Lis,

caracterizado por se cultivar um hibridoma, obtido por fusão de uma célula de mieloma, ou de outra linha de células auto-perpetuadas, com uma célula produtora do anticorpo, num meio nutriente adequado, sob condições e por um período de tempo adequados para que o hibridoma segregue as moléculas de anticorpo para o meio, recolha do meio contendo o anticorpo e isolamento do anticorpo.

3 - Processo para a detecção da presença de IL-8 num fluido corporal, caracterizado por compreender os passos de:

(a) misturar uma alíquota de fluido corporal com uma composição de anticorpo que imunorreage com um segmento do terminal carboxi de IL-8 possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Cis-Leu-Asp-Pro-Lis-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lis-Fe-Leu-Lis,

(b) manter a referida mistura de imunorreacção sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo suficiente

para formar um produto de imunorreacção;

e

(c) detectar a presença do referido produto de imunorreacção e assim a presença de IL-8.

4 - Processo de produção de um sistema de diagnóstico sob a forma de conjunto de diagnóstico para determinação da presença de um local de interacção com o receptor de IL-8, caracterizado por se embalar, numa quantidade suficiente para realizar pelo menos uma determinação:

(a) um anticorpo que compreende uma molécula de anticorpo que imunorreage com um segmento do terminal carboxi de IL-8 possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Cis-Leu-Asp-Pro-Lis-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lis-Fe-Leu-Lis,

(b) um marcador para indicação da presença de moléculas de anticorpo no produto de imunorreacção formado.

5 - Processo de preparação de uma composição terapêutica adequada para a prevenção de inflamações, caracterizado por se associar um anticorpo que imunorreage com (a) o local de IL-8 que interaccua com o receptor e (b) um análogo de polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Cis-Leu-Asp-Pro-Lis-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-Lis-Fe-Leu-Lis,

ou seus equivalentes biológicos, com um excipiente farmacêuticamente aceitável.

6 - Processo de preparação de um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

LisGluLeuArgCisGlnCisIleLisThrTirSerLisProFeHisProHis caracterizado por se adicionarem sequencialmente os resíduos de aminoácido à cadeia peptídica em crescimento, estando o terminal amino ou o terminal carboxilo protegido com um grupo protector selectivamente removível, adequado, até se ter preparado o análogo polipeptídico desejado.

7 - Processo de preparação de um anticorpo monoclonal que imunorreage com IL-8 e com um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

LisGluLeuArgCisGlnCisIleLisThrTirSerLisProFeHisProHis caracterizado por se cultivar um hibridoma, obtido por fusão de uma célula de mieloma, ou de outra linha de células auto-perpetuadas, com uma célula produtora do anticorpo, num meio nutriente adequado, sob condições e por um período de tempo adequados para que o hibridoma segregue as moléculas de anticorpo para o meio, recolha do meio contendo o anticorpo e isolamento do anticorpo.

8 - Processo para a detecção da presença de IL-8 numa amostra de fluido corporal, caracterizado por compreender os passos de:

(a) misturar uma alíquota de fluido corporal com um anticorpo que imunorreage com um segmento do terminal amino de IL-8 possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

LisGluLeuArgCisGlnCisIleLisThrTirSerLisProFeHisProHis para formar uma mistura de imunorreacção;

(b) manter a referida mistura de imunorreacção sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção;

e

(c) detectar a presença do referido produto de imunorreacção e assim a presença de IL-8.

9 - Processo de produção de um sistema de diagnóstico sob a forma de conjunto de diagnóstico para determinação da presença de IL-8 numa amostra, caracterizado por se embalar, numa quantidade suficiente para realizar pelo menos uma determinação:

(a) um anticorpo que compreende uma molécula de anticorpo que imunorreage com um segmento do terminal amino de IL-8 possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

LisGluLeuArgCisGlnCisIleLisThrTirSerLisProFeHisProHis, e

(b) um marcador para indicação da presença de moléculas

de anticorpo no produto de imunorreacção formado.

10 - Processo de preparação de uma composição terapêutica adequada para a prevenção de inflamações, caracterizado por se associar um anticorpo que imunorreage com (a) IL-8 e (b) um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

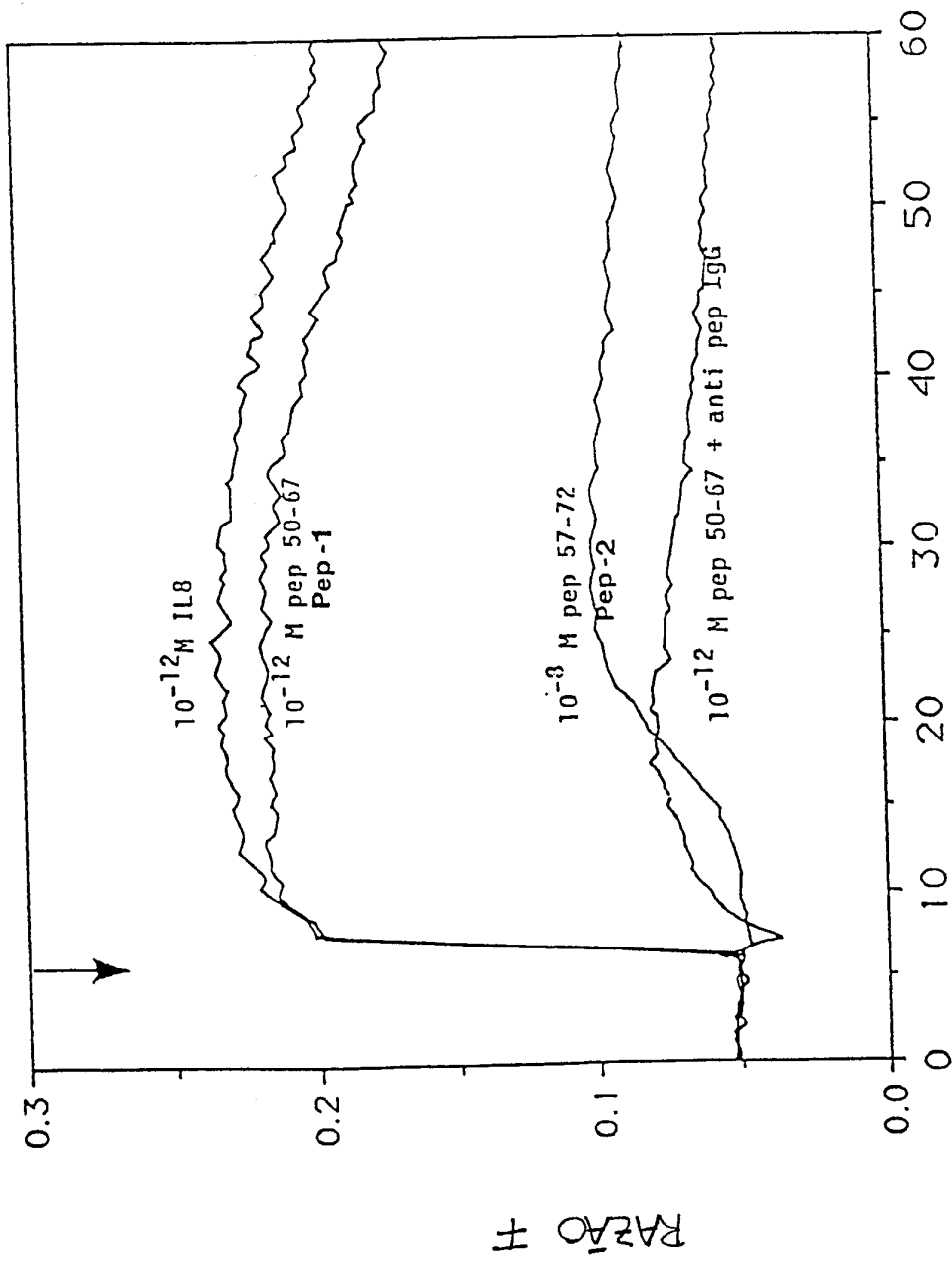
LisGluLeuArgCisGlnCisIleLisThrTirSerLisProFeHisProHis  
ou seus equivalentes biológicos, com um excipiente farmacêutica-  
mente aceitável.

Lisboa, 11. SET 1991

Por THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE

=O AGENTE OFICIAL=

ADJUNTO  
*António Vissana Coelho*



TEMPO (seg) FIGURA 1

100  
100

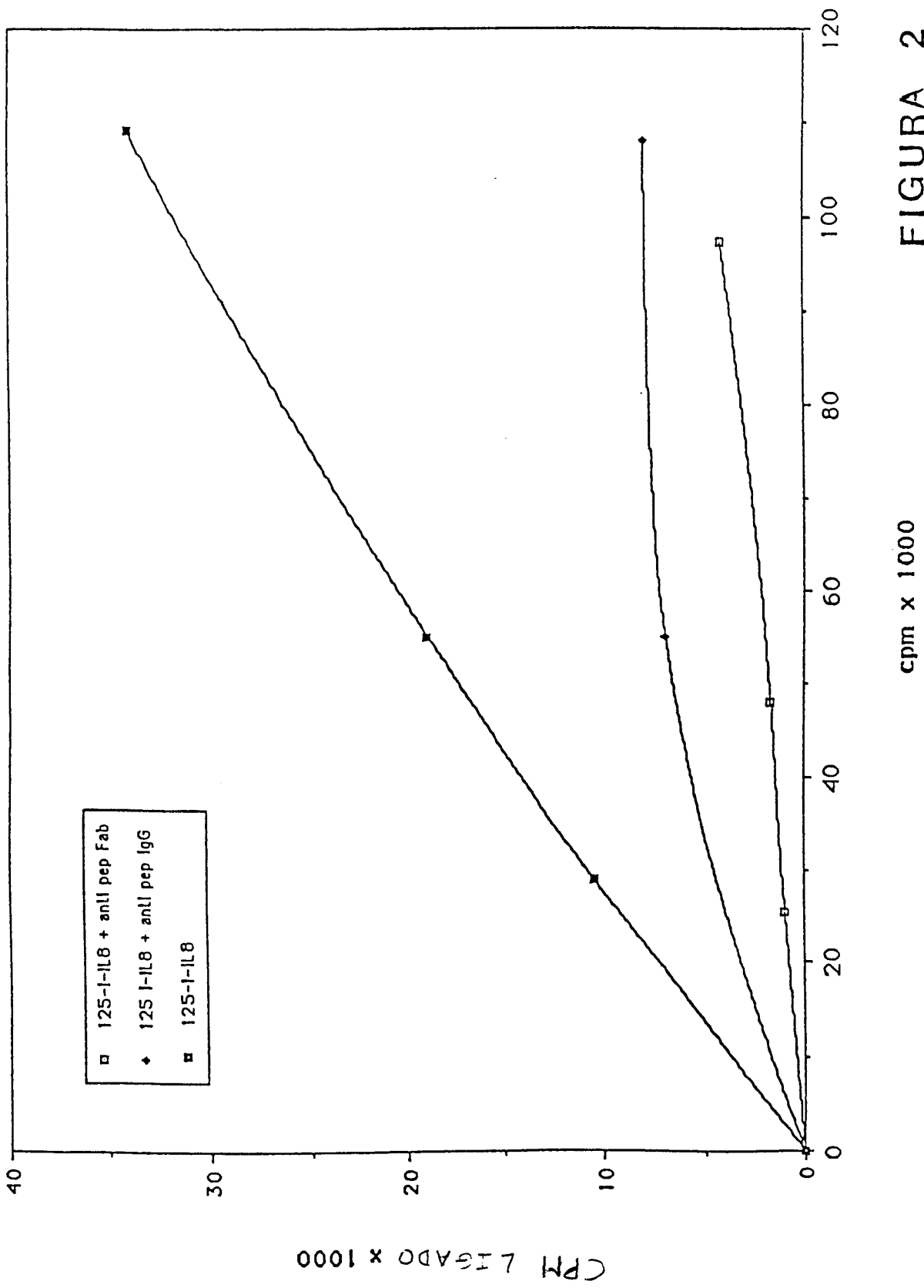


FIGURA 2

INIBIÇÃO DE ANTICORPOS DA LIGAÇÃO DE <sup>125</sup>I-IL-8  
A PMN

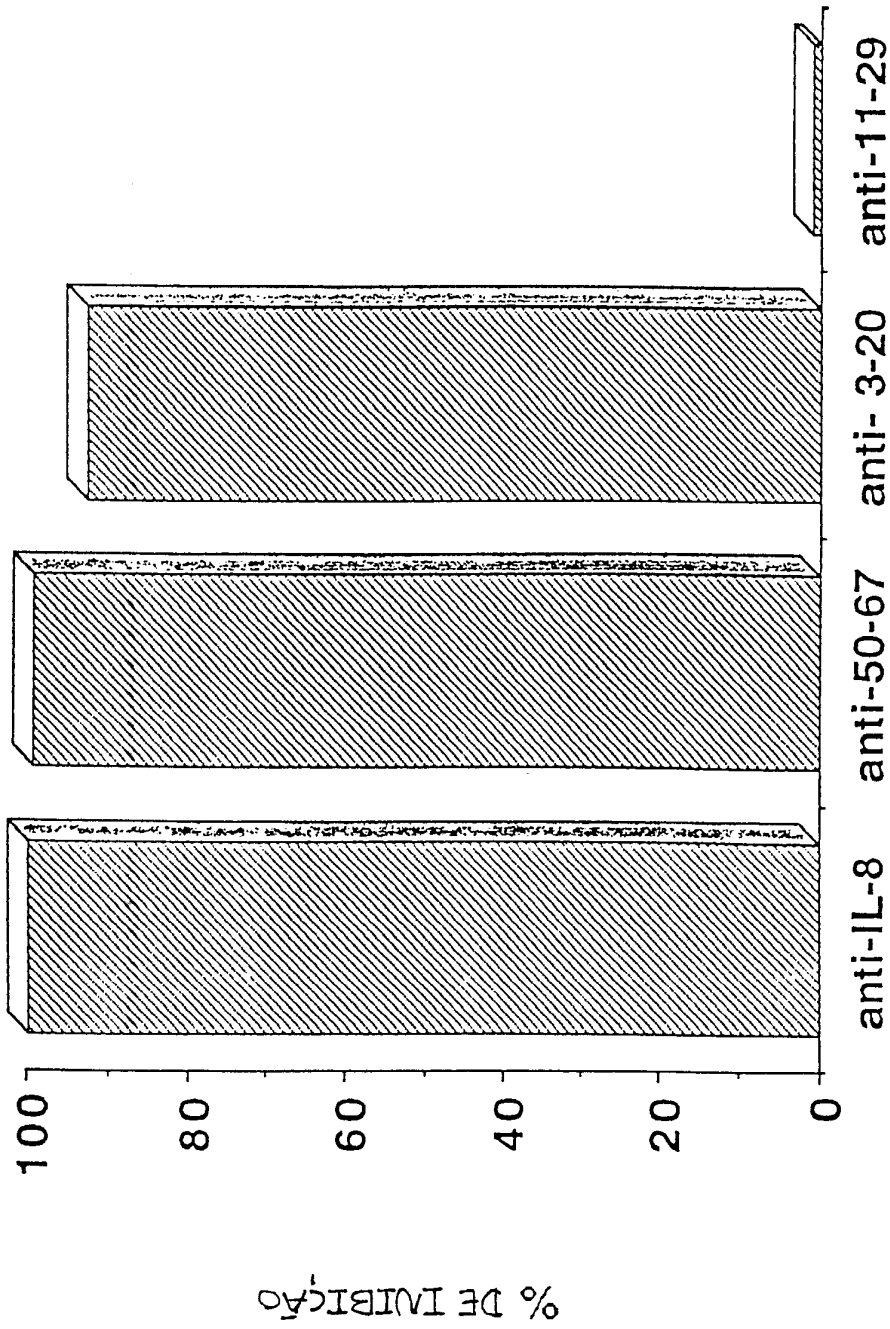


FIGURA 3