



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0711589-0 A2**

(22) Data de Depósito: 16/05/2007  
(43) Data da Publicação: 16/11/2011  
(RPI 2132)



(51) *Int.Cl.:*  
C12N 15/19  
A61K 38/19  
C07K 14/52  
C12N 7/01

(54) **Título:** ANTAGONISTAS DE ALTA AFINIDADE DE QUIMIOCINAS ELR-CXC

(30) **Prioridade Unionista:** 16/05/2006 US 60/800.406

(73) **Titular(es):** University Of Saskatchewan

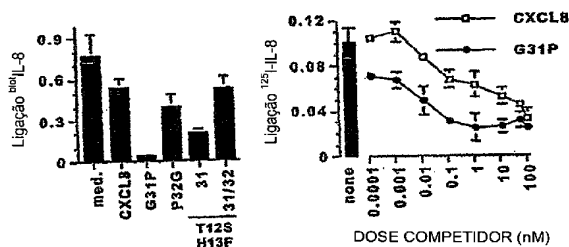
(72) **Inventor(es):** John R. Gordon

(74) **Procurador(es):** Alexandre Ferreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT CA2007000848 de 16/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/131352de 22/11/2007

(57) **Resumo:** ANTAGONISTAS DE ALTA AFINIDADE DE QUIMIOCINAS ELR-CXC. A presente invenção fornece novas seqüências de polipeptídeo, métodos para sua produção e seu uso para novos agonistas e antagonistas do receptor de quimiocina ELR-CXC.



# “ANTAGONISTAS DE ALTA AFINIDADE DE QUIMIOCINAS ELR-CXC”

## Campo da Invenção

A presente invenção está relacionada ao campo dos antagonistas do receptor de quimiocina CXC.

## 5 Fundamentos da Invenção

As quimiocinas CXC que possuem o motivo (ELR) receptor-sinalizador ácido glutâmico-leucina-arginina (por exemplo, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8; Baggiolini, M. 1998. Nature. 392:565-568) são importante para o influxo das células inflamatórias que mediam muitas das patologias nos múltiplos cenários, incluindo dano por isquemia-reperfusão (Sekido, N. et al. 1993. Nature. 365:654-657; Villard, J. et al. 1995. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152: 1549-1554), síndrome de sofrimento respiratório agudo induzido por endotoxemia (ARDS; Mukaida, N. et al. 1998. Inflamm. Res. 47 suppl. 3):S151-157), artrite, e glomerulonefrite do tipo imuno complexo (Harada, A. et al. 1996. Inflamm. Res. 2:482-489). Por exemplo, enzimas hidrolíticas inapropriadamente liberadas e espécies oxigênio reativas provenientes de neutrófilos ativados iniciam e/ou perpetuam os processos patológicos. Por outro lado, durante a maioria das infecções bacterianas essa resposta quimiocina representa uma primeira linha crítica de defesa. Mas ainda aqui, as respostas das quimiocinas ELR<sup>+</sup> CXC, por meio de suas capacidades para ativar células inflamatórias que revelam os receptores CXCR1 e CXCR2, exacerbam a patologia. Por exemplo, durante a sepse de “punção cecal e ligadura”, a neutralização de MIP-2 reduzem a mortalidade em ratos de 85 para 38% (Walley, K. R. et al. 1997. Infect. Immun. 65:3847-3851). E tratamentos experimentais que eliminam a circulação de neutrófilos melhoram a patologia de maneiomiose pneumônica (Slocombe, R. et al. 1985. Am. J. Vet. Res. 46:2253), em que a expressão da CXCL8 nas vias respiratórias influencia de forma variada a quimioatração neutrofílica. Caswell, J. L. et al. 1997. Vet. Pathol. 35: 124-131 ; Caswell, J. L. et al. 2001. Canad. J. Vet. Res. 65:229-232). A despeito da importância crítica dessas respostas quimiocinas em muitos cenários, as respostas descontroladas das células inflamatórias são suficientemente prejudiciais ao ponto de que o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas com as quais se possa bloquear as quimiocinas ELR<sup>+</sup> tem se tornado uma prioridade nas pesquisas (Baggiolini, M., and B. Moser. 1997. J. Exp. Med. 186: 1189-1191).

As quimiocinas ELR<sup>+</sup> quimioatraem e ativam as células inflamatórias por meio de seus receptores CXCR1 e CXCR2 (Baggiolini, 1998; Ahuja, S. K., and P. M. Murphy. 1996. J. Biol. Chem. 271 :20545-20550). A maioria dos mamíferos expressam ortólogos (genes em diferentes espécies que evoluíram a partir de um gene ancestral comum por evolução gradual) dos receptores CXCR1 e CXCR2 e das quimiocinas ‘ELR’. A similaridade das seqüências entre esse genes homólogos (geneticamente ou funcionalmente relacionados) é alta; mais alta ainda quando são consideradas substituições aminoácidos conservados. Ratos e

camundongos são exceções onde essas espécies não possuem genes CXCR1 e o equivalente CXCL8 deles é altamente divergente daquele de outros mamíferos. A Interleucina 8 (CXCL8) não é espécie específica, pelo fato de que a proteína CXCL8 proveniente de uma espécie pode ser funcional numa outra espécie (Rot, 1991, Cytokine 3: 21-27).

5 A CXCR1 é específica para CXCL8 e proteína-2 CXCL6/granulócito quimiotática (GCP-2), enquanto que a CXCR2 se liga a CXCL8 com alta afinidade, mas também a proteína-2 macrófago inflamatória (MIP-2), CXCL1, CXCL5/ENA-78, e CXCL6 com afinidades um tanto mais baixas (ver, por exemplo, Baggiolini and Moser, 1997). A sinalização de CXCL8 em linhagens de células transfectadas com o CXCR1 ou CXCR2 humano induz respostas  
10 quimiotáticas equipotentes (Wuyts, A. et al. 1998. Eur. J. Biochem. 255:67-73; Richardson, R. et al. 1998. J. Biol. Chem. 273:23830 - 23836), e embora as alterações do neutrófilo citossólico livre de  $Ca^{++}$  e a desgranulação celular em resposta a CXCL8 sejam também mediadas por ambos os receptores, a explosão respiratória e a ativação da fosfolipase D de acordo com o reportado dependem exclusivamente do CXCR1 (Jones, S. A. et al. 1996. Proc.  
15 Natl. Acad. Sci. U.S A. 93:6682-6686.). Por outro lado, foi reportado que um antagonista não peptídeo do CXCR2, mas não do CXCR1, antagoniza a quimiotaxia neutrofílica mediada por CXCL8, mas não a ativação celular (White, J. R. et al. 1998. J. Biol. Chem. 273: 10095-10098.). Finalmente, existe uma evidência abundante de que as quimiocinas são muito frequentemente expressas de modo redundante durante as respostas inflamatórias (ver, por exemplo, Caswell et al., 1997). Porém, a despeito da intensa pesquisa no campo, não são conhecidos antagonistas da quimiocina CXC na arte já existente que sejam eficazes em suprimir a atividade adversa das células inflamatórias induzida por um ou outro receptor de quimiocina ELR-CXC.

#### Sumário da Invenção

25 As composições da presente invenção incluem novos agonistas e antagonistas do receptor de quimiocina ELR-CXC que são capazes de se ligarem aos receptores de CXCR1 ou CXCR2 em células de mamíferos. Estes incluem agonistas e antagonistas capazes de ligações de alta afinidade, onde "alta afinidade" se refere a afinidade do agonista ou do antagonista quanto ao receptor que seja suficiente tal que ele seja capaz de bloquear agonista  
30 quimiocina em sua forma natural sob concentrações fisiologicamente relevantes. As novas proteínas antagonistas também incluem aquelas que sejam substancialmente equivalentes (isto é, aquelas que contenham substituições, adições e deleções que não deletam as funções ligantes a CXCR1 e CXCR2) a uma proteína CXCL8 naturalmente ocorrente em bovinos e/ou humanos (ilustrado aqui como as seqüências aminoácidos de SEQ ID NO:1 e SEQ  
35 ID NO:2) e também abrigam resíduos aminoácidos amino-terminais modificados juntamente com substituições de Lys1 com Arg e Gly31 com Pro (SEQ ID No. 6). Análogos desse CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P bovinos são também incluídos, ou seja CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P/P32G

(SEQ ID No. 7) e

CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/T12S/H13F/G3IP (SEQ ID No. 8).

Outras composições da invenção são os novos polinucleotídeos and polipeptídeos relacionados a estas proteínas. Em outras modalidades, são providas seqüências de nucleotídeos derivadas das seqüências aminoácidos. Também, a invenção inclui vetores que compreendem os novos polinucleotídeos, e vetores de expressão compreendendo os novos polinucleotídeos operativamente associados com seqüências regulatórias que controlam a expressão dos polinucleotídeos. De modo similar, fusões de genes que compreendam lidar com a afinidade e os novos polinucleotídeos estão inclusos na invenção, como são os vetores resultantes e vetores de expressão contendo tais fusões de genes.

A invenção também inclui hospedeiros produzidos por engenharia genética para conter os novos polinucleotídeos bem como hospedeiros produzidos por engenharia genética para conter os novos polinucleotídeos operativamente associados com seqüências regulatórias, isto é, associados com seqüências regulatórias em um modo tal que as seqüências regulatórias controlem a expressão dos novos polinucleotídeos.

Também inclusos estão hospedeiros contendo fusões de genes, sejam associados com seqüências regulatórias em um modo tal que as seqüências regulatórias controlem a expressão das fusões de genes, ou na ausência de tais seqüências regulatórias. Estes hospedeiros podem ser vírus ou células, onde as últimas mencionadas incluem, sem limitação, levedura, protozoa, fungos, algas, células de vegetais, e células animais e organismos superiores derivados destes mencionados.

A invenção adicionalmente compreende usos dos novos polipeptídios no tratamento de patologias mediadas pela quimiocina CXC envolvendo os receptores de CXCR1 ou CXCR2 em mamíferos. Do mesmo modo, a invenção inclui métodos de tratar patologias mediadas pela quimiocina ELR-CXC envolvendo os receptores de CXCR1 ou CXCR2, que compreende administrar ao mamífero afligido uma quantidade eficaz de um dos novos polipeptídeos. Composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade biologicamente ativa de um dos novos polipeptídios são também incluídas na invenção.

Métodos de produzir e de purificar os novos são também incluídos na invenção.

Em um aspecto da invenção, é provido um polipeptídio purificado ou isolado possuindo ou compreendendo uma seqüência aminoácido de:

XELRCXCIRX XSXPFXPKXI XEXXXIXSPP HCCNXEIVK LXXGXEXCLX  
PXXXWVQXXV XXFXKXXEXX XX (SEQ ID NO. 3), em que X é qualquer aminoácido.

Em uma outra modalidade da invenção, é provido um polipeptídio isolado ou purificado compreendendo uma seqüência aminoácido de:

X<sub>1</sub>ELRCXCIRX XSXPFXPKXI XEXXXIXSPP HCCNXEHVK LXXGXEXCLX

PXXXWVQXXV XXFXKXXEXX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>

onde X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> e X<sub>4</sub> são independentemente resíduos de aminoácidos 0 - 10 e X é qualquer aminoácido.

Em uma outra modalidade da invenção, é provido um polipeptídeo isolado ou purificado compreendendo uma sequência aminoácido de: X<sub>1</sub>ELRCX<sub>6</sub>CIRX<sub>10</sub> XnS-Xi<sub>3</sub>PFX<sub>16</sub>PKX<sub>19</sub>I X<sub>21</sub>EX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>IX<sub>27</sub>SPP

HCX<sub>33</sub>NX<sub>35</sub>EIIVK LX<sub>42</sub>X<sub>43</sub>GX<sub>45</sub>EX<sub>47</sub>CLX<sub>50</sub> PX<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub>WVQX<sub>58</sub>X<sub>59</sub>V

X<sub>61</sub>X<sub>62</sub>FX<sub>64</sub>KX<sub>66</sub>X<sub>6</sub>VEX<sub>69</sub>X<sub>7</sub>OXT<sub>1</sub>XV<sub>2</sub> (SEQ ID No. 4 consenso definido) onde

X<sub>1</sub> é aminoácidos 0 - 10;

10 X<sub>6</sub> é Q, E ou L;

X<sub>10</sub> é T ou I;

X<sub>11</sub> é H ou Y;

X<sub>13</sub> é T ou K;

X<sub>16</sub> é H ou N;

15 X<sub>19</sub> é F ou Y ou L;

X<sub>21</sub> é K ou R;

X<sub>23</sub> é L ou M;

X<sub>24</sub> é R ou T;

X<sub>25</sub> é V ou A;

20 X<sub>27</sub> é D ou E;

X<sub>33</sub> é V ou A ou E;

X<sub>35</sub> é T ou S;

X<sub>42</sub> é S ou V ou T ou F;

X<sub>43</sub> é D ou N;

25 X<sub>45</sub> é R ou A ou N ou K ou D;

X<sub>47</sub> é L ou V;

X<sub>50</sub> é D ou N;

X<sub>52</sub> é K ou H;

X<sub>53</sub> é E ou Q ou T;

30 X<sub>54</sub> é P ou N ou K;

X<sub>58</sub> é R ou K ou I;

X<sub>59</sub> é V ou I;

X<sub>64</sub> é L ou V;

X<sub>69</sub> é S ou N ou K ou G;

35 X<sub>70</sub> é Q ou S ou K ou deletado;

X<sub>71</sub> é N ou D ou deletado; e

X<sub>72</sub> é P ou A ou S ou deletado.

De acordo com um outro aspecto da invenção, é provido um peptídeo isolado consistindo essencialmente de uma seqüência aminoácido como apresentado em qualquer um dos seguintes:

GSTELRCQC IRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCEN  
 5 EIVKLTLDGRELCLDPKENWVQR  
 VVEKFLKRAENS (bhG31P - SEQ ID No. 10);  
 KELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIE  
 PPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVV EKFLKRAENS (hG31P (0) - SEQ ID No.  
 11);  
 10 ELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIES  
 PHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVVE  
 KFLKRAENS (hG31P (-1) - SEQ ID No. 12);  
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRV  
 ESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR  
 15 VVEKFLKRAENS (hG31P (+2) - SEQ ID No. 13);  
 GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKEN  
 WVQRVVEKFLKRAENS (hG31P (+6) - SEQ ID No. 14);  
 GSTELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWV  
 QR  
 20 VVEKFLKRAENS (hG31P K3T - SEQ ID No. 15);  
 GSKELRCQCIRTHSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENW  
 VQR VVEKFLKRAENS (hG31P Y13H - SEQ ID No. 16);  
 GSKELRCQCIRTYSTPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWV  
 QR  
 25 VVEKFLKRAENS (hG31P K15T (0) - SEQ ID No. 17);  
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWV  
 QR  
 VVEKFLKRAENS (hG31P A35E(0) - SEQ ID No. 18);  
 GSKELRCQC  
 30 IRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANSEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR  
 VVEKFLKRAENS (hG31P T37S (0) - SEQ ID No. 19);  
 GSKELRCQC  
 IRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLTLDGRELCLDPKENWVQR VVEKFLKRAENS  
 (hG31P S44T (0) - SEQ ID No. 20);  
 35 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGDELCLDPKENWV  
 QR  
 VVEKFLKRAENS (hG31P R47D (0) - SEQ ID No. 21);

GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKEKWV  
 QR  
 VVEKFLKRAENS (hG31P N56K(0) - SEQ ID No. 22);  
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKENWVQK  
 5 VVEKFLKRAENS (hG31P R60K (0) - SEQ ID No. 23);  
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKENWV  
 QR  
 VVEVFLKRAENS (hG31P K64V (0) - SEQ ID No. 24);  
 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGREVCLDPKENW  
 10 VQR VVEKFLKRAENS (hG31P L49V - SEQ ID No. 25);  
 GSKELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWV  
 QR  
 VVEKFLKRAENS (bhG31P T3K- SEQ ID No. 26);  
 GSTELRCQCIRTYSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWV  
 15 QR  
 VVEKFLKRAENS (bhG31P H13Y - SEQ ID No. 27);  
 GSTELRCQCIRTHSKPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWVQR  
 VVEKFLKRAENS (bhG31P T15K - SEQ ID No. 28);  
 GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCANSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWV  
 20 QR  
 VVEKFLKRAENS (bhG31P E35A - SEQ ID No. 29);  
 GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENTEIIVKLTDGRELCCLDPKENWV  
 QR VVEKFLKRAENS (bhG31P S37T - SEQ ID No. 30);  
 GSMGGSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPK  
 25 EN  
 WVQRVVEKFLKRAENS (bhG31P (+6) - SEQ ID No. 31);  
 GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWV  
 QR  
 VVEKFLKRAENS (bhG31P (+2) - SEQ ID No. 32);  
 30 TELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWVQRVV  
 EKFLKRAENS (bhG31P (+0) - SEQ ID No. 33);  
 ELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWVQR  
 VVE  
 KFLKRAENS (bhG31P (-1) - SEQ ID No. 34);  
 35 GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDP  
 KEN  
 WVQRVVEKFLKRAENS (hK11R (+6) - SEQ ID No. 35);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIK  
LRVIESPPHCENTEIIVKLSDGRELCLDPKEN

WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P A35E(+6) - SEQ ID No. 36);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANSEIIVKLSDGRELCLDPKEN

5 WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P T37S (+6) - SEQ ID No. 37);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLTGDRELCLDPK

EN

WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P S44T (+6) - SEQ ID No. 38);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGDELCLDP

10 KEN WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P R47D (+6) - SEQ ID No. 39);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGREVCLDP

KEN

WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P L49V - SEQ ID No. 40);

GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTNGNEVCLNPKEKWV

15 QK

VVQVFVKRAEKQDP (Bovino 3-74 K11RG31P (+2)- SEQ ID No. 41).

De acordo com um aspecto adicional, é provida uma seqüência polinucleotídeo isolada compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma seqüência aminoácido de:

20  $X_1$ ELRCXCIRX XSXPFXPKXI XEXXXIXSPP HCNXNxEIIVK LXXGXEXCLX

PXXXWVQXXV XXFXKXXEXX $X_2X_3X_4$  onde  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  e  $X_4$  são independentemente resíduos de aminoácidos 0 - 10 e X é qualquer aminoácido.

De acordo com um aspecto adicional da invenção, é provida uma seqüência polinucleotídeo isolada que codifica uma seqüência aminoácido de:

25  $X_1$ ELRCX $X_6$ CIRX $X_{10}$   $X_{11}$ SX $X_{13}$ PFX $X_{16}$ PKX $X_{19}$ I  $X_2$ IX $X_{23}X_{24}X_{25}$ IX $X_{27}$ SPP HCNX $X_{33}$ NX $X_{35}$ EIIVK  
LX $X_{42}X_{43}$ GX $X_{45}$ EX $X_{47}$ CLX $X_{50}$  PX $X_{52}X_{53}X_{54}$ WVQX $X_{58}X_{59}$ V

$X_{61}X_{62}FX_{64}KX_{66}X_{67}EX_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$  (SEQ ID NO. 4)

onde

$X_1$  é aminoácidos 0 - 10;

30  $X_6$  é Q, E ou L;

$X_{10}$  é T ou I;

$X_{11}$  é H ou Y;

$X_{13}$  é T ou K;

$X_{16}$  é H ou N;

35  $X_{19}$  é F ou Y ou L;

$X_{21}$  é K ou R;

$X_{24}$  é R ou T;

$X_{25}$  é V ou A;  
 $X_{27}$  é D ou E;  
 $X_{33}$  é V ou A ou E;  
 $X_{35}$  é T ou S;  
 $X_{42}$  é S ou V ou T ou F;  
 $X_{43}$  é D ou N;  
 $X_{45}$  é R ou A ou N ou K ou D;  
 $X_{47}$  é L ou V;  
 $X_{52}$  é K ou H;  
 $X_{53}$  é E ou Q ou T;  
 $X_{54}$  é P ou N ou K;  
 $X_{58}$  é R ou K ou I;  
 $X_{62}$  é K ou I ou V ou A;  
 $X_{64}$  é L ou V;  
 $X_{66}$  é R ou K;  
 $X_{67}$  é A ou T; G;  
 $X_{70}$  é Q ou S ou K ou deletado;  
 $X_{71}$  é N ou D ou deletado; e  
 $X_{72}$  é P ou A ou S ou deletado.

5

10

15

20

De acordo com um aspecto adicional da invenção, é provido um polinucleotídeo isolado consistindo essencialmente de uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma seqüência aminoácido como apresentada em qualquer uma de SEQ ID No. 10-41.

Em um outro aspecto da invenção, é provida uma célula transgênica compreendendo um polinucleotídeo como descrito acima. O polinucleotídeo pode ser não natural.

25

Em um outro aspecto da invenção, é provido um hospedeiro viral produzido por engenharia genética para compreender um polinucleotídeo como descrito acima.

Em um aspecto adicional da invenção, é provido um vetor de expressão que compreende o polinucleotídeo como descrito acima operativamente ligado a uma seqüência regulatória que controla a expressão do referido polinucleotídeo em um hospedeiro adequado.

30

Em ainda um aspecto adicional da invenção, é provida uma célula hospedeira que compreende o vetor de expressão descrito acima.

Em um outro aspecto da invenção, é provido o uso do peptídeo como descrito acima na fabricação de um medicamento para tratar uma patologia mediada pela quimiocina CXC.

35

Em um outro aspecto da invenção, é provido um método de tratar uma patologia mediada pela quimiocina CXC compreendendo administrar a um indivíduo com necessidade de tal tratamento uma quantidade eficaz de um peptídeo como descrito acima.

### Breve Descrição das Figuras

Figura 1. o análogo G31 P de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R é um potente inibidor da ligação de CXCL8 aos neutrófilos do sangue periférico. Neutrófilos do sangue periférico bovino (pureza 87-93%) foram (anel superior) expostos a 4 °C por 2 h a análogos de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R (10 ng/mL) ou meio (med) sozinho, então lavado e similarmente incubados com CXCL8 biotinilados (<sup>biot</sup>CXCL8; 1000 ng/mL ou 129 nM). Esses níveis de CXCL8 aproximados daqueles encontrados nos tecidos pulmonares de animais com pasteurelose pneumônica (ref. 8, 9). Os níveis de <sup>biot</sup>CXCL8 ligantes às células foram determinados usando tecnologia ELISA. Tais substituições aminoácidos descritas contidas em CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R incluiu: G31P; P32G; T12S/H13P/G31P; and T12S/H13P/G31P/P32G. O análogo G31P, mas não o análogo P32G foi um antagonista altamente eficaz de CXCL8 ligante às células. Com ambos os análogos G31P e P32G, as substituições adicionais de T12S e H13F reduziram suas atividades antagonistas a CXCL8 (painel inferior). Os neutrófilos foram expostos simultaneamente por 45 minutos a 4 °C a concentrações variadas de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P ou não marcado CXCL8 e 20 pM <sup>125</sup>I-CXCL8. Esse nível de <sup>125</sup>I-CXCL8 foi escolhido como próximo da saturação quanto aos receptores CXCL8 de alta afinidade das células (dados não mostrados). Os níveis de <sup>125</sup>I-CXCL8 associados a célula foram avaliados usando um contador. Os dados indicam claramente que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P tiveram uma afinidade substancialmente maior para os neutrófilos que CXCL8.

FIG. 2. CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P não é um agonista das respostas da quimioatração neutrofílica ou liberações glicuronidase. CXCL8 e os análogos G31P, P32G, ou análogos combinados G31P/P32G de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R foram testados quanto às suas atividades agonistas neutrofílicas, utilizando neutrófilos do sangue periférico bovino recém purificados (painel superior) as respostas quimiotáticas para cada proteína foram testadas em ensaios de microquimiotaxia por 30 minutos e os resultados expressos como o número médio (+/-) SEM de células/campo microscópico com objetiva 40x, como delineado na seção métodos. Ambos os análogos G31P e G31P/P32G apresentaram pouca atividade quimiotática dissimulada, enquanto que o análogo P32G estimulou respostas substanciais a 100 ng/mL. (painel inferior). Os neutrófilos foram expostos a doses variadas de cada análogo por 30 minutos, e em seguida os produtos de secreção foram ensaiados quanto a glicuronidase usando o substrato quimiogênico p-nitrofenil-D-glicuronida, como apresentado na seção de métodos. Os armazenados celulares totais glicuronidase foram determinados a partir de alíquotas de células lisadas com Triton-X-100. A liberação enzimática com cada tratamento é expressa como o percentual dos armazenados celulares totais. Nenhum dos análogos tiveram substancial atividade agonista, embora a CXCL8 propriamente não induzisse significativa liberação enzimática. O controle positivo do tratamento com phorbol-12,13-miristato acetato e ionóforo de cálcio A23187 induziu liberação enzimática de 42 +/- 6%.

FIG. 3. CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R-G31P é um altamente eficaz antagonista da quimioatração neutrofílica mediada por quimiocina ELR-CXC. A capacidade de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P para bloquear respostas quimiotáticas de neutrófilos bovinos para diversas quimiocinas ELR-CXC foi medida usando ensaios de microquimiotaxia de 20 minutos, (painel esquerdo). As células foram simultaneamente expostas a CXCL8 (1  $\mu$ g/mL) e variadas concentrações do análogo. O número de células que responderam a CXCL8 foi avaliado mediante contagem direta das membranas do ensaio de quimiotaxia, como na Figura 2. CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P foi um inibidor competitivo altamente eficaz das respostas das células a CXCL8. (painel intermediário) curvas dose-resposta para a quimioatração de neutrófilos bovinos por CXCL1, CXCL5, ou CXCL8 humanos. Cada quimiocina apresentou um padrão bifásico de atividade, com máxima a 1-10 ng/mL e a 1  $\mu$ g/mL. (painel direito). A capacidade de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P para bloquear as respostas celulares a 1 ng/mL de CXCL5 ou CXCL1 humano ou 10 ng/mL de CXCL8 humano foi avaliada como acima. CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P antagonizou eficazmente cada quimiocina ELR-CXC, com a completa inibição sendo conseguida de 3-20 nM CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P.

FIG. 4. CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R-G31P bloqueia as atividades de quimioatraentes CXCL8 e não-CXCL8 expressas dentro das vias respiratórias pneumônicas ou em mastite induzida por endotoxina. Os efeitos do anticorpo monoclonal anti-IL8 8B6 ou CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R-G31P sobre as respostas neutrofílicas aos quimioatraentes expressos dentro das vias respiratórias dos animais com pasteurelose pneumônica ou em cavidade mamária de gado com mastite induzida por endotoxina foram avaliados como na Figura (3). (A) fluidos de lavagem bronquialveolar diluídos (1:10) (BALF) provenientes de lóbulos lesionais pulmonares de gado pneumônico (PNEUMONIA) ou lavagem da cavidade dos mamilos de gado com mastite (MASTITE) foram testadas como apresentadas (nenhum) ou após tratamento com um ou outro de anti-CXCL8 MAb 8B6 (5  $\mu$ g/mL) ou CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P (G31P; 1 ou 10 ng/mL) quanto suas atividades quimiotáticas comparado ao meio sozinho. Com ambas as amostras, os anticorpos Mab 8B6 por si só neutralizaram 74% das atividades quimiotáticas nas amostras, enquanto que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P reduziram as respostas em 93-97%. (B) A fim de confirmar esses resultados usando uma estratégia alternativa, fluidos lesionais BAL foram absorvidos com matrizes de imunoafinidade com anticorpo monoclonal 8B6, removendo >99% de seu conteúdo de CXCL8, em seguida testadas ambas suas atividades quimiotáticas residuais e uma capacidade de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P para antagonizar essas atividades quimiotáticas não-CXCL8 residuais. Houve uma inibição dose-dependente das atividades quimiotáticas total e residual nas amostras, indicando que ambos os quimioatraentes CXCL8 e não-CXCL8 são expressos nessas lesões.

Figura 5. CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R-G31P pode extirpar respostas inflamatórias endotoxina-induzidas in vivo. Bezerros Holstein de duas semanas de idade foram testados quanto às

suas respostas inflamatórias neutrofílicas à provocação de endotoxina intradérmica (1  $\mu$ -g/local) antes e em diversos momentos após a injeção intravenosa (i.v.), subcutânea (subcutan.), ou intramuscular (i.m.) de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R-G31P (75  $\mu$ g/kg). Biópsias dos locais de reação endotoxina com quinze horas foram obtidas a 0, 16, 48 e 72 h pós-tratamento e processadas quanto a avaliação histopatológica da resposta neutrofílica, como determinado pela contagem dos número de neutrófilos em nove campos microscópico com objetiva 40x por seção (painel esquerdo). Fotomicrografias das respostas teciduais da provocação por endotoxina nas proximidades de vasos sangüíneos contidos no reticular dérmico antes de ((0 h) e 48 h pós tratamento. Grande quantidade de neutrófilos se acumulou em torno da vasculatura dentro da derme reticular nos tecidos pré-, porém não pós-tratamento. (B) Apresentação gráfica das respostas neutrofílicas à provocação endotoxina ou antes (0 h) ou após (16, 48, 72 h) a aplicação de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R-G31P por meio de cada rota. \*\* ou \*\*\*=p 0,01 ou 0,001, respectivamente, relativamente às respostas do pré-tratamento do controle interno.

Figura 6. Eosinófilos purificados provenientes do sangue de doadores atópicos asmáticos e atópicos não asmáticos (painéis esquerdos) ou um indivíduo com hipereosinofilia (painel direito) foram avaliados quanto as suas respostas ao recombinante humano CXCL8, CXCL5, ou CCL11, em presença ou ausência das doses indicadas de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P (G31P) recombinante bovino. Baixas doses de G31P foram capazes de bloquear as respostas dessas células a cada um dos ligandos CXCR1 e CXCR2, mas não teve efeito sobre as respostas dos eosinófilos relativamente ao ligando CCR3 não correlato CCL11/eotaxina.

Figura 7. Neutrófilos provenientes do sangue periférico de um doador saudável foram testados quanto às suas respostas ao CXCL8 ou CXCL5 recombinante humano em presença ou ausência de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P (G31P; 10 ng/mL) bovino. O G31P bloqueou as respostas neutrofílicas a ambos os ligandos.

Figura 8. Caracterização física de isoformas de hbG31P.

Figura 9. Comparação de bG31P e hbG31P (antagonismo CXCL8).

Figura 10A. Análogos hbG31P não são agonistas neutrofílicos.

Figura 10B. Atividade do antagonista hbG31P.

Figura 11. Efeito da seqüência carbóxi-terminal de hbG31P sobre suas atividades antagonistas.

Figura 12. Agonista e análogos CXCL8 - atividades dos construtos.

Figura 13. Comparação das atividades antagonistas de bG31P e hG31P+6

Figura 14. hG31P antagoniza ENA78, um ligando CXCR2-específico.

Figura 15. hG31P antagoniza liberação de ROI CXCL8-induzida.

Figura 16. hG31P antagoniza atividades quimiotáticas neutrofílicas no esputo de

pacientes com bronquiectasia e fibrose cística.

Figura 17. hG31P reduz inflamação pulmonar em ratos endotoxêmicos.

Figura 18. Efeito de hG31P na endotoxemia mórbida das vias respiratórias em porcos da índia.

5            Figura 19. Efeito de diversas isoformas de hG31P (e hbG31P) sobre patologia da endotoxemia das vias respiratórias em porcos da índia.

Figura 20. Efeito das diversas isoformas hG31P (e hbG31P) sobre a patologia da endotoxemia das vias respiratórias em porcos da índia.

10           Figura 21. Efeitos dos mutantes hbG31P sobre a resposta do influxo neutrofílico Ca intracelular (PMN) ao IL-8 humano e GRO $\alpha$ . A atividade de hbG31P e sua atividade mutante sobre o bloqueio da liberação de Ca intracelular PMN intracelular [Ca]<sub>i</sub> estimulada por IL-8 humano e GRO $\alpha$  foram avaliadas. 100 ng/mL de mutantes de bG31P, hbG31P, e hbG31P foram incubados com 2  $\mu$ M Fluo- 4 AM manchado com 2 x 10<sup>5</sup> PMNs por 15 mins, em seguida estimulado por 100 ng/mL IL-8 ou GRO $\alpha$ . Em seguida a leitura da fluorescência das amostras com fluorímetro. Os dados foram expressos como a área das medições [Ca]<sub>i</sub>. Geralmente, mutantes hbG31P bem como hbG31P, bG31P apresentaram atividade agonista  
15           eficaz em PMN [Ca]<sub>i</sub> estimulado por IL-8 e GRO $\alpha$ .

Figura 22. mutantes hbG31P apresentaram diferentes efeitos sobre o bloqueio da migração de PMN ao sítio de inflamação nos testes de pele estimulados por LPS. hbG31P e sua atividade antagonista mutante em bloquear a infiltração de PMS no sítio de inflamação  
20           estimulado por LPS foram avaliados. Os dados foram expressos como a porcentagem do número bloqueado de PMN em campo 40x de microscópio de tecido subcutâneo e intradérmico tratados por 0,5  $\mu$ g LPS e 250  $\mu$ g/mL bG31P, hbG31P ou seus mutantes no número de PMN no sítio de inflamação tratado apenas com LPS. Os dados mostraram claramente que  
25           hbG31P possui atividade bloqueadora igual com bG31P. H13Y mostrou atividade antagonista muito melhor que T3K, E35A. T15K apresentou ligeiro efeito sobre o bloqueio. Ao mesmo tempo, S37T não apresenta qualquer atividade antagonista.

#### Descrição Detalhada da Invenção

(As abreviações apresentadas a seguir são usadas no transcurso desta revelação:  
30           ARDS, síndrome de sofrimento respiratório agudo; BALF, fluido da lavagem bronquialveolar; BHR, Reagente de Bolton-Hunter; receptores de CXCR1, CXCR2, CXCL8 A, B, respectivamente; motivo ácido glutâmico-lisina-arginina, ELR; CXCL1, oncogene-alfa relacionado com o crescimento; CXCL4, fator plaquetário-4; CXCL5, ativador-78 neutrofílico derivado epiteli-  
35           al; CXCL6, proteína-2 quimiotática granulócita; CXCL8, interleucina-8; fMLP, tripeptídeo bacteriano formil metionil-leucilprolina; IPTG, isopropil-tio-D-galactopiranosida; MIP-2, proteína-2 macrófago inflamatória; PMSF, fluoreto de fenilmetilsulfonila; TMB, tetrametilbenzidina).

Como usado aqui, 'um agonista' se refere a um agente que induza a célula a se

tornar ativada.

Como usado aqui, 'um antagonista' se refere a um agente que impede a célula de ser ativada em presença ou ausência do agonista.

Como usado aqui, 'purificado' não exige pureza absoluta mas em lugar disso é pretendido como uma definição relativa. Por exemplo, a purificação do material de partida ou do material natural a pelo menos uma ordem de magnitude, preferivelmente duas ou três ordens de magnitude é expressamente contemplado como se inserindo na definição de 'purificado'.

Como usado aqui, o termo 'isolado' requer que o material seja removido de seu ambiente original.

Como usado aqui, o termo 'tratamento' em suas diversas formas gramaticais se refere a prevenir, curar, reverter, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir ou parar os efeitos prejudiciais de um estado de doença, de progressão da doença, ou de uma condição anormal outra provocada pelo agente causal da doença.

Como usado aqui, uma 'quantidade eficaz' é uma quantidade que é suficiente para conseguir o resultado desejado. Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, uma tal quantidade irá, naturalmente, depender da idade, peso e das condições do paciente individual que está sendo tratado.

Quando truncagem amino terminal de CXCL8 bovino é combinada com uma lisina para substituição arginina no aminoácido 11 (isto é, CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R), são evidentes aumentos importantes na afinidade do receptor de CXCR1 e CXCR2, tal que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R inibe competitivamente a ligação de múltiplos ligandos a ambos os receptores (Li, F., and J. R. Gordon. 2001. Biochem. Biophys. Res. Comm. 286:595-600., aqui incorporados por referência). A truncagem adicional no motivo receptor-sinalizador ELR (por exemplo, aminoácidos 4-6 de CXCL8 humano) de algumas quimiocinas CXC pode transforma-los em antagonistas de receptor brando (CXCL8<sub>(6-72)</sub>) a moderado (CXCL1<sub>(8-73)</sub>) (McColl and Clark Lewis 1999; Moser, B. et al. 1993. J. Biol. Chem. 268:7125- 7128). Como revelado aqui, ao introdução no CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R de uma segunda substituição aminoácido, glicina 31 a um resíduo prolina (isto e, CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P), torna esse análogo CXCL8 um antagonista de afinidade muito alta das respostas quimiocinas ELR-CXC bovina e humana. Ele antagoniza o arranjo completo de quimiocinas ELR-CXC expressos no foco inflamatório endotoxina induzido e bloqueia a inflamação induzida por endotoxina in vivo.

Embora algumas das discussões apresentadas a seguir tratem primeiramente com neutrófilos bovinos, células inflamatórias de outros mamíferos (incluindo humanos) também apresentam receptores de CXCR1 e CXCR2 (ver, por exemplo, Benson, M. et al. 1999. Pediatr. Allergy Immunol. 10:178-185) e são também vulneráveis a inibição por meio de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P. Conseqüentemente, a presente invenção tem uma ampla aplicabili-

dade para as patologias mediadas pela quimiocina ELR-CXC em mamíferos.

Como será entendido por aqueles usualmente versados na técnica, na nomenclatura usada aqui, '3-74' se refere ao fato de que o peptídeo CXCL8 natural tem comprimento de 74 aminoácidos ('74') e os dois primeiros aminoácidos foram clivados, significando que a sequência de peptídeo 'começa' no aminoácido #3 da sequência natural. Para consistência de nomenclatura, os aminoácidos são referidos pelo número com base na sequência do tipo naturalmente encontrado e como tal 'G31P' se refere à substituição de glicina no aminoácido #31 da sequência naturalmente encontrada com prolina. Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, com referência à SEQ ID No. 1, prolina está de fato no 29º aminoácido em vista da deleção dos dois primeiros aminoácidos.

Em outras modalidades da invenção, são providas proteínas antagonistas da quimiocina ELR-CXC que são capazes de se ligarem aos receptores de CXCR1 ou CXCR2 em células inflamatórias de mamíferos. Numa modalidade preferida, esses peptídeos são substancialmente equivalentes a um peptídeo que possui uma sequência de SEQ ID No. 1, em que, como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, substancialmente equivalente significa que os peptídeos possuem uma sequência aminoácido que é pelo menos 60% idêntica, ou pelo menos 65% idêntica, ou pelo menos 70% idêntica, ou pelo menos 71%, ou pelo menos 72% idêntica, ou pelo menos 73% idêntica, ou pelo menos 74% idêntica, ou pelo menos 75% idêntica, ou pelo menos 76% idêntica, ou pelo menos 77% idêntica, ou pelo menos 78% idêntica, ou pelo menos 79% idêntica, ou pelo menos 80% idêntica, ou pelo menos 81% idêntica, ou pelo menos 82% idêntica, ou pelo menos 83% idêntica, ou pelo menos 84% idêntica ou pelo menos 85% idêntica, ou pelo menos 86% idêntica, ou pelo menos 87% idêntica ou pelo menos 88% idêntica ou pelo menos 89% idêntica ou pelo menos 90% idêntica ou pelo menos 91% idêntica ou pelo menos 92% idêntica ou pelo menos 93% idêntica ou pelo menos 94% idêntica ou pelo menos 95% idêntica a uma proteína CXCL8 naturalmente encontrada (ilustrado aqui como a sequência aminoácido de SEQ ID NO:2) e também possui uma truncagem dos primeiros dois resíduos aminoácidos juntamente com substituições de Lys1 com Arg e Gly31 com Pro. Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, em muitas modalidades, esses peptídeos terão comprimentos de aproximadamente 69, 70 ou 72 aminoácidos, como discutido adiante. Todavia, em outras modalidades, os peptídeos como descrito acima podem incluir deleções e/ou inserções de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais aminoácidos. Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, regiões de um peptídeo que podem tolerar uma inserção ou deleção podem ser previstas a partir da estrutura tridimensional de um peptídeo ou por meio de comparação das sequências provenientes dos organismos correlatos.

Por exemplo, com referência a Tabela 1 que mostra o alinhamento de peptídeos das sequências de CXCL8 naturalmente encontradas a partir de um número de espécies,

incluindo bovino, humano, macaco rhesus, ovelhas, cães, e porcos, uma das seqüências de porcos inclui um aminoácido adicional inserido entre o que corresponde as aminoácidos 60 e 61 da seqüência bovina naturalmente encontrada, indicando que este é um sítio que é possível de tolerar inserções de um ou mais aminoácidos em outras espécies. De modo similar, as seqüências humana e de porco, 2 e 3 aminoácidos respectivamente são deletados no C-terminal relativamente à seqüência bovina, sugerindo que a deleção de pelo menos 2-3 aminoácidos do C-terminal é possível de ser tolerada em outras espécies também. Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, isto também indica que a adição ou a substituição de aminoácidos na extremidade C-terminal desses peptídeos é possível de ser tolerada, isto é, não teria um efeito significativamente negativo sobre a atividade biológica desejada do peptídeo.

É de notar que é bem conhecido na arte que algumas modificações e alterações podem ser feitas na estrutura de um peptídeo sem alterar substancialmente a função biológica daquele peptídeo, para obter um peptídeo biologicamente equivalente. Em um aspecto da invenção, os peptídeos acima mencionados podem incluir peptídeos que diferem pelas substituições aminoácidos conservativas. Os peptídeos da presente invenção também se estendem aos peptídeos biologicamente equivalentes que diferem pelas substituições aminoácidos conservativas. Como usado aqui, o termo "substituições aminoácidos conservativas" se refere a substituição de um aminoácido por um outro numa dada posição no peptídeo, onde a substituição pode ser feita sem substancial perda da função pertinente, nesse caso, a multiplicação do epítipo. Na produção de tais alterações, as substituições de resíduos iguais de aminoácidos pode ser feita com base na similaridade relativa de substituintes de cadeia lateral, por exemplo, seu tamanho, carga, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, e semelhantes, e tais substituições podem ser ensaiadas quanto ao seu efeito acerca da função do peptídeo através de testagem de rotina. Nessas modalidades, função se refere a atividade antagonista da quimiocina CXCL8.

Em algumas modalidades, substituições aminoácidos conservativa podem ser feitas onde um resíduo aminoácido é substituído por um outro possuindo um valor similar de hidrofiliabilidade (por exemplo, dentro de um valor de mais ou menos 2,0), onde o seguinte pode ser um aminoácido possuindo um índice hidropático de cerca de 1,6 tal como Tyr (-1,3) ou Pro (-1,6) são consignados a resíduos aminoácidos (como detalhado na Patente U.S. No. 4.554.101, incorporada aqui por referência): Arg (+3,0); Lys (+3,0); Asp (+3,0); Glu (+3,0); Ser (+0,3); Asn (+0,2); Gln (+0,2); Gly (0); Pro (-0,5); Thr (-0,4); Ala (-0,5); His (-0,5); Cys (-1,0); Met (-1,3); Val (-1,5); Leu (-1,8); He (-1,8); Tyr (-2,3); Phe (-2,5); and Trp (-3,4).

Em modalidades alternativas, as substituições aminoácidos conservativas podem ser feitas onde um resíduo aminoácido está substituído por um outro possuindo um índice hidropático (por exemplo, contido em um valor de mais ou menos 2,0). Em tais modalidades,

cada resíduo aminoácido pode estar consignado a um índice hidropático com base em suas características de hidrofobicidade e carga, como a seguir: He (+4,5); Val (+4,2); Leu (+3,8); Phe (+2,8); Cys (+2,5); Met (+1,9); Ala (+1,8); Gly (-0,4); Thr (-0,7); Ser (-0,8); Trp (-0,9); Tyr (-1,3); Pro (-1,6); His (-3,2); Glu (-3,5); Gln (-3,5); Asp (-3,5); Asn (-3,5); Lys (-3,9); and Arg (-4,5).

Em modalidades alternativas, substituições aminoácidos conservativas podem ser feitas onde um resíduo aminoácido está substituído por um outro na mesma classe, onde os aminoácidos são divididos na forma de não polar, ácidos, básicos e neutros, como a seguir: não polar: Ala, Val, Leu, He, Phe, Trp, Pro, Met; ácido: Asp, Glu; básico: Lys, Arg, His; neutro: Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr.

Em ainda outras modalidades, as substituições podem ser feitas onde qualquer aminoácido conhecido está substituído numa dada posição. Em algumas modalidades, aminoácidos evolutivamente não conservados ou fracamente conservados podem estar substituídos com qualquer, por exemplo, aminoácidos de tamanhos similares mas de diferentes hidrofobicidade, carga similar mas diferentes tamanhos ou outros tipos de substituições que serão entendidas por aqueles usualmente versados na técnica.

Desse modo, análogos de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11RG31P podem ser construídos onde a função biológica desejada é mantida por inserção, deleção e substituição da sequência apresentada na SEQ ID No. 6, como discutido aqui. É também notado que análogos representativos são mostrados nas SEQ ID Nos. 7-41.

Numa modalidade preferida, análogos substancialmente equivalentes de CXCL8<sub>(3-74)</sub>G31P são preparados usando comparações das seqüências correlatas provenientes de diversas espécies, por exemplo, como mostrado na Tabela 1. Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, a substituição em locações altamente variáveis do aminoácido é mais possível de ser tolerada que a substituição em aminoácidos altamente conservados.

Por exemplo, a comparação das seqüências apresentadas na Tabela 1, seguida pela deleção dos dois aminoácidos N-terminais e a substituição de glicina 31 com prolina e lisina 11 com arginina proporciona uma seqüência de: XELRCXCIRX XSXPFXPXIXI  
XEXXXIXSPP HCNXNEXIIVK LXXGXEXCLX PXXXWVQXXV XXFXKXXEXX XX (SEQ ID  
NO. 3) onde X é qualquer aminoácidos. Em algumas modalidades, X é um aminoácido natural.

Em uma outra modalidade da invenção, é provido um polipeptídeo isolado ou purificado compreendendo uma seqüência aminoácido de: X<sub>1</sub>ELRCXCIRX XSXPFXPXIXI  
XEXXXIXSPP HCNXNEXIIVK LXXGXEXCLX PXXXWVQXXV XXFXKXXEXX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub> (SEQ ID  
NO. 42) onde aqui X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> e X<sub>4</sub> são independentemente resíduos de aminoácidos 0 - 10 e X é qualquer aminoácido. Isto é, X<sub>1</sub> pode ser, por exemplo, 6 aminoácidos longos aleatórios

enquanto que  $X_2$ ,  $X_3$  e  $X_4$  podem ser todos 0 aminoácidos longos, tal que ele possa ser deletado. Em outras modalidades,  $X_1$  pode ser 2 aminoácidos não naturais, isto é não MS (bovino) ou SA (humano) mas qualquer outros 2 aminoácidos,  $X_2$  pode ser S ou Q e  $X_3$  e  $X_4$  podem ser deletados.

5 De modo alternativo,  $X_1$  pode ser aminoácidos 0-9, aminoácidos 0 - 8, aminoácidos 0-7 ou aminoácidos 0 - 6 ou 0-5 aminoácidos, ou aminoácidos 0 - 4, ou aminoácidos 0-3, ou aminoácidos 0-2, ou  $X_1$  pode ser selecionado a partir do grupo que consiste de GSK, GST, S, A, T, K, GSMGGSK, e GSMGGST ou  $X_1$  pode ser deletado.

10 É de notar que em algumas modalidades é provida a condição de que o peptídeo não possui sequência aminoácido SEQ ID No. 6, 7, 8 ou 9.

Em uma outra modalidade da invenção, é provido um polipeptídeo isolado ou purificado compreendendo uma sequência aminoácido de:

15  $X_1$ ELRCX<sub>6</sub>CIRX<sub>10</sub>  $X_{11}$ X<sub>13</sub>PFX<sub>16</sub>PKX<sub>19</sub>I  $X_{21}$ EX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>IX<sub>27</sub>SPP  
HGX<sub>33</sub>NX<sub>35</sub>EIIVK LX<sub>42</sub>X<sub>43</sub>GX<sub>45</sub>EX<sub>47</sub>CLX<sub>50</sub> PX<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub>WVQX<sub>58</sub>X<sub>59</sub>V  
 $X_{61}$ X<sub>62</sub>FX<sub>64</sub>KX<sub>66</sub>X<sub>67</sub>EX<sub>69</sub>X<sub>70</sub>OX<sub>71</sub>X<sub>72</sub> (SEQ ID NO. 43)

onde:

$X_1$ ,  $X_{70}$ ,  $X_{71}$  e  $X_{72}$  são independentemente aminoácidos 0 - 10; e

20  $X_6$ ,  $X_{10}$   $X_{11}$ ,  $X_{13}$   $X_{16}$   $X_{19}$   $X_{21}$   $X_{23}$   $X_{24}$   $X_{25}$   $X_{27}$   $X_{33}$   $X_{35}$   $X_{42}$   $X_{43}$   $X_{45}$   $X_{47}$   $X_{50}$   $X_{52}$   $X_{53}$   $X_{54}$   $X_{58}$   $X_{59}$   $X_{61}$   $X_{62}$   $X_{64}$   $X_{66}$   $X_{67}$   $X_{69}$  são cada um independentemente selecionado a partir do grupo que consiste de: A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V e Y.

De modo alternativo,  $X_1$ ,  $X_{70}$ ,  $X_{71}$  e  $X_{72}$  independentemente pode ser aminoácidos 0-9, aminoácidos 0 - 8, aminoácidos 0-7 ou aminoácidos 0 - 6 ou aminoácidos 0-5, ou aminoácidos 0 - 4, ou aminoácidos 0-3, ou aminoácidos 0-2, ou  $X_1$  pode ser selecionado a partir do grupo que consiste de GSK, GST, S, A,

25 T, K, GSMGGSK, e GSMGGST ou  $X_1$  pode ser deletado.

Em outras modalidades,  $X_1$  pode ser 2 aminoácidos não naturais, isto é, não t MS (bovino) ou SA (humano) mas quaisquer outros 2 aminoácidos,  $X_{70}$  pode ser S ou Q e  $X_{71}$  e  $X_{72}$  podem ser deletados. É de notar que em algumas modalidades é provida a condição de que o peptídeo não possui a sequência aminoácido de SEQ ID No. 6, 7, 8 ou 9.

30 Em uma outra modalidade da invenção, é provido um polipeptídeo isolado ou purificado compreendendo uma sequência aminoácido de:  $X_1$ ELRCX<sub>6</sub>CIRX<sub>10</sub>  $X_{11}$ SX<sub>13</sub>PFX<sub>16</sub>PKX<sub>19</sub>I  $X_{21}$ EX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>IX<sub>27</sub>SPP

HGX<sub>33</sub>NX<sub>35</sub>EIIVK LX<sub>42</sub>X<sub>43</sub>GX<sub>45</sub>EX<sub>47</sub>CLX<sub>50</sub> PX<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub>WVQX<sub>58</sub>X<sub>59</sub>V  
 $X_{61}$ X<sub>62</sub>FX<sub>64</sub>KX<sub>66</sub>X<sub>67</sub>EX<sub>69</sub>X<sub>70</sub>OX<sub>71</sub>X<sub>72</sub> (SEQ ID NO. 4)

35 onde

$X_1$  é aminoácidos 0 - 10;

$X_6$  é Q, E ou L;

- $X_{10}$  é T ou I;  
 $X_{11}$  é H ou Y;  
 $X_{13}$  é T ou K;  
 $X_{16}$  é H ou N;  
5  $X_{19}$  é F ou Y ou L;  
 $X_{21}$  é K ou R;  
 $X_{23}$  é L ou M;  
 $X_{24}$  é R ou T;  
 $X_{25}$  é V ou A;  
10  $X_{27}$  é D ou E;  
 $X_{33}$  é V ou A ou E;  
 $X_{35}$  é T ou S;  
 $X_{42}$  é S ou V ou T ou F;  
 $X_{45}$  é R ou A ou N ou K ou D;  
15  $X_{47}$  é L ou V;  
 $X_{50}$  é D ou N;  
 $X_{52}$  é K ou H;  
 $X_{53}$  é E ou Q ou T;  
 $X_{54}$  é P ou N ou K;  
20  $X_{58}$  é R ou K ou I;  
 $X_{59}$  é V ou I;  
 $X_{61}$  é E ou Q;  
 $X_{64}$  é L ou V;  
 $X_{66}$  é R ou K;  
25  $X_{67}$  é A ou T;  
 $X_{69}$  é S ou N ou K ou G;  
 $X_{70}$  é Q ou S ou K ou deletado;  
 $X_{71}$  é N ou D ou deletado; and  
 $X_{72}$  é P ou A ou S ou deletado.
- 30 Alternativamente,  $X_1$  pode ser aminoácidos 0-9 , aminoácidos 0 - 8, aminoácidos 0-7 ou aminoácidos 0 - 6 ou aminoácidos 0-5 , ou aminoácidos 0 - 4, ou aminoácidos 0-3 , ou aminoácidos 0-2 , ou
- $X_1$  pode ser selecionado a partir do grupo que consiste de GSK, GST, S, A, T, K, GSMGGSK, e
- 35 GSMGGST ou  $X_1$  pode ser deletado.

É de notar que em algumas modalidades é provida a condição de que o peptídeo não possui a seqüência aminoácido SEQ ID No. 6, 7, 8 ou 9. Em uma outra modalidade da

invenção, é provido um polipeptídeo isolado ou purificado compreendendo uma sequência aminoácido de:

X<sub>1</sub>ELRCQCI RT X<sub>11</sub>SX<sub>13</sub>PFHPKFI KELRVIESPP  
 HCX<sub>33</sub>NX<sub>35</sub>EIIVK LX<sub>42</sub>X<sub>43</sub>GX<sub>45</sub>EX<sub>47</sub>CLX<sub>50</sub> PKEX<sub>54</sub>WVQX<sub>58</sub>VV  
 X<sub>61</sub>X<sub>62</sub>FX<sub>64</sub>KRAEX<sub>69</sub>X<sub>7</sub>OX<sub>71</sub>X<sub>72</sub> (SEQ ID NO. 4)

onde

X<sub>1</sub> é GSK, GST, S, A, T, K, GSMGGSK, GSMGGST ou deletado;

X<sub>11</sub> é H ou Y;

X<sub>13</sub> é T ou K;

X<sub>33</sub> é A ou E;

X<sub>35</sub> é T ou S;

X<sub>42</sub> é S ou T;

X<sub>43</sub> é D ou N;

X<sub>45</sub> é R ou N ou D;

X<sub>47</sub> é L ou V;

X<sub>50</sub> é D ou N;

X<sub>54</sub> é N ou K;

X<sub>55</sub> é R ou K;

X<sub>6</sub> é E ou Q;

X<sub>64</sub> é L ou V;

X<sub>69</sub> é N ou K;

X<sub>70</sub> é Q ou S ou deletado;

X<sub>71</sub> é D ou deletado; e

X<sub>72</sub> é P ou deletado.

É de notar que em algumas modalidades é provida a condição de que o peptídeo não possui a sequência aminoácido SEQ ID No. 6, 7, 8 ou 9.

Em outras modalidades, é provido um polipeptídeo isolado ou purificado que possui ou compreende ou consiste essencialmente ou consiste de uma sequência aminoácido como apresentado em qualquer uma das SEQ ID No. 6-41 ou SEQ ID No. 10-41. Por referência, essas sequências aminoácidos são como a seguir:

TELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIE

PPHCENSEIIVKL TNGNEVCLNPKEKWWQKV

QV FVKRAEKQDP (Bovino 3-74 K11RG31P - SEQ ID No. 6)

TELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESGGHCENSEIIVKL TNGNEVCLNPKEKWWQKV

VQV FVKRAEKQDP (bovino 3-74 K11R P32G - SEQ ID No. 7)

TELRCQC

IRSPSTPFHPKFIKELRVIESPPHCEN

EIIVKL TNGNEVCLNPKEKWWQKV

QVFKRAEKQDP (bovino - 3-74 T12SH13PG31P - SEQ ID No. 8)

TELRCQCIRSPSTPFHPKFIKELRVIE

PGHCENSEIIVKLTNGNEVCLNPKEKWWQKVV QVFKRAEKQDP (bovino - 3-74  
T12SH13PG31PP32G - SEQ ID No. 9)

5 GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRV

ESPPHCENSEIIVKLTGRELCLDPKENWVQR

VVEKFLKRAENS (hg31P - SEQ ID No. 10);

KELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIE

PPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVW

10 EKFLKRAENS (hg31P (0) - SEQ ID No. 11);

ELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIES

PHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVVE

KFLKRAENS (hg31P (-1) - SEQ ID No. 12);

GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRV

15 ESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR VVEKFLKRAENS (hg31P (+2) - SEQ ID  
No. 13);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIK

LRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKEN

WVQRVVEKFLKRAENS (hg31P (+6) - SEQ ID No. 14);

20 GSTELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRV

ESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR

VVEKFLKRAENS (hg31P K3T - SEQ ID No. 15);

GSKELRCQCIRTHSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR

VVEKFLKRAENS (hg31P Y13H - SEQ ID No. 16);

25 GSKELRCQCIRTYSTPFHPKFIKELRV

ESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR

VVEKFLKRAENS (hg31P K15T (0) - SEQ ID No. 17);

GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWV

QR VVEKFLKRAENS (hg31P A35E(0) - SEQ ID No. 18);

30 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANSEIIVKLSDGRELCLDPKENW  
VQR

VVEKFLKRAENS (hg31P T37S (0) - SEQ ID No. 19);

GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLTGRELCLDPKENWV

QR

35 VVEKFLKRAENS (hg31P S44T (0) - SEQ ID No. 20);

GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGDELCLDPKENWVQR

VVEKFLKRAENS (hg31P R47D (0) - SEQ ID No. 21);

GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRV

ESPPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKEKVVQR

VVEKFLKRAENS (hG31P N56K(0) - SEQ ID No. 22);

GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRV

5 ESPPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKENWVQK VVEKFLKRAENS (hG31P R60K (0) - SEQ ID No. 23);

GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRV

ESPPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKENWVQR

VVEVFLKRAENS (hG31P K64V (0) - SEQ ID No. 24);

10 GSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRV

ESPPHCANTEIIVKLSDGREVCLDPKENWVQR

VVEKFLKRAENS (hG31P L49V - SEQ ID No. 25);

GSKELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWVQR

VVEKFLKRAENS (bhG31P T3K- SEQ ID No. 26);

15 GSTELRCQCIRTYSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWV  
QR

VVEKFLKRAENS (bhG31P HI 3 Y - SEQ ID No. 27);

GSTELRCQCIRTHSKPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWV

QR

20 VVEKFLKRAENS (bhG31P T15K - SEQ ID No. 28);

GSTELRCQC

IRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCANSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWVQR

VVEKFLKRAENS (bhG31P E35A - SEQ ID No. 29);

GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENTEIIVKLTDGRELCCLDPKENWVQR

25 VVEKFLKRAENS (bhG31P S37T - SEQ ID No. 30);

GSMGGSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPK

EN

WVQRVVEKFLKRAENS (bhG31P (+6) - SEQ ID No. 31);

GSTELRCQC

30 IRTHTSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWVQR VVEKFLKRAENS  
(bhG31P (+2) - SEQ ID No. 32);

TELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWVQR

VV

EKFLKRAENS (bhG31P (+0) - SEQ ID No. 33);

35 ELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRVIESPPHCENSEIIVKLTDGRELCCLDPKENWVQR

VVE

KFLKRAENS (bhG31P (-1) - SEQ ID No. 34);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKEN

WVQRVVEKFLKRAENS (hK11R (+6) - SEQ ID No. 35);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIK

LRVIESPPHCENTEIIVKLSDGRELCCLDPKEN

5 WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P A35E(+6) - SEQ ID No. 36);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIK

LRVIESPPHCANSEIIVKLSDGRELCCLDPKEN WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P T37S (+6) - SEQ ID No. 37);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIK

10 LRVIESPPHCANTEIIVKLTDGRELCCLDPKEN

WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P S44T (+6) - SEQ ID No. 38);

GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIK

LRVIESPPHCANTEIIVKLSDGDELCLDPKEN

WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P R47D (+6) - SEQ ID No. 39);

15 GSMGGSKELRCQCIRTYSKPFHPKFIKELRVIESPPHCANTEIIVKLSDGREVCLDPKEN

WVQRVVEKFLKRAENS (hK11RG31P L49V - SEQ ID No. 40); e

GSTELRCQCIRTHSTPFHPKFIKELRV

ESPPHCENSEIIVKL TNGNEVCLNPKEKWVQK

VVQVFVKRAEKQDP (Bovino 3-74 K11RG31P (+2)- SEQ ID No. 41).

20 Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, 'consistindo essencialmente de' como usado com respeito aos peptídeos definidos acima se refere ao fato de que os peptídeos podem incluir, por exemplo, deleções N-terminais e/ou C-terminais que não influenciam materialmente a atividade, isto é, a atividade antagonista ou agonista da quimiocina ELR-CXC do peptídeo em questão.

25 Numa modalidade preferida, o peptídeo isolado ou purificado é como apresentado na SEQ ID No. 13 (hG31P+2) ou SEQ ID No. 14 (hG31P+6). Como pode ser visto pela referência às Figuras 12, 19 e 20 e como discutido adiante, esses peptídeos aparentam mostrar uma atividade relativamente maior comparada a hG31P+0 e hG31P-I .

30 Como discutido aqui, polinucleotídeos que codificam os peptídeos descritos acima estão inseridos no escopo da invenção e podem ser construídos usando meios bem conhecidos na arte. Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, células transgênicas ou linhagens de células que compreendem ou que tenham sido transformadas ou transfectadas com tais polinucleotídeos estão também inseridas no escopo da invenção como discutido acima.

35 Por exemplo, um hospedeiro viral pode ser produzido por engenharia genética para compreender o polinucleotídeo ou um vetor de expressão compreendendo o polinucleotídeo como descrito acima e estando operativamente ligado a uma sequência regulatória que con-

trola a expressão do referido polinucleotídeo pode ser construído usando meios conhecidos na arte.

Além disso, os peptídeos como descrito acima pode ser usado na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma patologia mediada pela quimiocina CXC. Em algumas modalidades, o medicamento é para o tratamento de uma patologia mediada pela quimiocina ELR-CXC. A patologia mediada pela quimiocina CXC pode ser selecionada a partir do grupo que consiste de: dano por isquemia-reperfusão, síndrome de sofrimento respiratório agudo induzido por endotoxemia, glomerulonefrite do tipo imuno complexo, pneumonia bacteriana e mastite.

Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, tais medicamentos compreendendo uma quantidade eficaz de qualquer um dos peptídeos descritos acima podem ser administrados a um indivíduo com necessidade de tal tratamento.

Numa modalidade alternativa da invenção, é vislumbrado que compostos possuindo a mesma estrutura tridimensional no sítio de ligação pode ser usada como antagonistas. A análise tridimensional da estrutura química é usada para determinar a estrutura dos sítios ativos, incluindo sítios ligantes para as quimiocinas. Condutores químicos com alta vazão de classificação têm sido usados para gerar e otimizar quimicamente um antagonista seletivo do CXCR2 (J Biol Chem, 1998, 273: 10095, aqui incorporado por referência). Uma abordagem similar foi também usado para gerar um antagonista de CCR3 (J Biol Chem, 2000, 275:36626, aqui incorporado por referência).

Wells et al (J Leuk Biol, 1996, 59:53, aqui incorporado por referência), empregaram uma espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) para detalhar a estrutura tridimensional dos ligandos para CXCR, incluindo ambas as quimiocinas CXC ELR e não-ELR. Com suas informações de RMN, Wells et al geraram múltiplas substituições dentro dos sítios ligantes do receptor de múltiplas quimiocinas, tal que elas, puderam alterar substancialmente as especificidades dos ligandos.

#### Materiais e Métodos

Reagentes e suprimentos. Os reagentes a seguir foram adquiridos comercialmente: reagents were purchased commercially: glutathione-Sepharose, o vetor de expressão pGEX-2T, Sephadex G-25 (Amersham-Pharmacia-Biotech, Baie d'Urf, PQ), Bolton-Hunter reagent, um kit de biotilação de proteína (Pierce Scientific, Rockford, 111.), o vetor de seqüenciamento pBluescript II KS, Pfu Turbo.TM. DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, Calif), um kit de mutagênese sítio-direcionado (QuickChange.TM.; Boehringer-Mannheim Canada, Laval, PQ), aprotinina, benzeno, ionóforo de cálcio A23187, chloramine T, cytochalasin B, dimethylformamide, endotoxina (Escherichia coli lipopolissacarídeo, serotipo 0127B8), isopropil-tio-D-galactopiranosida (IPTG), leupeptina, p-nitrofenil-D-glicuronida, óleo mineral, óleo de silício, tetrametilbenzidina (TMB), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF),

phorbol-12,13-miristato acetato (PMA), e Triton X- 100 (Sigma Chemical Co, Mississauga, ON), um kit de mancha Diff-Quick (American Scientific Products, McGaw Pk, 111.), humano CXCL1, CXCL5, e CXCL8 (R & D Systems Inc,

Minneapolis, Minn.), horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit Ig (Zymed, South San Francisco, Calif), DMEM, HBSS (Gibco, Grand Island, N.Y.), HRP-streptavidin (Vetor Labs, Burlingame, Calif), ABTS enzyme substrate (Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, Md.), soro de albumina bovino (BSA), and Lymphocyte Separation Medium (ICN Pharmaceuticals, Aurora, 111.).

Geração de análogos de CXCL8.sub.(3-74)K11R. O ligando CXCL8.sub.(3-74)K11R de alta afinidade a CXCR1/CXCR2, e seu análogo T12S/H13F foram gerados de acordo com os métodos descritos em Li and Gordon (2001, supra). Os análogos Gly31Pro(G31P), Pro32Gly (P32G), e G31P/P32G dessas proteínas foram geradas de modo similar através de mutagênese sítio-direcionada usando PCR com os apropriados iniciadores oligonucleotídeos para frente e reverso (Tabela 1). Os produtos provenientes de cada reação foram digeridos com DpnI, ligados ao vetor pGEX-2T, transfectados para células HB101, e suas seqüências verificadas comercialmente (Plant Biotechnology Institute, Saskatoon). Em resumo, as bactérias recombinantes foram lisadas em presença de um coquetel inibidor de protease (2 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinina, e 2 µg/mL leupeptina) e as proteínas recombinantes de fusão nos sobrenadantes purificadas por cromatografia de afinidade, usando microesferas de glutathione-Sepharose de acordo com os métodos de Caswell et al. (Caswell, J. L., D. M. Middleton, and J. R. Gordon. 1998. Vet. Immunol. Immunopath. 67:327-340.). Os análogos CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R foram clivados a partir das proteínas de fusão GST através da digestão com trombina, dialisado contra salino tamponado em fosfato (PBS), corrida através de colunas comerciais de remoção de endotoxina, e em seguida caracterizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e Western blotting com um anticorpo goat anti-CXCL8 bovino (provedo por Dr. M. Morsey). Cada análogo purificado tinha uma massa molecular de 8 kDa, foi especificamente identificado pelo anticorpo anti-CXCL8 no Western blotting, e tinha uma pureza relativa de 96%, como dimensionado por análise desintométrica dos géis PAGE.

Marcação das proteínas recombinantes. Foi usado <sup>biot</sup>CXCL8 para a pesquisa inicial da ligação do análogo aos neutrófilos e <sup>125</sup>I-CXCL8 para os ensaios do estágio posterior da afinidade relativa do receptor. CXCL8 foi biotinilado e os níveis da substituição biotina determinados usando um kit comercial, como indicado por Li and Gordon (2001, supra). O <sup>biot</sup>CXCL8 foi substituído com 2,15 moles de biotina por mol de CXCL8. CXCL8 foi rádio-marcado com <sup>125</sup>I usando o método do reagente de Bolton-Hunter (BHR), como apresentado em detalhes em (Li and Gordon 2001, supra). A proteína marcada foi separada do <sup>125</sup>I-BHR não incorporada por cromatografia em Sephadex G50, e o CXCL8 marcado caracterizado quanto a sua afinidade relativa a neutrófilos e o tempo requerido para conseguir o equilíbrio

de ligação, como notado em Li and Gordon (2001, *supra*).

Ensaio ligantes de análogo CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R . Células (85-93% neutrófilos) foram purificadas a partir do sangue de gado de acordo com o método Caswell method (Caswell, J. L. et al. 1998. *Vet. Immunol. Immunopath.* 67:327-340). Nos experimentos preliminares, foi determinado que nenhum dos análogos influenciou a viabilidade dos neutrófilos, como determinado por exclusão de corante trypan blue. Para as pesquisas amplas do análogo, neutrófilos em HBSS/0.5% BSA foram incubados por 2 h a 4°C com o análogo, lavado em DMEM frio, e em seguida incubado por outras 2 h a 4 °C com <sup>biot</sup>CXCL8 (1000 ng/mL). A biotina associada com a célula foi detectada mediante incubar as células lavadas com fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (diluição 1:700) e em seguida com substrato enzima ABTS. O OD<sub>405</sub> das amostras foi determinado usando um leitor de placa ELISA. Os neutrófilos tratados no meio rotineiramente ligam suficiente <sup>sup</sup>.biotCXCL8 para gerar um OD<sub>405</sub> de 0,5-0,6.

Para estudos aprofundados com CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P, foi usado <sup>125</sup>I-CXCL8 nos ensaios de inibição com CXCL8 ou CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P não marcados. Em experimentos preliminares foi determinado que o tempo de equilíbrio de ligação de neutrófilos para <sup>125</sup>I-CXCL8 foi de 45 min e que 20 pM <sup>125</sup>I-CXCL8 20 pM logo saturou os receptores de alta afinidade das células. Desse modo, nos ensaios realizados, 10<sup>6</sup> neutrófilos purificados foram incubados por 45 minutos sobre gelo com <sup>125</sup>I- CXCL8 20 pM e concentrações variadas de ligando competidor não marcado. As células foram em seguida sedimentadas através de óleo mineral 6% em óleo siliconado e os níveis de rádio-ligantes associados com a célula determinado usando um contador. A ligação não específica de <sup>125</sup>ICXCL8 para as células foi avaliada em cada ensaio mediante incluir um excesso molar de 200 vezes de ligando não marcado em um conjunto de amostras. Esse valor foi usado para calcular o percentual de ligação específica (Coligan, J., A. Kruisbeek, D. Margulies, E. Shevach, and W. Strober. 1994. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, New York).

Ensaio de liberação neutrófilo-glicuronidase. O ensaio neutrófilo-glicuronidase foi reportado em detalhes (Li and Gordon 2001, *supra*). Em resumo, neutrófilos tratados com cytochalasin B foram incubados por 30 minutos com os análogos de CXCL8, em seguida seus produtos de segregação ensaiados calorimetricamente quanto a enzima. A liberação glicuronidase foi expressa como o percentual do conteúdo celular total, determinado mediante lisar as células tratadas no meio com 0,2% (v/v) Triton X-100. A provocação neutrofílica com o estímulo de controle positivo PMA (50 ng/mL) e A23187 (1 µg/mL) induziu liberação de 42+/-6% do total de armazenados glicuronidase celular.

Amostras provenientes de lesões inflamatórias. Foram obtidos fluidos de lavagem bronquialveolar (BALF) provenientes de pulmões de gado (n=4) com diagnóstico clínico de maneiomiose pneumônica purulenta (Caswell et al., 1997), bem como fluidos das cavidades

de mamilos provenientes de gado (n=4) com mastite experimental induzida por endotoxina (Waller, K. P. 1997. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57:239-251). Em experimentos dose-resposta preliminares foi determinado que 5  $\mu$ g de endotoxina induziu uma forte (70-80% máximo) de resposta neutrofílica mamária. Desse modo, nos experimentos reportado a mastite foi induzida através da infusão de 5  $\mu$ g de endotoxina ou meio veículo sozinho (salino; 3 mL volumes) dentro das cavidades mamilares vacas leiteiras Holstein não lactantes, e 15 h mais tarde os infiltrados foram recuperados das cavidades por lavagem com 30 mL HBSS. As células provenientes da BALF e os fluidos de lavagem da cavidade mamilar foram sedimentados por centrifugação e as contagens diferenciais foram realizadas. Fluidos de lavagem não tratados e esgotados de CXCL8 (abaixo) foram avaliados quanto aos seus teores de quimiocina através de ELISA (CXCL8 somente) e ensaios de quimiotaxia.

Ensaio de quimiotaxia neutrofílica. Os ensaios de microquimiotaxia foram transcorridos em câmaras de microquimiotaxia de Boyden modificadas usando filtros de policarbonato com tamanho de poro de 5  $\mu$ m livres de polivinilpirrolidona, de acordo com métodos conhecidos (Caswell et al., 1998; Cairns, C. M. et al. 2001. *J. Immunol.* 167:57-65). Para cada amostra, os números de células que haviam migrado para o interior das membranas durante 20-30 min foram enumerados através de contagem direta de pelo menos 40 vezes. Os campos das objetivas, e os resultados expressaram o número médio de células/campo 40x (+/- SEM). Os quimioatraentes incluíam d CXCL8 bovino ou humano, CXCL5 e CXCL1 humanos, maneiômiose pneumônica de BALF e fluidos de lavagem de mastite (diluído 1:10-1:80 em HBSS), enquanto que os antagonistas compreenderam anticorpo 8M6 de mouse anti-ovine CXCL8 (fornecido generosamente por Dr. P. Wood, CSIRO, Austrália) ou os análogos CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R. Em alguns ensaios as amostras foram pré-incubadas com os anticorpos (5  $\mu$ g/mL) por 60 min sobre gelo (Gordon, J. R. 2000. *Cell Immunol.* 201 :42-49). Em outros, foram geradas matrizes de imunoafinidade CXCL8-específicas com os anticorpos 8M6 e microesferas de proteína-A-Sepharose e usado esse excesso para absorver as amostras (Caswell et al., 1997; Gordon, J. R., and S. J. Galli. 1994. *J. Exp. Med.* 180:2027- 2037); o nível de depleção de CXCL8 foi confirmado por ELISA das amostras tratadas. Para ensaios com os antagonistas recombinantes, os inibidores foram misturados diretamente com as amostras imediatamente antes da realização dos testes.

ELISA de CXCL8. Para os testes ELISA, MAb 8M6 foi usado como o anticorpo de captura, rabbit anti-ovine CXCL8 antiserum (também de P. Wood, CSIRO) como o anticorpo secundário, e HRP-conjugado anti-rabbit Ig, e TMB como o sistema de detecção, como notado em Caswell et al. (1997). Diluições seriais de cada amostra foram analisadas em triplicada, e cada ensaio incluiu uma curva padrão do CXCL8 bovino recombinante.

Bloqueio CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P das respostas endotoxina in vivo. Foram usadas series sequenciais de testes cutâneos de 15 h para testar a capacidade de CXCL8<sub>(3-</sub>

<sup>74</sup>)K11R/G31P para bloquear respostas inflamatórias induzidas por endotoxina in vivo. Para cada teste, foram provocadas duas vacas Holstein de 2 semanas de idade de modo intradérmico com 1  $\mu$ g endotoxina em 100  $\mu$ L de salino, após 15 h mais tarde tomadas biópsias por punção 6 mm sob anestesia local (lidocaína) e processadas estas quanto a histopatologia (Gordon and Galli, 1994). Em seguida ao primeiro teste (controle interno positivo), foi injetado em cada animal de modo subcutâneo, intramuscular, ou intravenoso CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P (75  $\mu$ g/kg) em salino, em seguida provocados novamente com endotoxina, como acima. Os animais foram provocados um total de 4 vezes com endotoxina, tal que biópsias do sítio de reação com 15 h foram obtidas a 0, 16, 48, e 72 h pós-tratamento. As biópsias foram processadas através de métodos de rotina em seções de parafinas .mu.m, manchadas com solução Giemsa, e examinadas em modo cego numa ampliação de 400x (Gordon and Galli, 1994; Gordon, J. R. 2000. J. Allergy Clin. Immunol. 106:110-116). Os números médios de neutrófilos por campo microscópico de objetiva 40x foram determinados em três diferentes profundidades de pele, a derme papilar (superficial), intermediária, e reticular (profunda).

Análise estatística. Dados multigrupos foram analisados por ANOVA e testagem post-hoc Fisher protected Least Significant Difference (PLSD), enquanto comparações em dois grupos foram feitas usando o teste-t de Student (bi-caudal). Os resultados são expressos como a média +/- SEM.

## Results

### 1. G31P Bovino

CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P inibe competitivamente a ligação CXCL8 a neutrófilos. Foi pesquisada a capacidade de cada análogo CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R em se ligar aos receptores de CXCL8 em neutrófilos, e desse modo competir com CXCL8 como um ligando. Nas pesquisas iniciais, foram empregados ensaios de inibição da ligação <sup>blot</sup>CXCL8, incubação das células com os análogos (10 ng/mL) por 2 h a 4 °C antes da exposição a <sup>blot</sup>CXCL8 (1  $\mu$ g/mL). Esse nível de CXCL8 se aproxima daquele encontrado nos tecidos pulmonares de carneiros com maneiomiose pneumônica experimental (Caswell, J. L. 1998. The role of interleukin-8 as a neutrophil chemoattractant in bovine bronchopneumonia. Ph.D. thesis, Department of Veterinary Pathology, University of Saskatchewan). Foi descoberto que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P foi um potente antagonista da ligação CXCL8 nesse ensaio (Figura 1), tal que 10 ng/mL de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P bloqueou 95% das ligações <sup>blot</sup>CXCL8 subseqüentes para as células. Quando testado nessa dose, o CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/P32G bloqueou apenas 48% das ligações CXCL8, enquanto que CXCL8 não marcado propriamente inibiu competitivamente 30% das ligações <sup>blot</sup>CXCL8. A itcç em CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P ou CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/P32G de substituições aminoácidos adicionais em Thr12 e His13 reduziu substancialmente as atividades dos análogos (FIG. 1). Estes dados sugerem claramente que a pré-incubação de neutrófilos com

CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P controla fortemente para baixo a subsequente ligação de CXCL8.

A fim de mapear de modo mais refinado a capacidade de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31 para inibir a ligação de CXCL8, no próximo conjunto de experimentos as células foram expostas simultaneamente a <sup>125</sup>I-CXCL8 e doses variadas de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P ou CXCL8 não marcadas. Foi descoberto que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P foi cerca de duas ordens de magnitude mais eficaz que o CXCL8 naturalmente encontrado em inibir a ligação de 20 pM <sup>125</sup>I-CXCL8 às células (Figura 1). A concentração de inibição de 50% da ligação do ligando marcado (IC<sub>50</sub>) foi de 120 pM para CXCL8 não marcado, e de 4 pM para CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P. Esses dados sugerem que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P é um inibidor competitivo muito potente da ligação CXCL8 aos neutrófilos.

CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P não apresenta atividades agonistas neutrofílicas. Embora CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P fosse certamente um ligando de alta afinidade para os receptores CXCL8 neutrofílicos, seria igualmente bom realizar o mesmo como um agonista ou um antagonista. Desse modo os experimentos seguintes se voltaram para as atividades agonistas potenciais dos análogos CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R que foram gerados, como medidos por suas capacidades para quimioatrair essas células ou induzir a liberação da enzima hidrolítica granular neutrofílica-glicuronidase in vitro (Figura 2). Foi descoberto que mesmo a 100 ng/mL, CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P foi um fraco quimioatraente, induzindo 13,9 +/- 4% ou 5,4 +/- 2% das respostas induzidas por 1 ou 100 ng/mL CXCL8 (p,0,001), respectivamente. A 100 ng/mL, o análogo CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/P32G induziu uma resposta que foi claramente substancial (38,3 +/- 2% da resposta de CXCL8), enquanto que o análogo combinado CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P/P32G também não foi um quimioatraente eficaz. Quando foi avaliada suas capacidades de induzir a liberação da glicuronidase, foi descoberto que nenhum dos análogos CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R foi tão eficaz quanto CXCL8 em induzir liberação do mediador. Em realidade, foi descoberto apenas liberação de base com qualquer deles a 10 ng/mL, e a 100 ng/mL e apenas CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P/P32G induziu significativas respostas neutrofílicas (Figura 2). Dada a combinada inibição competitiva de CXCL8 e os dados do agonista neutrofílico, a partir desse momento as atenções foram voltadas para CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P.

CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P bloqueia as respostas quimiotáticas neutrofílicas a ambos os ligandos CXCR1 e CXCR2. O efeito mais patogênico da inapropriada expressão quimioquina ELR<sup>+</sup> é a atração de células inflamatórias ao interior dos tecidos. Desse modo, foi avaliado em seguida o impacto de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P sobre as respostas quimiotáticas de neutrófilos a altas doses de CXCL8 (Figura 3). Como previsto a partir das observações in vivo em ovelhas e gado (33), 1 µg/mL (129 nM) CXCL8 foi muito fortemente quimioatrativo, mas doses ainda muito baixas de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P melhoraram esta resposta. A adição de 12,9 pM CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P reduziu a resposta quimiotática das células em 33%. A IC<sub>50</sub> para CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P sob essas condições foi de 0,11 nM, enquanto que o

bloqueio completo dessa resposta CXCL8 foi conseguido com 10 nM CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P.

Quando da realização dos testes de eficácia de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P em bloquear respostas para provocações mais sutis de CXCL8, os estudos foram também estendidos para avaliar a capacidade de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P para bloquear respostas neutrofílicas ao CXCL8 humano bem como aos ligandos CXCR2 humano-específicos CXCL1 e CXCL5. Cada um desses é expressado nos tecidos de pacientes afetados de pancreatite (Hochreiter, W. W. et al. 2000. *Urology*. 56: 1025-1029) ou ARDS (Villard et al., 1995) a 1-10 ng/mL. Foi descoberto que neutrófilos bovinos foram responsivos a 1 ng/mL hCXCL1 ou hCXCL5, e similarmente responsivos a 10 ng/mL hCXCL8 (FIG. 3), de modo que essas doses foram empregadas para testar os efeitos de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P nas respostas neutrofílicas desses ligandos. As respostas neutrofílicas a hCXCL1 and hCXCL5 foram reduzidas a 50% por meio de 0,26 e 0,06 nM de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P, respectivamente, enquanto suas respostas a hCXCL8 foram reduzidas em 50% por meio de 0,04 nM CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P (Figura 3). Esses dados indicam que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P pode antagonizar as ações de múltiplos componentes da sub-família de quimiocinas ELR-CXC.

CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P é um efetivo antagonista in vitro das quimiocinas neutrofílicas expressas em pneumonia bacteriana ou lesões por mastite. Foi estado o nível até o qual o presente antagonista poderia bloquear a disposição de quimioatraentes neutrofílicos expressos dentro dos complexos ambientes inflamatórios in vivo. Desse modo, foram escolhidas duas doenças nas quais a ativação neutrofílica acionada por quimiocina contribui de modo importante para a progressão da patologia, mastite, e maneiimiose pneumônica. Foi utilizada um modelo endotoxina de mastite (Persson, K. et al., 1993. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37:99-112), no qual foi infundido 5 µg de endotoxina/cavidade mamilar e 15 h mais tarde foi lavada cada cavidade. Os neutrófilos compreenderam 82 e 6%, respectivamente, das células provenientes das cavidades controladas por endotoxina e salino, com a massa maior das células restantes compreendendo macrófagos. Os fluidos de lavagem diluídos (1:10) induziram fortes respostas quimiotáticas neutrofílicas in vivo, e a adição de anticorpos anti-CXCL8 às amostras reduziu maximalmente estas em 73 +/- 8% (Figura 4A), relativamente ao meio de controle. Por outro lado, a adição de 1 ng/mL de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P às amostras reduziu suas atividades quimiotáticas em 97% +/- 3%.

Neutrófilos também compreenderam 93 +/- 12% das células recuperadas de BALF de gado com avançada maneiimiose pneumônica. Quando testadas in vitro, essas amostras também foram fortemente quimiotática para neutrófilos, e a adição de anticorpos anti-CXCL8 reduziu maximalmente suas atividades quimiotáticas neutrofílicas em 73 +/- 5% (Figura 4A). O tratamento dessas amostras BALF com 1 ou 10 ng/mL de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P reduziu as respostas neutrofílicas em 75 +/- 9 ou 93 +/- 9%, respectivamente, relativamente aos

meios de controle. Esses dados sugerem que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P bloqueia as ações de quimioatraentes CXCL8 e não-CXCL8 nessas amostras.

A fim de confirmar essas observações usando uma estratégia alternativa, foi em seguida depletada amostras de pneumonia bacteriana BALF de CXCL8 usando matrizes de imunoafinidade, em seguida avaliada a eficácia de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P em bloquear as atividades quimiotáticas neutrofílicas residuais nas amostras (Figura 4B). As amostras lesio-  
nais de BALF não tratadas continham 3.215 +/- 275 pg/mL CXCL8, enquanto que a imunoa-  
finidade-absorvida BALF continha 24 +/- 17 pg/mL CXCL8. Nessas series de experimentos a  
resposta neutrofílica para as amostras BALF depletadas-CXCL8 foi de 65,4 +/- 4% de suas  
respostas em relação as amostras não absorvidas. É sabido que CXCL8 pode contribuir tão  
pouco quanto 15% das atividades quimiotáticas neutrofílicas na maneiomiose pneumônica  
BALF obtida a partir de uma disposição de casos clínicos (Caswell et al., 2001). Enquanto  
os tratamentos de depleção de CXCL8 foram eficazes em 99% em remover CXCL8, resta-  
ram nessas amostras quantidades substanciais das atividades quimiotáticas neutrofílicas, e  
a adição de 1 ng/mL CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P anulou completamente seus efeitos cumulativos  
(Figura 4B). Esses dados confirmaram inequivocamente que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P tam-  
bém antagoniza o espectro de quimioatraentes não-IL-8 expressos nessas amostras.

CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P é altamente eficaz em bloquear a inflamação neutrofílica endotoxina-induzida in vivo. Nos últimos experimentos, foi avaliada a capacidade de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P para bloquear respostas inflamatórias endotoxina-induzidas na pele de gado, bem como os quadros de tempo durante os quais ela foi eficaz. Os animais foram provocados de modo intradérmico com 1 µg endotoxina bacteriana 15 h antes (resposta controle positivo interno), ou em três diferentes momentos após, injeção intravenosa, subcu-  
tânea ou intramuscular de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P (75 µg/kg). Desse modo biópsias de pun-  
ção de sítios de reação endotoxina com 15 horas foram tomadas 15 minutos antes do trata-  
mento e a 16, 48 e 72 h após a injeção do antagonista em cada animal, e os números de neutrófilos infiltrantes foram determinados em um modo cego quanto a derme papilar (super-  
ficial), intermediária e reticular de cada biópsia. Antes dos tratamentos antagonistas, fortes  
respostas inflamatórias neutrofílicas eram evidentes nos sítios de provocação endotoxina  
em cada animal (Figura 5). Dentro das biópsias, as respostas na derme papilar foram bran-  
das em todos os animais (dados não mostrados) e se tornam progressivamente mais evi-  
denciadas com o aumento da profundidade da pele, tal que inflamação maximal (infiltração  
neutrofílica) foi observada em torno dos vasos sangüíneos na derme reticular (Figura 5A).  
Em seguida aos tratamentos CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P, as respostas inflamatórias observadas  
no intervalo de 16 h das biópsias foram suprimidos em 88-93%, enquanto que aqueles nas  
biópsias de 48 h foram suprimidos em 57% (intravenosa) a 97% (intradérmica), relativamen-  
te às suas respectivas respostas de pré-tratamento. Por volta das 72 h pós-tratamento os

efeitos do antagonista administrado de modo intravenoso teve tina se desgastado, enquanto que as respostas endotoxina no gado tratado de modo intradérmico e subcutâneo foram ainda suprimidos em 60%. Esses dados indicam claramente que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P é um antagonista altamente eficaz das respostas inflamatórias endotoxina-induzidas in vivo, que esses efeitos podem durar por 2-3 dias, e que a rota das aplicações influenciam notadamente a farmacocinética desse novo antagonista.

Foi descoberto que G31P antagoniza também os efeitos quimiotáticos ELR-CXC humanas CXCL8/IL-8 e CXCL5/ENA-78 nos neutrófilos humanos. Desse modo as atividades quimiotáticas de 0,1 a 500 ng/mL de um ou outro de CXCL8 (Figura 6, painel esquerdo) ou CXCL5/ENA-78 (Figura 6, painel direito) foram essencialmente completamente bloqueadas pela adição de 10 ng/mL do antagonista da presente invenção quanto aos ensaios de quimiotaxia. De modo similar, G31P bloqueou os efeitos quimiotáticos de CXCL8 quanto a eosinófilos CXCR1/CXCR2-positivos. Foi descoberto também que eosinófilos provenientes de indivíduos atópicos ou asmáticos expressam ambos os receptores de quimiocina ELR-CXC, e são responsivos a CXCL8 (Figura 7, painel esquerdo). Os efeitos quimiotáticos de 100 ng/mL CXCL8, mas não do ligando CCR3 CCL11/eotaxina, sobre eosinófilos do sangue periférico purificado de um doador levemente atópico, não asmático (pureza 99%) foram completamente anulados pela adição de 10 ng/mL G31P aos ensaios de quimiotaxia (Figura 7, painel intermediário). Quando testados contra eosinófilos purificados provenientes de um paciente hipereosinofílico (Figura 7, painel direito), G31P neutralizou as respostas dessas células a um ou outro de CXCL8/IL-8 ou CXCL5/ENA-78.

Esses dados indicam claramente que G31P bovino é um antagonista eficaz das quimiocinas ELR-CXC bovinas expressas in vivo em resposta a provocação endotoxina, mas também antagoniza completamente as respostas do receptor quimiocina ELR-CXC neutrofílico e eosinofílico a CXCL8 e CXCL5, ligandos conhecidos para ambos o CXCR1 e CXCR2.

#### G31P bovino humanizado.

Foi gerada uma proteína quimérica bovino-humano, compreendendo a metade amino-terminal de G31P bovino e a metade carboxi-terminal de CXCL8 humano (bhG31P) (SEQ ID No. 10), e descoberto que ela tem forte atividade antagonista neutrofílica in vitro e in vivo; em realidade, bhG31P pode ter atividade maior que bG31P, ou das formas humanas de G31P. Foram também geradas e caracterizadas 5 formas alternativas de bhG31P (SEQ ID No. 26-30) em que aminoácidos humanos foram substituídos para os remanescentes aminoácidos bovinos - nenhum destes aumentou a atividade antagonista dos análogos, e algumas evidências sugerem que eles podem reduzir a atividade antagonista.

Como uma abordagem em gerar um fármaco humano, foi empreendida a humanização de bG31P. Além disso, uma vez que a 'metade' amino terminal de CXCL8 é mais im-

portante para a atividade biológica de CXCL8 que a terminação carbóxi, e devido a 'metade' carbóxi-terminal de CXCL8 conter 10 dos 15 aminoácidos discrepantes bovino-humano da molécula, foi primeiramente avaliado se a totalidade do conjunto de ligação da terminação carbóxi de hCXCL8 (isto é, que codifica aminoácidos 45-72) por sobre a metade amino de bG31P (isto é, que codifica aminoácidos 3-44) poderia influenciar sua atividade. Especificamente, a metade amino de CXCL8 é conhecida portar os motivos de reconhecimento e de sinalização do receptor crítico e de suas estruturas andaimes associadas.

Foi gerada a proteína quimérica G31P bovino-humano, bCXCL8<sub>(3-44)</sub>K11R/G31P-hCXCL8<sub>(45-72)</sub>(bhG31P) (SEQ ID No. 10), em seguida usado o cDNA para essa proteína como um gabarito para a substituição dos restantes resíduos aminoácidos bovino-humano discrepantes um a um, como discutido acima.

Foi expresso e purificado cada construto usando SOP para a clivagem enteroquinase (bhG31P<sup>+0</sup> & bhG31P isoformas apenas) ou trombina (todos os outros análogos), e a caracterização delas por SDS-PAGE e Western blotting (Fig 8). Cada isoforma tinha 8 kD de tamanho, embora as soluções de isoformas bhG31P/T15K (SEQ ID No. 28) e bhG31P/S37T (SEQ ID No. 30) aparentassem conter o que poderia ser interpretado como baixos níveis de dímeros, formados talvez como um resultado das altas concentrações de proteína nas amostras ou alternativamente talvez relacionadas com a perturbação dessas partes dos análogos G31P associadas com a dimerização. Diversos aminoácidos nessa região têm sido reportados anteriormente influenciar significativamente a dimerização de CXCL8 humano.

Foi descoberto que bhG31P (isto é, bCXCL8(3-44)K11R/G31P-hCXCL8(45-72)) manteve a atividade antagonista da quimiocina ELR-CXC de bG31P, tal que ela bloqueou as respostas do intermediário oxigênio reativo ou quimiotático (ROI) de neutrófilos humanos para CXCL8 humano (Figura 9).

Quando se humanizou ainda mais essa proteína quimérica bovino-humano mediante introdução de adicionais aminoácidos humano-equivalentes em lugar dos resíduos discrepantes (isto é, T3K (SEQ ID No. 26), H13Y (SEQ ID No. 27), T15K (SEQ ID No. 28), E35A (SEQ ID No. 29), e S37T (SEQ ID No. 30)), foi descoberto que essas provocações na realidade não tinham efeito significativo sobre a atividade a quimera 50:50 bh, nem tornando qualquer dos análogos agonísticos quanto a neutrófilos como avaliado nos ensaios de quimiotaxia (Figura 10A) ou em termos de reduzir significativamente a atividade antagonística como avaliado pela inibição da quimiotaxia ou pela inibição da liberação de intermediário oxigênio reativo (Figura 10B).

Como notado, foi avaliado o impacto sobre a atividade de bhG31P da variação da sequência amino-terminal (isto é, hG31P<sup>+6</sup>, bhG31P<sup>+2</sup>, bhG31P<sup>+0</sup>, bhG31P<sup>-1</sup>) (SEQ ID Nos. 14, 13, 11 e 12, respectivamente), medindo a atividade de cada um nos ensaios de inibição da quimiotaxia e de inibição do intermediário oxigênio reativo (Figura 11). Embora tenha sido

descoberto que a eliminação de Lys3 tende a reduzir a atividade de bhG31P, as atividades antagonistas dos outros análogos foram a grosso modo equivalentes (Fig. 11). Como será notado por aqueles usualmente versados na técnica, esses dados indicam que adições N-terminais de variados comprimentos e variadas composições aminoácidos seriam toleradas sem significativa ruptura da atividade de G31P. Conseqüentemente, adições N-terminais de aminoácidos aleatórios 0-10 ou aminoácidos aleatórios 0-9 ou aminoácidos aleatórios 0-8 ou aminoácidos aleatórios 0-7 ou aminoácidos aleatórios 0-6 ou aminoácidos aleatórios 0-5 ou aminoácidos aleatórios 0-4 ou aminoácidos aleatórios 0-3 ou aminoácidos aleatórios 0-2 .

Tomados em conjunto, esses dados sugerem que múltiplas formas quiméricas bovino-humanas of G31P são úteis antagonistas neutrofílicos. Deve ser notado, todavia, que ao tempo em que estavam sendo completadas a caracterização dessas quimeras, foi determinado que as formas humanas de CXCL8<sub>(3-72)</sub>K11R/G31P foram tão eficazes quanto bG31P em bloquear respostas neutrofílicas conduzidas por CXCL8, e que hG31P foi também um antagonista altamente eficaz da inflamação neutrofílica conduzida por endotoxina bacteriana e patologia in vivo. Desse modo, nesse momento foram envidados a maior parte dos esforços para caracterizar de modo mais completo os construtos hG31P.

### 3. G31P humano (hG31P).

Foi feito contrato com Takara Biotechnology Co., Dalian, PRC para sintetizar um cDNA de CXCL8 humano de comprimento completo, o qual foi clonado dentro de pGEX-2T utilizando terminações 5' (BamHI) e 3' (EcoRI) compatíveis. Esse cDNA pGEX-hCXCL8 foi usado como um gabarito para a mutagênese sítio-direcionada para gerar pGEX-hCXCL8<sub>(3-72)</sub>K11R (hK11R) e pGEX-hCXCL8<sub>(3-72)</sub>K11R/G31P (hG31P), os quais foram expressos como proteínas de fusão GST e purificados por clivagem trombina usando procedimentos operacionais padrões. Como com bhG31P (acima), foram geradas duas famílias de moléculas recombinantes G31P-relacionadas que foram precedidas por um outro de seis (Gly-Ser-Met-Gly-Gly-Ser) ou dois (Gly-Ser) aminoácidos estranhos, referidos como hG31P<sup>+6</sup> (SEQ ID No. 14) ou hG31P<sup>+2</sup> (SEQ ID No. 13), mas também famílias de construtos adicionais sem aminoácidos exógenos (G31P<sup>+0</sup>) (SEQ ID No. 11) ou que foram também amino terminal-deletado (isto é, G31P<sup>-1</sup>, G31P<sup>-3</sup>, ou G31P<sup>-5</sup>). Foram também introduzidos no hG31P<sup>+6</sup> os aminoácidos bovinos equivalentes nas posições aminoácidos 35 (SEQ ID No. 36), 37 (SEQ ID No. 37), 44 (SEQ ID No. 38), 47 (SEQ ID No. 39) e 49 (SEQ ID No. 40). Cada proteína foi expressada, purificada e caracterizada por meio de SDS-PAGE e Western blotting. Como previsto, cada uma compreendia fita única de ~8kD que foi reativa com anticorpos anti-CXCL8.

Caracterização biológica do análogo CXCL8s. Foram usados os ensaios de quimiotaxia com neutrófilos humanos purificados para avaliar as atividades agonista e antagonista CXCL8 de cada construto (Figura 12).

hCXCL8<sub>(3-72)</sub>K11R(hK11R)-hK11R teve atividade específica significativamente maior (ensaio de quimiotaxia neutrofílica) que o CXCL8 humano, tal que ele representa um agonista neutrofílico muito mais forte que a quimiocina humana naturalmente encontrada. Desse modo o hK11R pode ser usado em situações clínicas que demandem por aumentado recrutamento/ativação neutrofílica.

Substituições hCXCL8<sub>(3-72)</sub>K1 1R/G31P (hG31P)-G31P dentro de hK11R<sup>+6</sup> eliminou essencialmente a atividade agonista dessa molécula, tal que hG31P<sup>+6</sup> foi pelo menos tão eficaz quanto um antagonista de quimiotaxia induzida por CXCL8 como bG31P<sup>+6</sup>.

As diversas estruturas N-terminais de hG31P influenciaram a atividade biológica dos análogos, tal que hG31P<sup>+6</sup> e hG31P<sup>+2</sup> aparentaram serem antagonistas superiores de quimiotaxia de CXCL8, enquanto que hG31P<sup>+0</sup> e hG31P<sup>+2</sup> possuíram atividade antagonista de quimiotaxia menos significativa relativamente ao bG31P<sup>+6</sup>. De modo interessante, quando comparado quanto às suas capacidades para inibir a liberação FOI CXCL8-induzida a partir de neutrófilos humanos, as diversas seqüências N-terminais tiveram muito menos efeitos sobre as atividades antagonistas dos análogos, com cada análogo exibindo atividade antagonista de liberação ROI altamente significativa. A liberação de ROI é dependente da atividade da NADPH oxidase em neutrófilos, e foi reportado que a NADPH oxidase está sob o controle de CXCR2, mas não de CXCR1.

O argumento para os diferentes graus de eficácia desses diversos análogos de substituição N-terminal pode ser que os dois ou seis resíduos extras em hG31P<sup>+2</sup> ou hG31P<sup>+6</sup> podem reduzir ainda mais o potencial da interação do motivo ELR (isto é no G31P), talvez por impedimento estérico.

A fim de documentar ainda mais as capacidades de hG31P para antagonizar as funções de CXCR2, foi avaliada sua capacidade para inibir a quimiotaxia neutrofílica CXCL5 (ENA-78)-dependente; CXCL5 é um ligante CXCR2-específico, mas não um ligante CXCR1-específico. hG31P<sup>+6</sup> antagonizou sua atividade quimiotática num modo dose-dependente (Figura 14).

Foi também avaliado se os diversos análogos N-terminais de hG31P possuíam atividade agonista significativa, relativamente ao PBS sozinho ou em um ensaio de quimiotaxia neutrofílica. Não foram descobertas respostas significativas da parte de neutrófilos relativamente a qualquer dos análogos N-terminais alternativos.

Foi em seguida avaliada se as substituições adicionais dentro de hG31P<sup>+6</sup> dos aminoácidos discrepantes humano-bovinos poderiam aumentar essa atividade antagonista do hG31P. Foram gerados e testados hG31P/A35E, hG31P/L49V, hG31P/R47D, hG31P/S44T e hG31P/T37S e descoberto que todos foram agonistas ineficazes. A introdução de aminoácidos bovino-equivalentes nas posições 35, 37, 44, 47 ou 49 reduziu diferencialmente a atividade antagonista desses análogos, tal que os análogos R47D e S44T pareceram aumen-

tar a atividade de CXCL8, preferivelmente que inibi-la, enquanto que os análogos A35E, L49V e T37S não apresentaram significativa atividade de inibição da quimiotaxia.

Foi previamente documentado que bG31P pode antagonizar as atividades quimiotáticas neutrofílicas presentes no esputo proveniente de pacientes com fibrose cística (CF) que experimentam exacerbações bacterianas de pneumonia. Desse modo, foi testada a capacidade de hG31P para bloquear as atividades quimiotáticas neutrofílicas presentes no esputo proveniente de pacientes com CF branda (n=1), moderada (n=2), severa (n=2), ou avançada (n=2), mas também proveniente de pacientes com bronquiectasia não classificada (n=2; bact), moderada (n=2), ou severa (n=2). Esputos provenientes de pacientes diagnosticados com asma, DPOC, ou sinusite/bronquite geral foram também testados com ou sem hG31P<sup>+</sup>. Com a exceção do paciente de asma com um controle, todos os outros foram cultura-positivos para as diversas espécies bacterianas (por exemplo, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*). Cada amostra foi titulada em experimentos preliminares para determinar a diluição ótima para uso no ensaio de quimiotaxia. G31P foi eficaz para bloquear de modo marcante as atividades quimiotáticas neutrofílicas presentes em todas as amostras, exceto aquelas provenientes de pacientes de CF avançada. Isso sugere que uma etiologia pode existir para a patologia observada em pacientes com CF avançada.

#### hG31P antagoniza a inflamação neutrofílica in vivo

Foi previamente documentada a capacidade de bG31P para bloquear inflamação neutrofílica dérmica induzida por endotoxina e patologia de endotoxemia das vias respiratórias. Desse modo foi em seguida avaliada a atividade de hG31P em modelos de endotoxemia das vias respiratórias.

#### Modelo rato da endotoxemia das vias respiratórias

Na medida em que ratos são animais pequenos e isso iria requerer substancialmente menos G31P que em porcos da Índia (o modelo padrão), foram primeiramente testados os efeitos protetores de hG31P<sup>+</sup> sobre a inflamação neutrofílica em ratos. Nos testes preliminares foi determinado que a dose LPS de 1,5 mg/kg proporcionou uma apropriada dose de provocação para ratos BALB/c; isto está em absoluto contraste aos porcos da Índia, onde 5 µg/kg de LPS induz uma forte neutrofilia, pirexia das vias respiratórias, e uma resposta hemorrágica pleural pulmonar. Num experimento em um único rato (n=5/grupo, aos ratos foram dados salino ou 100, 250, ou 500 µg/kg de hG31P<sup>+</sup> s.c, em seguida uma hora mais tarde eles foram provocados de modo intranasal, sob anestesia leve por gás isoflurano, com LPS (1/5 mg/kg). Após 16 horas, os animais foram eutanasiados usando CO<sub>2</sub>, em seguida o sangue, fluido de lavagem alveolar bronquial (BAL), e tecidos pulmonares foram tomados para a análise. Embora um ensaio piloto anterior tenha mostrado que 150 µg/kg de bG31P teve pouco efeito em um modelo peritonite LPS a hG31P<sup>+</sup> foi altamente eficaz em reduzir as células brancas totais do sangue das vias respiratórias e a infiltração neutrofílica,

neutrofilia parenquimal pulmonar, e, a um nível mais baixo e variável, também a aparência das células vermelhas do sangue nas vias respiratórias (Figura 17).

#### Modelo porco da índia de endotoxemia das vias respiratórias

Foi também empregado um modelo porco da índia da endotoxemia das vias respi-  
 5 ratórias em três experimentos. Em um, aos animais foram dadas uma dose supra-ótima de  
 endotoxina ( $50 \mu\text{g/kg}$ ), enquanto que no segundo e terceiro eles foram provocados com a  
 dose LPS padrão de  $5 \mu\text{g/kg}$ , mas com G31P aplicado em níveis variados. Em cada experi-  
 mento, os animais foram provocados de modo intranasal com LPS e tratados s.c. ao mesmo  
 tempo com G31P. Quinze horas mais tarde, os animais foram sacrificados e o sangue peri-  
 10 férico deles (diferenciais WBC) e respostas pulmonares (números WBS BAL, diferenciais, e  
 níveis de produto de desgranulação neutrofílica, e neutrofilia tecidual) foram avaliados como  
 acima.

#### Experimento de provocação LPS com alta dose (mórbida)

Em doses de  $> 50 \mu\text{g/kg}$ , LPS induz graves danos pulmonares em porcos da índia,  
 15 incluindo grave hemorragia para dentro das vias respiratórias, embora nessas doses a infil-  
 tração neutrofílica dos pulmões é embotada, relativamente àquela observada com  $\pm 5 \mu\text{g/kg}$   
 LPS. Foi descoberto ainda com provocação de  $50 \mu\text{g/kg}$  LPS, hG31P<sup>+6</sup> foi muito eficaz  
 em reduzir a aparência das células vermelhas do sangue (RBC) nas vias respiratórias (Figu-  
 ra 18). O tratamento por G31P também reduziu os números médios de neutrófilos no BAL.

#### Eficácia de hG31P e hbG31P na patologia da endotoxemia das vias respiratórias

Foi comparada a eficácia terapêutica de hG31P<sup>+0</sup>, hG31P<sup>-1</sup>, hG31P<sup>+2</sup>, e hG31P<sup>+6</sup>,  
 bem como a quimera bovino-humano bhG31P<sup>+6</sup>, que aparentou ser altamente eficaz in vitro  
 contra o recrutamento neutrofílico dependente de CXCL8 humano. Novamente, foram apli-  
 cados  $250 \mu\text{g/kg}$  de cada isoforma G31P a grupos de porcos da índia (s.c; n=5), e a provo-  
 25 cação deles por meio das vias respiratórias com  $5 \mu\text{g/kg}$  E. coli LPS, em seguida 15 h mais  
 tarde os animais foram sacrificados e avaliada a neutrofilia do sangue periférico deles, e a  
 neutrofilia das vias respiratórias, e os níveis de células vermelhas no sangue, bem como os  
 níveis de dois marcadores neutrofílicos granulares, lactoferrin (um primeiro marcador espe-  
 cífico granular de neutrófilo) e mieloperoxidase (um segundo marcador específico granular  
 30 de neutrófilo). Nessa dose de  $250 \mu\text{g/kg}$ , cada uma das isoformas de G31P estadas essen-  
 cialmente removeram essencialmente a infiltração de neutrófilos para dentro das vias respi-  
 ratórias (neutrófilos BAL), e reduziram significativamente a aparência de RBC, lactoferrin e  
 mieloperoxidase no BAL (Figura 19). Dá a impressão de como se hG31P<sup>+2</sup> pode ter dada  
 proteção maior que os outros, mas não significativamente senão quando todos os parâme-  
 35 tros são levados em conta. A quimera bhG31P foi também altamente eficaz nesse sistema  
 em termos de cada um dos parâmetros avaliados.

#### Testes toxicológicos.

A realização de testes preliminares da toxicidade de bG31P foi realizada. A aplicação de bG31P (250  $\mu\text{g/kg}$ ) a três porcos da índia numa janela de tempo designada para otimizar a sensibilização imune (isto é, se as moléculas fossem um imunogênico) não induz quaisquer flutuações observáveis do normal nos níveis séricos do painel de enzimas hepáticas e renais. Não foram observadas alterações no comportamento do animal ou quanto ao seu estado de saúde. Além disso, avaliações histológicas preliminares do coração, rim, pulmão, fígado, intestinos, e desses animais não revelaram evidências de infiltrados inflamatórios, ou apoptose ou proliferação celular local, ou anormalidades histopatológicas. Foram feitos arranjos quanto a um patologista anatômico para avaliar de forma independente os tecidos. Não se foi capaz de detectar níveis discerníveis de reatividade do anticorpo anti-bG31P no soro desses animais, embora os ensaios empregados não sejam particularmente sensíveis.

De importância para a geração de hG31P ou bG31P que utiliza um sistema de expressão procariótico (isto é, bacteriano), foi descoberto que as preparações são significativamente contaminadas com endotoxina bacteriana. Quando passado sobre colunas comerciais de remoção de endotoxina para reduzir a carga de endotoxina do fármaco, foi descoberto que o uso de colunas de remoção de endotoxina resultou em perdas inaceitavelmente altas de G31P. O tratamento in vivo de porcos da índia com os níveis de endotoxina encontrados em doses terapêuticas de G31P não imita a atividade terapêutica de G31P.

#### Estudos de eficácia

Em um experimento foi empregado hG31P+6 a 50  $\mu\text{g/kg}$  (isto é, 20% da dose ótima para bG31P). Porcos da índia foram provocados com 5  $\mu\text{g/kg}$  of LPS e tratados com essa baixa dose de hG31P. Foi descoberto que hG31P+2 e hG31P+6 mantiveram apenas modesta eficácia em termos de reduzir a infiltração neutrofílica, mas foi ainda eficaz em reduzir a migração das células vermelhas do sangue para dentro das vias respiratórias (o significado dessa descoberta não está inteiramente claro, mas ela sugere o potencial para um outro grau de complexidade nos mecanismos por meio dos quais o fármaco atua).

Em uma outra abordagem in vivo usando o modelo de endotoxemia das vias respiratórias, porcos da índia foram provocados com uma dose de LPS conhecida induzir graves hemorragias pulmonares, e tratados com 250  $\mu\text{g/kg}$  hG31P (ver Figura 18). Sabe-se a partir de estudos anteriores que nessa elevada dose de LPS os neutrófilos são apenas fracamente alcançados a partir da vasculatura ao interior das vias respiratórias.

Em um experimento foi empregado hG31P<sup>+6</sup> a 50  $\mu\text{g/kg}$  (isto é, 20% da dose ótima para bG31P). Porcos da índia foram provocados com 5  $\mu\text{g/kg}$  of LPS e tratados com essa baixa dose de hG31P. Foi descoberto que hG31P e hG31P mantiveram apenas modesta eficácia em termos de reduzir a infiltração neutrofílica, mas foi ainda eficaz em reduzir a migração das células vermelhas do sangue para dentro das vias respiratórias (o significado

dessa descoberta não está inteiramente claro, mas ela sugere o potencial para um outro grau de complexidade nos mecanismos por meio dos quais o fármaco atua).

Em uma outra abordagem in vivo usando o modelo de endotoxemia das vias respiratórias, porcos da índia foram provocados com 50 mg/kg de LPS, uma dose conhecida induzir graves hemorragias pulmonares, e tratados com 250  $\mu$ g/kg hG31P (ver Figura 18). Sabe-se a partir de estudos anteriores que nessa elevada dose de LPS os neutrófilos são apenas fracamente alcançados a partir da vasculatura ao interior das vias respiratórias. Não obstante, hG31P teve efeitos significativos na redução do alto nível de extravasamento de RBC para dentro das vias respiratórias observados em animais provocados com altas doses de LPS, tratados com salino (Figura 18) e tendeu a reduzir a resposta neutrofílica das vias respiratórias e a mobilização neutrofílica do sangue periférico associada com essa provocação (Fig. 18).

#### Discussão

Foi demonstrado aqui que CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P é um antagonista de alta afinidade de múltiplas quimiocinas ELR-CXC. In vitro, esse antagonista efetivamente bloqueou a totalidade das atividades quimiotáticas neutrofílicas expressadas em lesões inflamatórias de brandas a intensas dentro de dois compartimentos mucosais (pulmões, e glândulas mamárias), e bloqueou até 97% das respostas inflamatórias endotoxina-induzidas in vivo. CXCL8 foi identificado o como um mais importante quimioatraente nas amostras de pneumonia e mastite, mas também demonstrou que 35% da atividade nas amostras de pneumonia bacteriana foi devido aos quimioatraentes não-CXCL8 que foram também eficazmente antagonizados por CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P. Com base nos estudos das respostas inflamatórias em roedores (Tateda et al., 2001 ; Tsai et al., 2000), gado (Caswell et al., 1997), e humanos (Villard et al., 1995), é claro que essas amostras podem conter numerosas quimiocinas ELR<sup>+</sup> CXC (por exemplo, CXCL5, e CXCL8) para as quais CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P possui um efeito antagonístico.

#### REFERÊNCIAS

1. Baggiolini, M. 1998. Quimiocinas and leukocyte traffic. *Nature*. 392:565-568.
2. Sekido, N., N. Mukaida, A. Harada, I. Nakanishi, Y. Watanabe, and K. Matsushima. 1993. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*. 365:654-657.
3. Villard, J., F. Dayer Pastore, J. Hamacher, J. D. Aubert, S. Schlegel Haueter, and L. P. Nicod. 1995. GRO alpha and interleukin-8 in *Pneumocystis carinii* ou pneumonia bacteriana and adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152: 1549-1554.
4. Mukaida, N., T. Matsumoto, K. Yokoi, A. Harada, and K. Matsushima. 1998. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-

8 (IL-8). *Inflamm. Res.* 47 (suppl. 3):S151-157.

5. Harada, A., N. Mukaida, and K. Matsushima. 1996. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. *Inflamm. Res.* 2:482-489.

6. Walley, K. R., N. W. Lukacs, T. J. Standiford, R. M. Strieter, and S. L. Kunkel. 1997. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. *Infect. Immun.* 65:3847-3851. 7. Slocumbe, R., J. Malark, R. Ingersoll, F. Derksen, and N. Robinson. 1985.

Importance of neutrófilos in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am. J. Vet. Res.* 46:2253.

8. Caswell, J. L., D. M. Middleton, S. D. Sorden, and J. R. Gordon. 1997. Expression of the neutrophil chemoattractant interleukin-8 in the lesions of bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Pathol.* 35: 124-131.

9. Caswell, J. L., D. M. Middleton, and J. R. Gordon. 2001. The importance of interleukin-8 as a neutrophil chemoattractant in the lungs of cattle with pneumonic pasteurellosis. *Canad. J. Vet. Res.* 65:229-232.

10. Baggiolini, M., and B. Moser. 1997. Blocking chemokine receptors. *J. Exp. Med.* 186: 189-191.

11. Ahuja, S. K., and P. M. Murphy. 1996. As chemokines CXC growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell derived neutrophil-activating peptide-78 are potent

agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J. Biol. Chem.* 271 :20545-20550.

12. Loetscher, P., M. Seitz, I. Clark Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. 1994. Both interleukin-8 receptors independently mediate chemotaxis. Jurkat cells transfected with IL-8R1 or IL-8R2 migrate in response to IL-8, GRO alpha and NAP-2. *FEBS Lett.*

341 : 187-192.

13. Wuyts, A., P. Proost, J. P. Lenaerts, A. Ben-Baruch, J. Van Damme, and J. M. Wang. 1998. Differential usage of the chemokine CXC receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur. J. Biochem.* 255:67-73.

14. Richardson, R., B. Pridgen, B. Haribabu, H. Ali, and R. Snyderman. 1998. Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. *J. Biol. Chem.* 273:23830-23836.

15. McCall, S. R., and I. Clark Lewis. 1999. Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by chemokine CXC receptor antagonists. *J. Immunol.* 163:2829-2835.

16. Jones, S. A., M. Wolf, S. Qin, C. R. Mackay, and M. Baggiolini. 1996. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:6682-6686.
- 5        17. White, J. R., J. M. Lee, P. R. Young, R. P. Hertzberg, A. J. Jurewicz, M. A. Chaikin, K. Widdowson, J. J. Foley, L. D. Martin, D. E. Griswold, and H. M. Sarau. 1998. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J. Biol. Chem.* 273:10095-10098.
- 10       18. Tateda, K., T. A. Moore, M. W. Newstead, W. C. Tsai, X. Zeng, J. C. Deng, G. Chen, R. Reddy, K. Yamaguchi, and T. J. Standiford. 2001. Quimiocine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of *Legionella pneumonia*: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. *Infect. Immun.* 69:2017-2024.
- 15       19. Tsai, W. C., R. M. Strieter, B. Mehrad, M. W. Newstead, X. Zeng, and T. J. Standiford. 2000. Quimiocine CXC receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. *Infect. Immun.* 68:4289-4296.
- 20       20. Goodman, R. B., R. M. Strieter, C. W. Frevert, C. J. Cummings, P. Tekamp Olson, S. L. Kunkel, A. Walz, and T. R. Martin. 1998. Quantitative comparison of C-X-C quimiocines produced by endotoxin-stimulated human alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 275:L87-95.
- 25       21. Nufer, O., M. Corbett, and A. Walz. 1999. Amino-terminal processing of quimiocine ENA-78 regulates biological activity. *Biochem.* 38:636-642.
- 30       22. Wuyts, A., A. D'Haese, V. Cremers, P. Menten, J. P. Lenaerts, A. De Loof, H. Heremans, P. Proost, and J. Van Damme. 1999. NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal truncations of murine granulocyte chemotactic protein-2 augment the *in vitro* and *in vivo* neutrophil chemotactic potency. *J. Leukoc. Biol.* 163:6155-6163.
- 35       23. Clark Lewis, I., B. Dewald, M. Loetscher, B. Moser, and M. Baggiolini. 1994. Structural requirements for interleukin-8 function identified by design of analogs and quimiocine CXC hybrids. *J. Biol. Chem.* 269:16075-16081.
24. Li, F., and J. R. Gordon. 2001. IL-8<sub>sub.(3-74)</sub>KI IR is a high affinity agonist of the neutrophil CXCR1 and CXCR2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 286:595-600.
25. Moser, B., B. Dewald, L. Barella, C. Schumacher, M. Baggiolini, and I. Clark Lewis. 1993. Interleukin-8 antagonists generated by N-terminal modification. *J. Biol. Chem.* 268:7125-7128.
26. Caswell, J. L., D. M. Middleton, and J. R. Gordon. 1998. Production and functional characterization of recombinant bovine interleukin-8 as a neutrophil activator and specific chemoattractant *in vitro* and *in vivo*. *Vet. Immunol. Immunopath.* 67:327-340.
27. Coligan, J., A. Kruisbeek, D. Margulies, E. Shevach, and W. Strober. 1994.

- Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, New York. 28. Waller, K. P. 1997. Modulation de endotoxina-induced inflammation in the bovino teat using antagonists/inhibitors to leukotrienes, platelet activating factor and interleukin 1 beta. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57:239-251.
- 5           29. Cairns, C. M., J. R. Gordon, F. Li, M. E. Baca-Estrada, T. N. Moyana, and J. Xiang. 2001. Lymphotactin expression by engineered myeloma tumor cells drives tumor regression. Mediation by CD4+ and CD8+ T cells and neutrófilos expressing XCR1 receptors. *J. Immunol.* 167:57-65.
30. Gordon, J. R. 2000. TGFb and TNFa secretion by mast cells stimulated via the  
10 FcεRI activates fibroblasts for high level production of monocyte chemoattractant protein-1. *Cell Immunol.* 201 :42-49.
31. Gordon, J. R., and S. J. Galli. 1994. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the FcεRI. Role for mast cell-derived transforming growth factor-β and tumor necrosis factor-α. *J. Exp. Med.* 180:2027-2037.
- 15           32. Gordon, J. R. 2000. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression during cutaneous allergic responses in mice is mast cell-dependent and largely mediates monocyte recruitment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 110-116.
33. Caswell, J. L. 1998. The role of interleukin-8 as a neutrophil chemoattractant in bovino bronchopneumonia. Ph.D. thesis, Department of Veterinary  
20 Pathology, University of Saskatchewan. 241 pg.
34. Hochreiter, W. W., R. B. Nadler, A. E. Koch, P. L. Campbell, M. Ludwig, W. Weidner, and A. J. Schaeffer. 2000. Evaluation of the cytokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide-78 as indicators of inflammation in prostatic secretions. *Urology.* 56:1025-1029.
- 25           35. Persson, K., I. Larsson, and C. Hallen Sandgren. 1993. Effects of certain inflammatory mediators on bovino neutrophil migration in vivo and in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37:99-112.
36. Gray, G. D., K. A. Knight, R. D. Nelson, and M. Herron, J. 1982. Chemotactic requirements of bovino leukocytes. *Am. J. Vet. Res.* 43:757-759.
- 30           37. Fernandez, H. N., P. M. Henson, A. Otani, and T. E. Hugli. 1978. Resposta quimiotática to humano C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J. Immunol.* 120: 109- 115. 38. Riollot, C, P. Rainard, and B. Poutrel. 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections com *Escherichia coli* and  
35 *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 7: 161-167.
39. Shuster, D. E., M. E. Kehrli, Jr., P. Rainard, and M. Paape. 1997. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary

infection com *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 65:3286-3292.

40. Bless, N. M., R. L. Warner, V. A. Padgaonkar, A. B. Lentsch, B. J. Czermak, H. Schmal, H. P. Friedl, and P. A. Ward. 1999. Roles for C-X-C quimiocinas and C5a in lung injury after hindlimb ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* 276:L57- 63.

5 41. Ember, J. A., S. D. Sanderson, T. E. Hugli, and E. L. Morgan. 1994. Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by humano C5a anaphylatoxin. *Am. J. Pathol.* 144:393-403.

42. Fisher, C, G. Slotman, S. Opal, J. Pribble, R. Bone, G. Emmanuel, D. Ng, D. Bloedow, and M. Catalano. 1994. Initial evaluation of humano recombinant interleukin-1  
10 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebocontrolled multicenter trial. The IL-IRA Sepsis Syndrome Study Group. *Crit. Care Med.* 22: 1 1-21.

43. Verbon, A., P. E. Dekkers, T. ten Hove, C. E. Hack, J. Pribble, T. Turner, S. Souza, T. Axtelle, F. Hoek, -.S. -J. van Deventer, and T. van der Poll. 2001. IC 14, an anti-  
15 CD 14 antibody, inhibits endotoxina-mediated symptoms and inflammatory responses in humans. *J.Immunol.* 166:3599-3605. 44. Clark Lewis, I., K. S. Kim, K. Rajarathnam, J. H. Gong, B. Dewald, B.

Moser, M. Baggiolini, and B. D. Sykes. 1995. Structure-activity relationships of quimiocinas. *J. Leukoc. Biol.* 57:703-711.

20 45. Jones, S. A., B. Dewald, I. Clark Lewis, and M. Baggiolini. 1997. Quimiocina antagonists that discriminate between interleukin-8 receptors. Selective blockers of CXCR2. *J. Biol. Chem.* 272: 16166-16169.

46. Hang, L., B. Frendeus, G. Godaly, and C. Svanborg. 2000. Interleukin-8 receptor knockout mice have subepithelial neutrophil entrapment and renal scarring following acute  
25 pyelonephritis. *J. Infect. Dis.* 182: 1738-1748.

47. Saurer, L., P. Reber, T. Schaffner, M. W. Buchler, C. Buri, A. Kappeler, A. Walz, H. Friess, and C. Mueller. 2000. Differential expression of quimiocinas in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterol.* 1 18:356-367.

48. Szekanecz, Z., R. M. Strieter, S. L. Kunkel, and A. E. Koch. 1998. Quimiocinas  
30 in rheumatoid arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* 20: 115-132.

49. MacDermott, R. P. 1999. Quimiocinas in the inflammatory bowel diseases. *J .Clin. Immunol.* 19:266-272.

50. Damas, J. K., L. Gullestad, T. Ueland, N. O. Solum, S. Simonsen, S. S. Froland, and P. Aukrust. 2000. CXC-quimiocinas, a new group of cytokines in congestive heart  
35 failure—possible role of platelets and monocytes. *Cardiovasc. Res.* 45:428-436.

51. Morsey, M., Y. Popowych, J. Kowalski, G. Gerlach, D. Godson, M. Campos, and

L. Babiuk. 1996. Molecular cloning and expression of bovino interleukin- 8. Microbial Pathogen. 20:203-212.

52. Benson, M., I. L. Strannegard, G. Wennergren, and O. Strannegard. 1999. Interleukin-5 and interleukin-8 in relation to eosinophils and neutrófilos in nasal fluids from school children com seasonal allergic rhinitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* 10: 178- 185. 53.
- 5 Hauser, U., M. Wagenmann, C. Rudack, and C. Bachert. 1997. Specific immunotherapy suppresses IL-8-levels in nasal secretions: A possible explanation for the inhibition of eosinophil migration. *Allergol.* 20: 184-191.
54. Sehmi, R., O. Cromwell, A. J. Wardlaw, R. Moqbel, and A. B. Kay. 1993. Interleukin-8 is a chemoattractant for eosinophils purified from subjects com a blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy* 23:1027-1036.
55. Ulfman, L. H., D. P. Joosten, J. A. van der Linden, J. W. Lammers, J. J. Zwaginga, and L. Koenderman. 2001. IL-8 induces a transient arrest of rolling eosinophils on humano endothelial cells. *J. Immunol.* 166:588-595.

Tabela 1

```

HUMBT00706 : SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR-VVEKFLKPAENS-- : 72
Rhesus      : SAKELRCECIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKEPFWQR-VVEKFVKRAENQNP : 74
Pig-tailed  : SAKELRCECIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKEPFWQR-VVEKFVKRAENQNP : 74
Red-crowna  : SAKELRCLCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCVNTEIIVKLSDGRELCLDPKEPFWQR-VVEKFLKRAESQNS : 74
Bovine.     : MSTELRCQCIKTHSTOFHOKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLTNGNEVCLNPKKQVQK-VVQVFKRAEKQDP : 74
SheepOAIL8 : MSTELRCQCIKTHSTPFHPKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLTNGKEVCLDPKEKQVQK-VVQAFKRAEKQDP : 74
PigSSIL8_3  : VSSELRCQCIKTHSTPFHPKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLVNGKEVCLDPKEKQVQK-VVQIFLKKAEKQDP : 72
DOGIL8T_1   : VSSELRCQCIKTHSTPFHPKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLVNGNEVCLDPKEKQVQK-VVQIFLKKAEKQDP : 74
CATCFU1030  : VSSELRCQCIKTHSTPFHPKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLVNGNEVCLDPKEKQVQK-VVQIFLKKAEKQDP : 74
CATAF15859  : ISSSELRCQCIKTHSTPFHPKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLVNGKEVCLDPKQKQVQK-VVEIFLKKAEKQNA : 74
dolphinAB0  : MTSELRCQCIKTHSTPFHPKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLVNGKEVCLNPKKQVQK-VVQIFLKKAEKKDP : 74
HORSEAY104  : ITAELRCQCIKTHSTPFHPKFIKELRVIESGPHCENSEIIVKLVNGAEVCLNPKHTKWVQI-IVQAFKRAEKQNP : 74

```

ELRC CIkt S PFHPK Ikelrvi SGPHC N EIIVKL G E CL Pke WVQ Vv F K Ae

|                    |        |     |
|--------------------|--------|-----|
| HUMANO(HUMBT00706) | %Exact | 100 |
| Rhesus             | %Exact | 91  |
| Pig-tailed         | %Exact | 91  |
| Red-crowned        | %Exact | 90  |
| Bovine.            | %Exact | 71  |
| SheepOAIL8_1       | %Exact | 74  |
| PigSSIL8_3         | %Exact | 72  |
| DOGIL8T_1          | %Exact | 70  |
| CATCFU10308_1      | %Exact | 70  |
| CATAF158598_2      | %Exact | 67  |
| dolphinAB036002_1  | %Exact | 68  |
| HORSEAY184956_3    | %Exact | 64  |

- 15 Alinhamento de CXCL8 de mamíferos selecionados e % de identidade com CXCL8 humano

Tabela 2

Resultados da atividade da proteína quimérica (% supressão)

|                      | 1st        | 2nd         | 3rd       | 4th        | Mean         |
|----------------------|------------|-------------|-----------|------------|--------------|
| <b>bG31P</b>         | <b>56</b>  | <b>72</b>   | <b>51</b> | <b>53</b>  | <b>58</b>    |
| <b>hbG31P+7</b>      | <b>11</b>  | <b>36</b>   | <b>66</b> | <b>46</b>  | <b>39.75</b> |
| <b>hbG31P/S37T+7</b> | <b>-2</b>  | <b>-104</b> | <b>73</b> | <b>82</b>  | <b>12.25</b> |
| <b>hbG31P/T3K+7</b>  | <b>-9</b>  | <b>-35</b>  | <b>34</b> | <b>-19</b> | <b>-7.25</b> |
| <b>hbG31P/T15K+7</b> | <b>16</b>  | <b>-24</b>  | <b>80</b> | <b>-38</b> | <b>8.5</b>   |
| <b>hbG31P+6</b>      | <b>70</b>  | <b>20</b>   |           |            | <b>45</b>    |
| <b>hbG31P/S37T+6</b> | <b>-61</b> | <b>-82</b>  |           |            | <b>-71.5</b> |
| <b>hbG31P/E35A+6</b> | <b>35</b>  | <b>-132</b> |           |            | <b>-48.5</b> |
| <b>hbG31P/H13Y+6</b> | <b>52</b>  | <b>-244</b> |           |            | <b>-96</b>   |

## REIVINDICAÇÕES

1. Um peptídeo purificado ou isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido de:  $X_1$ ELRCXCIRX XSXPFXPXI XEXXXIXSPP HCNXEIIVK LXXGXEXCLX PXXXWVQXXV XXFXKXXEXX $X_2X_3X_4$  **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  e  $X_4$  serem independentemente resíduos de aminoácidos 0 – 10 e X ser qualquer aminoácido.
2. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser aminoácidos 0 – 8.
3. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de cada  $X_1$  ser aminoácidos 0 – 6.
4. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser selecionado do grupo que consiste de GSK, GST, S, A, T, K, GSMGGSK, e GSMGGST.
5. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser aminoácidos 0.
6. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da condição de que a seqüência de aminoácido não ser conforme disposto em qualquer uma da SEQ ID No. 6 – 9.
7. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma seqüência de aminoácido conforme disposto na SEQ ID No. 13.
8. Um peptídeo purificado ou isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido de:  $X_1$ ELRCX $X_6$ CIRX $X_{10}$   $X_{11}$ SX $X_{13}$ PFX $X_{16}$ PKX $X_{19}$   $X_{21}$ EX $X_{23}X_{24}X_{25}$ IX $X_{27}$ SPP HCX $X_{33}$ NX $X_{35}$ EIIVK LX $X_{42}X_{43}$ GX $X_{45}$ EX $X_{47}$ CLX $X_{50}$  PX $X_{52}X_{53}X_{54}$ WVQX $X_{58}X_{59}$ V  $X_{61}X_{62}$ FX $X_{64}$ KX $X_{66}X_{67}$ EX $X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$  (SEQ ID No. 43) **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$ ,  $X_{70}$ ,  $X_{71}$  e  $X_{72}$  serem independentemente aminoácidos 0 – 10; e  $X_6$ ,  $X_{10}$ ,  $X_{11}$ ,  $X_{13}$ ,  $X_{16}$ ,  $X_{19}$ ,  $X_{21}$ ,  $X_{23}$ ,  $X_{24}$ ,  $X_{25}$ ,  $X_{27}$ ,  $X_{33}$ ,  $X_{35}$ ,  $X_{42}$ ,  $X_{43}$ ,  $X_{45}$ ,  $X_{47}$ ,  $X_{50}$ ,  $X_{52}$ ,  $X_{53}$ ,  $X_{54}$ ,  $X_{58}$ ,  $X_{59}$ ,  $X_{61}$ ,  $X_{62}$ ,  $X_{64}$ ,  $X_{66}$ ,  $X_{67}$  e  $X_{69}$  serem cada um independentemente selecionados do grupo que consiste de: A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V e Y.
9. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser aminoácidos 0 – 8.
10. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de cada  $X_1$  ser aminoácidos 0 – 6.
11. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser selecionado do grupo que consiste de GSK, GST, S, A, T, K, GSMGGSK, e GSMGGST.
12. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser aminoácidos 0.
13. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato da condição de que a seqüência de aminoácido não ser conforme disposto em qualquer uma da SEQ ID No. 6 – 9.
14. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de

compreender uma seqüência de aminoácido conforme disposto na SEQ ID No. 13.

15. Um peptídeo purificado ou isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido de: X<sub>1</sub>ELRCX<sub>6</sub>CIRX<sub>10</sub> X<sub>11</sub>SX<sub>13</sub>PFX<sub>16</sub>PKX<sub>19</sub>I X<sub>21</sub>EX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>IX<sub>27</sub>SPP HCX<sub>33</sub>NX<sub>35</sub>EIIVK LX<sub>42</sub>X<sub>43</sub>GX<sub>45</sub>EX<sub>47</sub>CLX<sub>50</sub> PX<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub>WVQX<sub>58</sub>X<sub>59</sub>V X<sub>61</sub>X<sub>62</sub>FX<sub>64</sub>KX<sub>66</sub>X<sub>67</sub>EX<sub>69</sub>X<sub>70</sub>X<sub>71</sub>X<sub>72</sub> (SEQ ID No. 4) **CHARACTERIZADO** pelo fato de X<sub>1</sub> ser independentemente aminoácidos 0 – 10; X<sub>6</sub> ser Q, E ou L; X<sub>10</sub> ser T ou I; X<sub>11</sub> ser H ou Y; X<sub>13</sub> ser T ou K; X<sub>16</sub> ser H ou N; X<sub>19</sub> ser F ou Y ou L; X<sub>21</sub> ser K ou R; X<sub>23</sub> ser L ou M; X<sub>24</sub> ser R ou T; X<sub>25</sub> ser V ou A; X<sub>27</sub> ser D ou E; X<sub>33</sub> ser V ou A ou E; X<sub>35</sub> ser T ou S; X<sub>42</sub> ser S ou V ou T ou F; X<sub>43</sub> ser D ou N; X<sub>45</sub> ser R ou A ou N ou K ou D; X<sub>47</sub> ser L ou V; X<sub>50</sub> ser D ou N; X<sub>52</sub> ser K ou H; X<sub>53</sub> ser E ou Q ou T; X<sub>54</sub> ser P ou N ou Q; X<sub>58</sub> ser R ou K ou I; X<sub>59</sub> ser V ou I; X<sub>61</sub> ser E ou Q; X<sub>62</sub> ser K ou I ou V ou A; X<sub>64</sub> ser L ou V; X<sub>66</sub> ser R ou K; X<sub>67</sub> ser A ou T; X<sub>69</sub> ser S ou N ou K ou G; X<sub>70</sub> ser Q ou S ou K ou deletado; X<sub>71</sub> ser N ou D ou deletado; X<sub>72</sub> ser P ou A ou S ou deletado.

16. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de X<sub>1</sub> ser aminoácidos 0 – 8.

17. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de cada X<sub>1</sub> ser aminoácidos 0 – 6.

18. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de X<sub>1</sub> ser selecionado do grupo que consiste de: S, A, T, K, GSK, GST, GSMGGSK, GSMGGST ou deletado.

19. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato da condição de que a seqüência de aminoácido não ser conforme disposto em qualquer uma da SEQ ID No. 6 – 9.

20. Peptídeo isolado **CHARACTERIZADO** pelo fato de consistir essencialmente de uma seqüência de aminoácido conforme disposto em qualquer uma da SEQ ID No. 10 – 41.

21. Uma seqüência isolada de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma seqüência de aminoácido de: X<sub>1</sub>ELRCXCIRX XSXPFXPKXI XEXXXIXSPP HCNXNEIIVK LXXGXEXCLX PXXXWVQXXV XXFXKXXEXX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub> **CHARACTERIZADA** pelo fato de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> e X<sub>4</sub> serem independentemente resíduos de aminoácidos 0 – 10 e X ser qualquer aminoácido.

22. Seqüência de polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 21, **CHARACTERIZADA** pelo fato de X<sub>1</sub> ser aminoácidos 0 – 8.

23. Seqüência de polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 21, **CHARACTERIZADA** pelo fato de cada X<sub>1</sub> ser aminoácidos 0 – 6.

24. Seqüência de polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 21, **CHARACTERIZADA** pelo fato de X<sub>1</sub> ser selecionado do grupo que consiste de GSK, GST, S, A, T, K, GSMGGSK, e GSMGGST.

25. Seqüência de polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 21,

**CARACTERIZADA** pelo fato de  $X_1$  ser aminoácidos 0.

26. Seqüência de polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato da condição de que a seqüência de aminoácido não ser conforme disposto em qualquer uma da SEQ ID No. 6 – 9.

5 27. Seqüência isolada de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma seqüência de aminoácido de:  $X_1$ ELRC $X_6$ CIR $X_{10}$   
 $X_{11}$ S $X_{13}$ PFX $X_{16}$ PK $X_{19}$ I  $X_{21}$ EX $X_{23}$  $X_{24}$  $X_{25}$ IX $X_{27}$ SPP HCX $X_{33}$ N $X_{35}$ EIIVK LX $X_{42}$  $X_{43}$ G $X_{45}$ EX $X_{47}$ CL $X_{50}$   
 PX $X_{52}$  $X_{53}$  $X_{54}$ WVQX $X_{58}$  $X_{59}$ V  $X_{61}$  $X_{62}$ FX $X_{64}$ KX $X_{66}$  $X_{67}$ EX $X_{69}$  $X_{70}$  $X_{71}$  $X_{72}$  (SEQ ID No. 43)

**CARACTERIZADA** pelo fato de  $X_1$ ,  $X_{70}$ ,  $X_{71}$  e  $X_{72}$  serem independentemente aminoácidos 0  
 10 – 10; e  $X_6$ ,  $X_{10}$ ,  $X_{11}$ ,  $X_{13}$ ,  $X_{16}$ ,  $X_{19}$ ,  $X_{21}$ ,  $X_{23}$ ,  $X_{24}$ ,  $X_{25}$ ,  $X_{27}$ ,  $X_{33}$ ,  $X_{35}$ ,  $X_{42}$ ,  $X_{43}$ ,  $X_{45}$ ,  $X_{47}$ ,  $X_{50}$ ,  $X_{52}$ ,  $X_{53}$ ,  
 $X_{54}$ ,  $X_{58}$ ,  $X_{59}$ ,  $X_{61}$ ,  $X_{62}$ ,  $X_{64}$ ,  $X_{66}$ ,  $X_{67}$  e  $X_{69}$  serem cada um independentemente selecionados do grupo que consiste de: A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V e Y.

28. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser aminoácidos 0 – 8.

15 29. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de cada  $X_1$  ser aminoácidos 0 – 6.

30. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser selecionado do grupo que consiste de GSK, GST, S, A, T, K, GSMGGSK, e GSMGGST.

20 31. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser aminoácidos 0.

32. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato da condição de que a seqüência de aminoácido não ser conforme disposto em qualquer uma da SEQ ID No. 6 – 9.

25 33. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de codificar uma seqüência de aminoácido conforme disposto na SEQ ID No. 13.

30 34. Uma seqüência isolada de polinucleotídeo que codifica uma seqüência de aminoácido de:  $X_1$ ELRC $X_6$ CIR $X_{10}$   $X_{11}$ S $X_{13}$ PFX $X_{16}$ PK $X_{19}$ I  $X_{21}$ EX $X_{23}$  $X_{24}$  $X_{25}$ IX $X_{27}$ SPP HCX $X_{33}$ N $X_{35}$ EIIVK  
 LX $X_{42}$  $X_{43}$ G $X_{45}$ EX $X_{47}$ CL $X_{50}$  PX $X_{52}$  $X_{53}$  $X_{54}$ WVQX $X_{58}$  $X_{59}$ V  $X_{61}$  $X_{62}$ FX $X_{64}$ KX $X_{66}$  $X_{67}$ EX $X_{69}$  $X_{70}$  $X_{71}$  $X_{72}$  (SEQ ID  
 No. 4) **CARACTERIZADA** pelo fato de  $X_1$  ser independentemente aminoácidos 0 – 10;  $X_6$   
 ser Q, E ou L;  $X_{10}$  ser T ou I;  $X_{11}$  ser H ou Y;  $X_{13}$  ser T ou K;  $X_{16}$  ser H ou N;  $X_{19}$  ser F ou Y  
 ou L;  $X_{21}$  ser K ou R;  $X_{23}$  ser L ou M;  $X_{24}$  ser R ou T;  $X_{25}$  ser V ou A;  $X_{27}$  ser D ou E;  $X_{33}$  ser V  
 ou A ou E;  $X_{35}$  ser T ou S;  $X_{42}$  ser S ou V ou T ou F;  $X_{43}$  ser D ou N;  $X_{45}$  ser R ou A ou N ou  
 K ou D;  $X_{47}$  ser L ou V;  $X_{50}$  ser D ou N;  $X_{52}$  ser K ou H;  $X_{53}$  ser E ou Q ou T;  $X_{54}$  ser P ou N  
 35 ou Q;  $X_{58}$  ser R ou K ou I;  $X_{59}$  ser V ou I;  $X_{61}$  ser E ou Q;  $X_{62}$  ser K ou I ou V ou A;  $X_{64}$  ser L  
 ou V;  $X_{66}$  ser R ou K;  $X_{67}$  ser A ou T;  $X_{69}$  ser S ou N ou K ou G;  $X_{70}$  ser Q ou S ou K ou dele-  
 tado;  $X_{71}$  ser N ou D ou deletado;  $X_{72}$  ser P ou A ou S ou deletado.

35. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 34, **CHARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser aminoácidos 0 – 8.

36. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 34, **CHARACTERIZADO** pelo fato de cada  $X_1$  ser aminoácidos 0 – 6.

5 37. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 34, **CHARACTERIZADO** pelo fato de  $X_1$  ser selecionado do grupo que consiste de: S, A, T, K, GSK, GST, GSMGGSK, GSMGGST ou deletado.

38. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 34, **CHARACTERIZADO** pelo fato da condição de que a sequência de aminoácido não ser conforme disposto em qualquer  
10 uma da SEQ ID No. 6 – 9.

39. Um polinucleotídeo isolado **CHARACTERIZADO** pelo fato de consistir essencialmente de uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de aminoácido conforme disposto na SEQ ID No. 10- 41.

40. Uma célula transgênica **CHARACTERIZADA** pelo fato de compreender o polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 – 39.  
15

41. Um hospedeiro viral geneticamente engenheirado **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender o polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 – 39.

42. Um vetor de expressão **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender o polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 – 39, operacionalmente ligado a uma sequência regulatória que controla a expressão do citado polinucleotídeo em um hospedeiro adequado.  
20

43. Uma célula de hospedeiro **CHARACTERIZADA** pelo fato de compreender o vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 42.

25 44. Uso do peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 – 20 na fabricação de um medicamento, **CHARACTERIZADO** pelo fato de ser para o tratamento de uma patologia mediada pela quimiocina CXC.

45. Uso, de acordo com a reivindicação 44, **CHARACTERIZADO** pelo fato do medicamento ser para o tratamento de uma patologia mediada pela quimiocina ELR-CXC.

30 46. Uso, de acordo com a reivindicação 44, **CHARACTERIZADO** pelo fato do medicamento ser formulado para liberação intravenosa, liberação intradérmica ou liberação subcutânea.

47. Uso, de acordo com a reivindicação 44, **CHARACTERIZADO** pelo fato da patologia mediada pela quimiocina CXC ser selecionada do grupo que consiste de: dano por isquemia-reperfusão, síndrome de sofrimento respiratório agudo induzido por endotoxemia, glomerulonefrite do tipo imuno complexo, pneumonia bacteriana e mastite.  
35

48. Um método de tratamento de uma patologia mediada pela quimiocina CXC, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração a um indivíduo com necessidade de tal tratamento de uma quantidade efetiva de um peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 – 20.

5            49. Método, de acordo com a reivindicação 48, **CARACTERIZADO** pelo fato da patologia mediada pela quimiocina CXC ser uma patologia mediada pela quimiocina ELR-CXC.

10           50. Método, de acordo com a reivindicação 49, **CARACTERIZADO** pelo fato da patologia mediada pela quimiocina CXC ser selecionada do grupo que consiste de: dano por isquemia-reperfusão, síndrome de sofrimento respiratório agudo induzido por endotoxemia, glomerulonefrite do tipo imuno complexo, pneumonia bacteriana e mastite.

Fig. 1

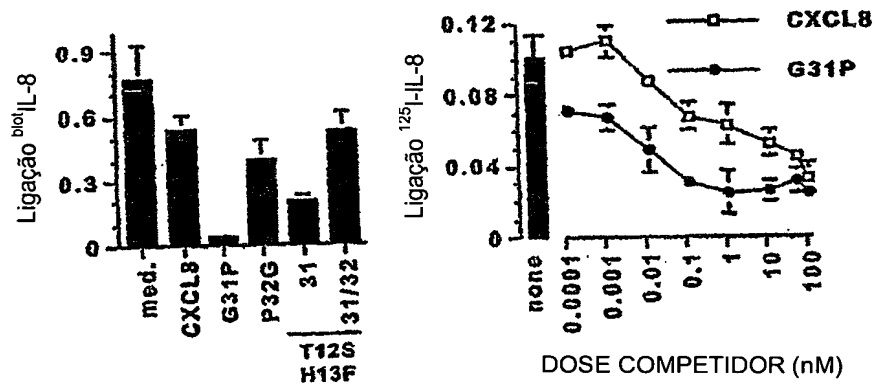


Fig. 2

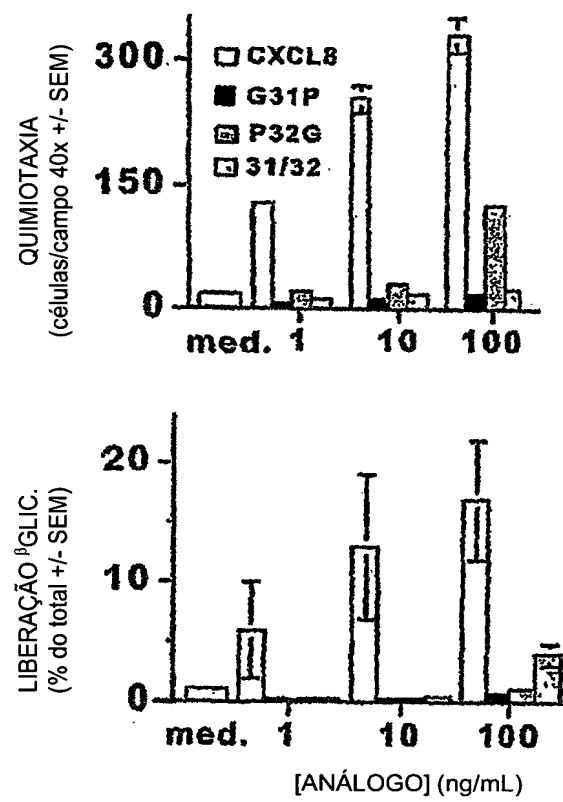


Fig. 3

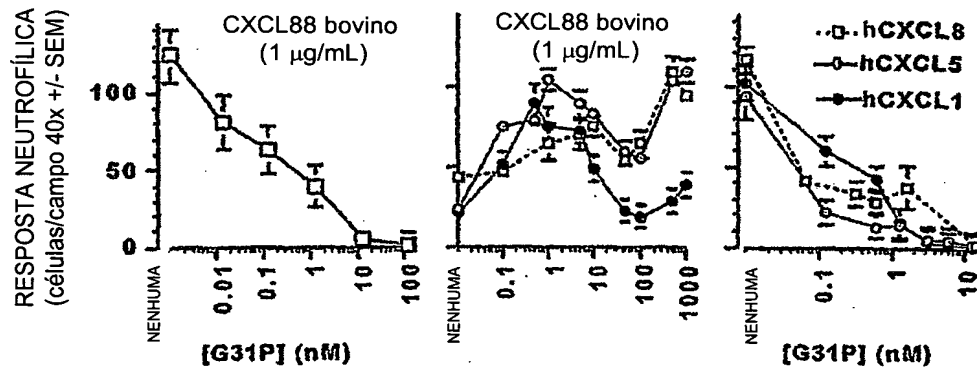


Fig. 4

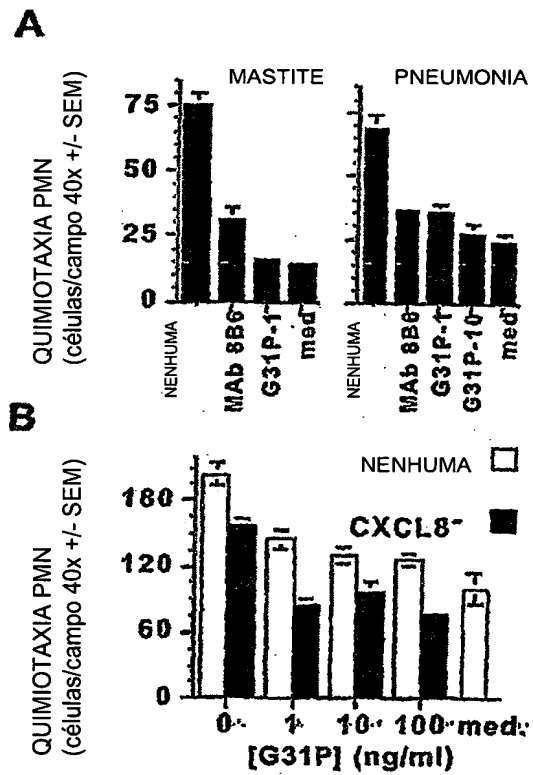


Fig. 5

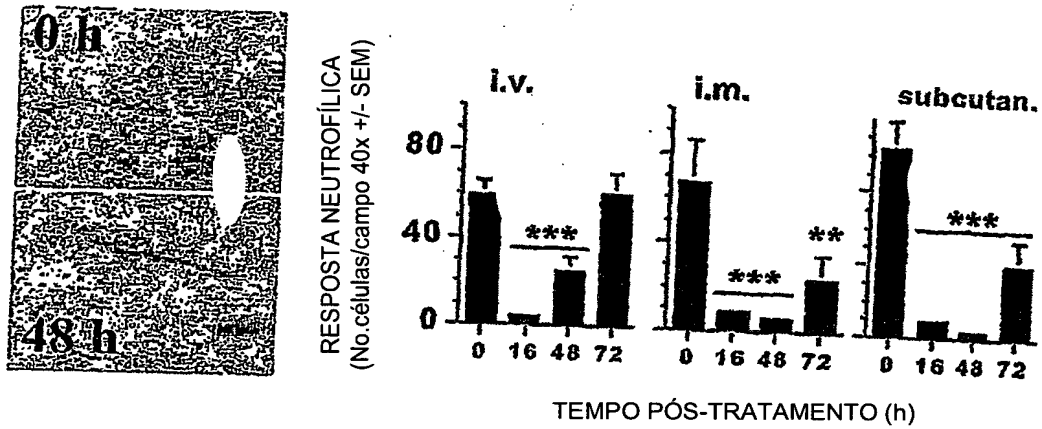


Fig. 6

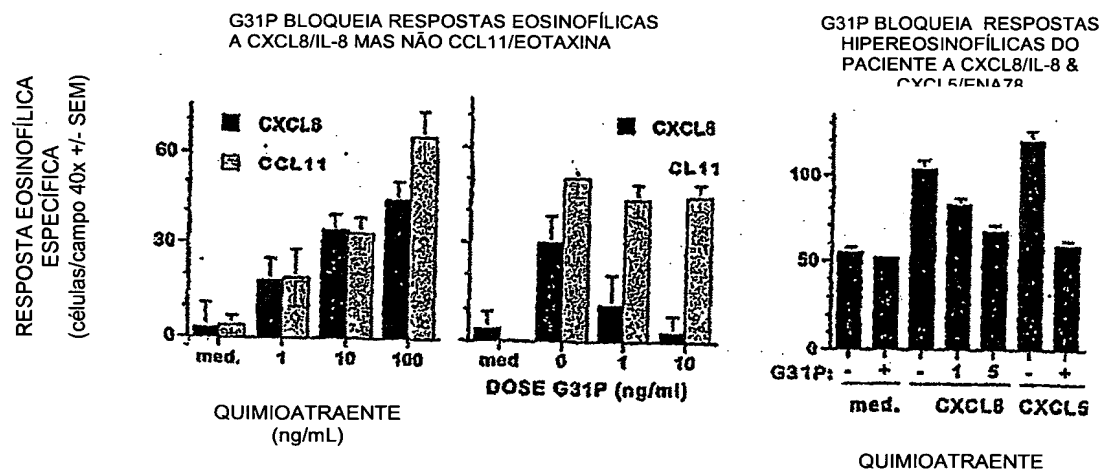


Fig. 7

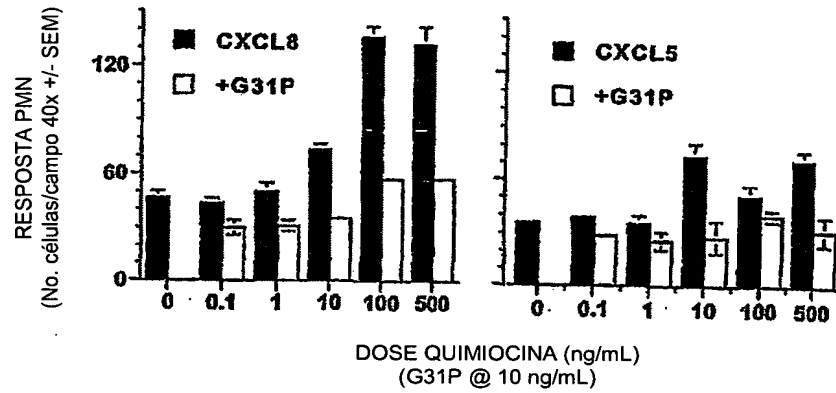


Fig. 8 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE ISOFORMAS hbG31P

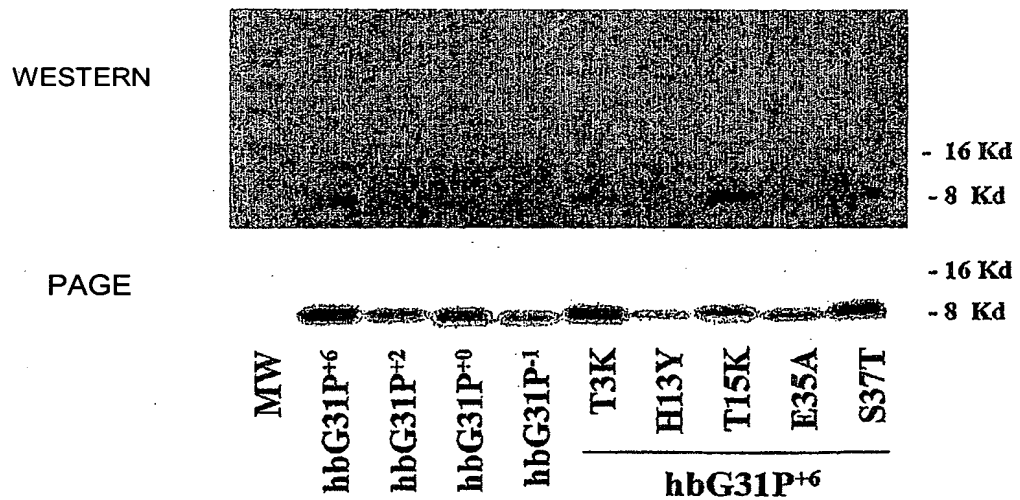


Fig. 9 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE ISOFORMAS hbG31P

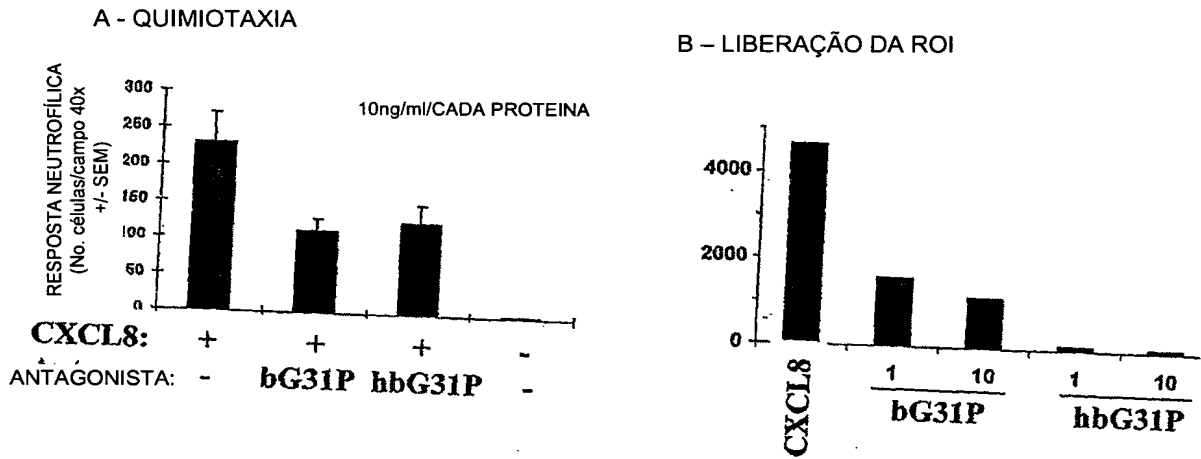


Fig. 10A – ANÁLOGOS hbG31P NÃO SÃO AGONISTAS QUIMIOTÁTICOS NEUTROFÍLICOS

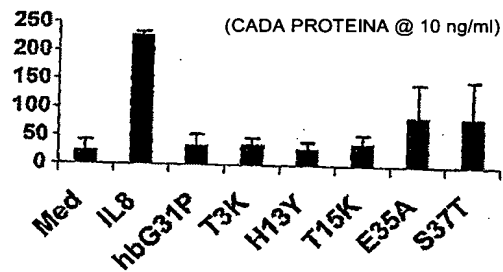
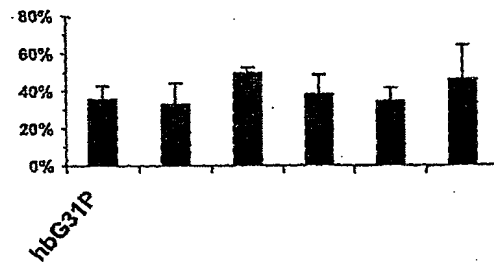


Fig. 10B – ATIVIDADE ANTAGONISTA hbG31P (CXCL8 &amp; hbG31P &amp; hbG31P @ 10 ng/mL)

INIBIÇÃO DA QUIMIOTAXIA



INIBIÇÃO DE LIBERAÇÃO DA ROI

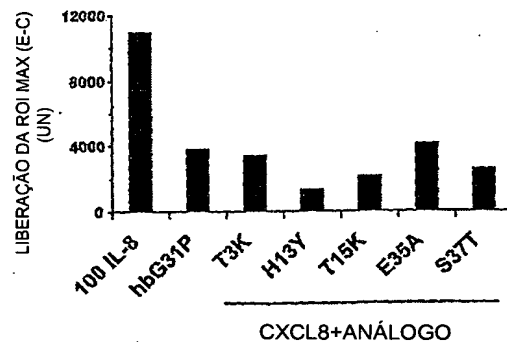
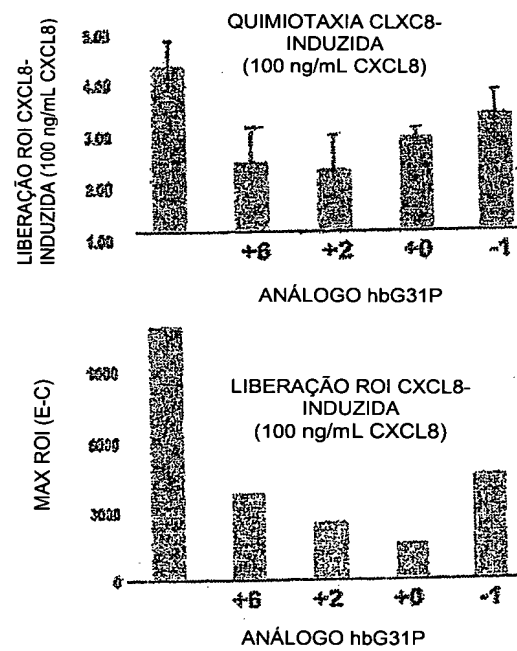
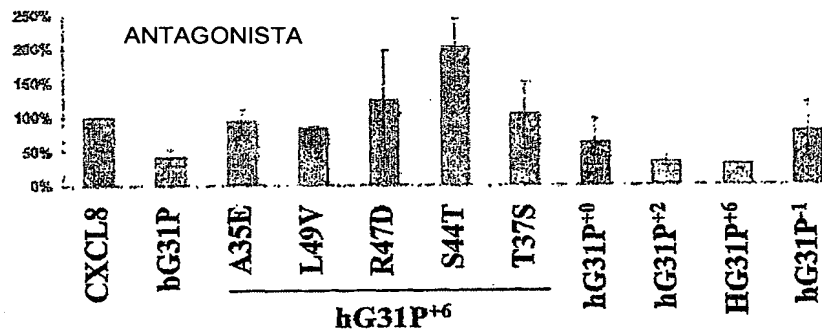
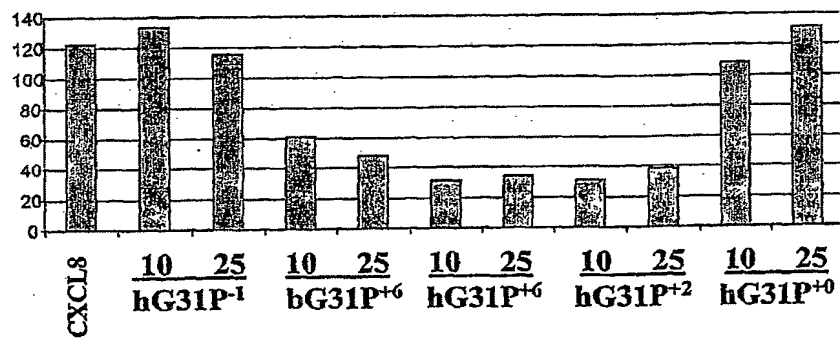
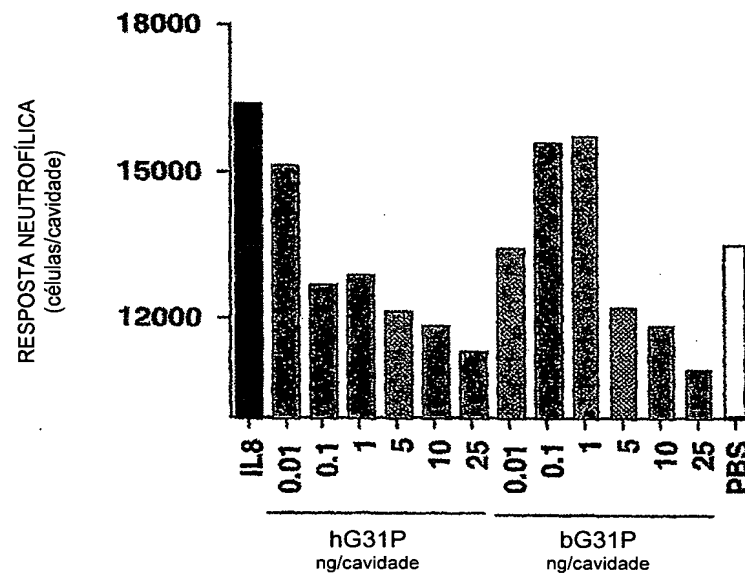


Fig. 11 – EFEITO DA SEQUÊNCIA CARBOXI-TERMINAL DE hbG31P EM SUAS ATIVIDADES ANTAGONISTAS



**Fig 12A.****Fig 12B.****Fig 12C.** CONFIRMAÇÃO DA ATIVIDADE AGONISTA DE hG31P

**Fig 13.** COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTAGONISTAS DE bG31P E hG31



**Fig 14.** HG31P ANTAGONIZA ENA78, UM LIGANDO CXCR2-ESPECÍFICO

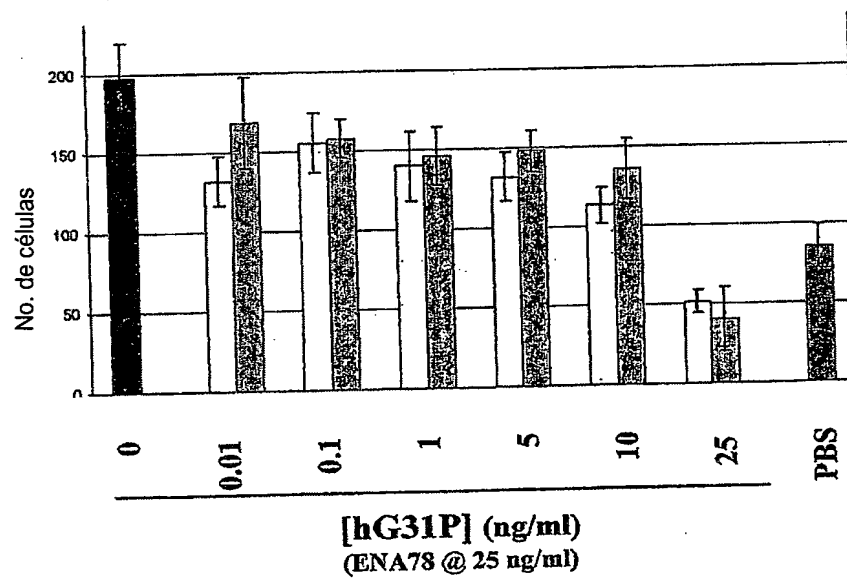


Fig. 15 HG31P antagoniza liberação ROI CXCL-8-induzida

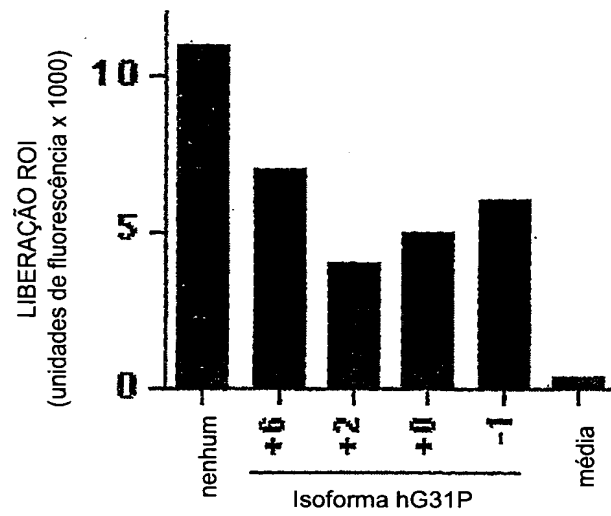


Fig. 16 HG31P antagoniza atividades quimiotáticas neutrofílicas no esputo de pacientes com bronquiectasia

Tratamento do esputo: (barras azuis) ou hG31P (10 ng/mL; barras roxas)

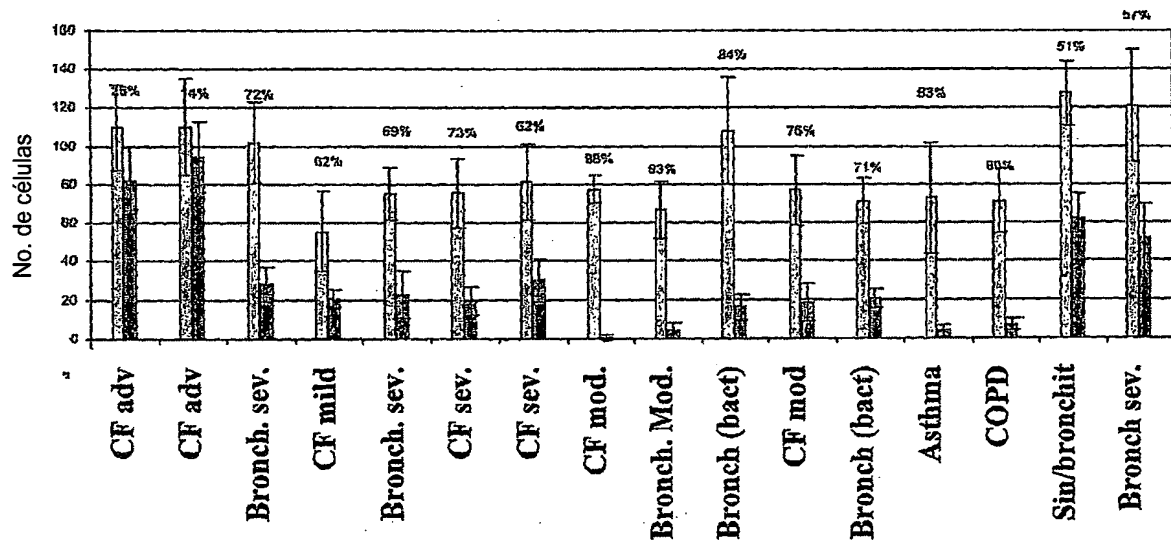


Fig. 17 HG31P reduz inflamação pulmonar em ratos endotoxêmicos

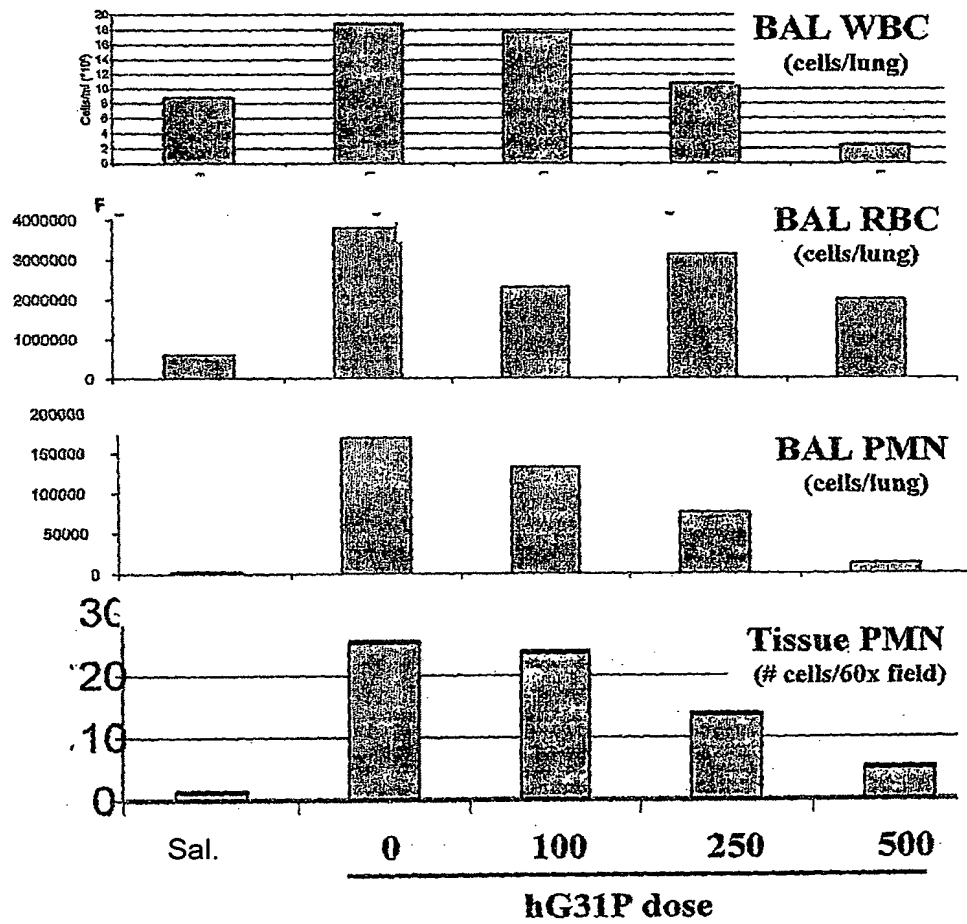


Fig. 18 Efeito de hG31P em endotoxemia mórbida das vias respiratórias em porcos da Índia

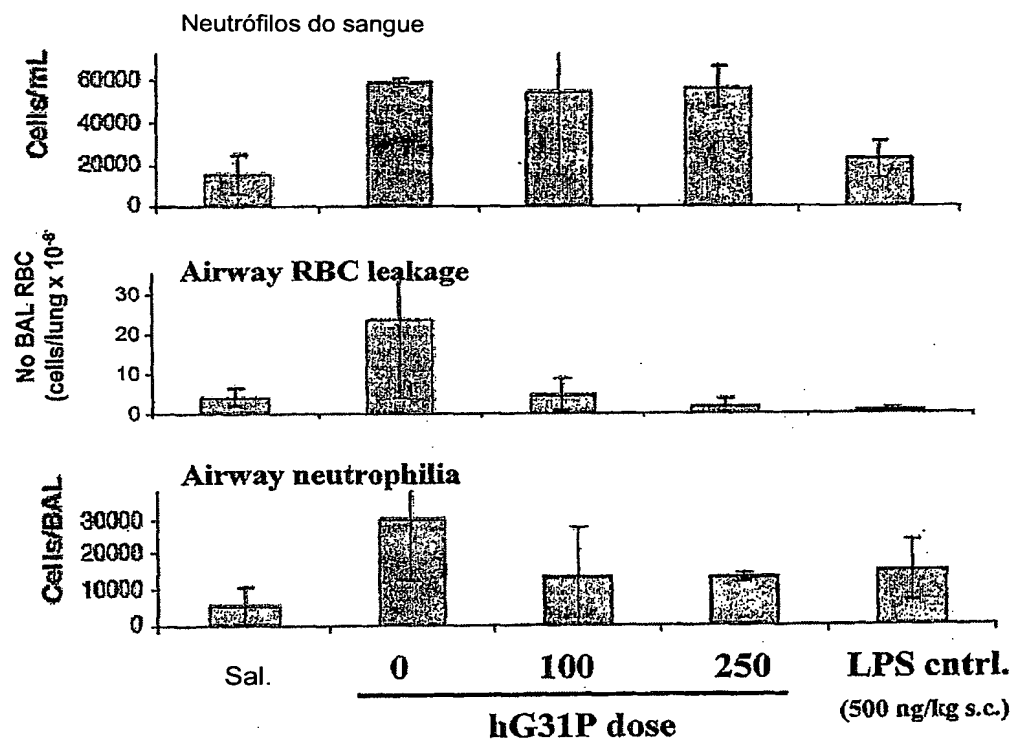


Figura 19 Efeito das diversas isoformas hG31P (& hbG31P) sobre patologia endotoxemia das vias respiratórias em porcos da índia

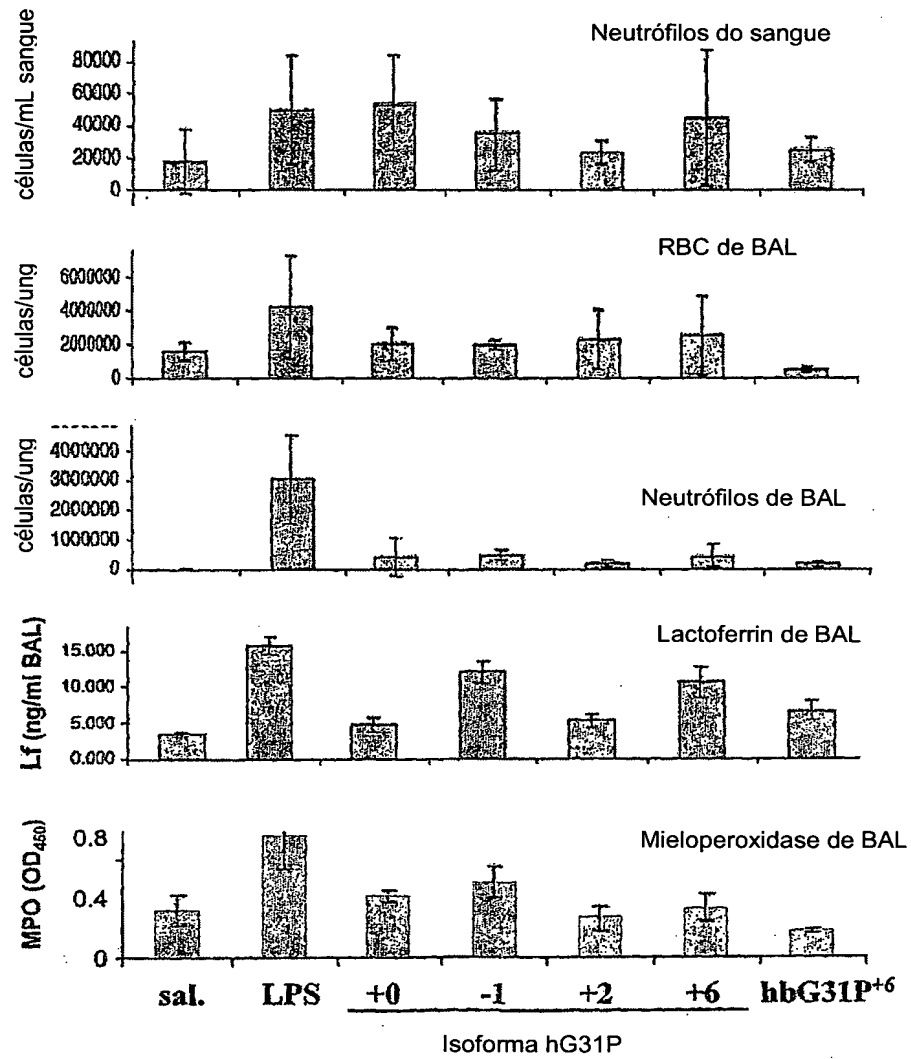
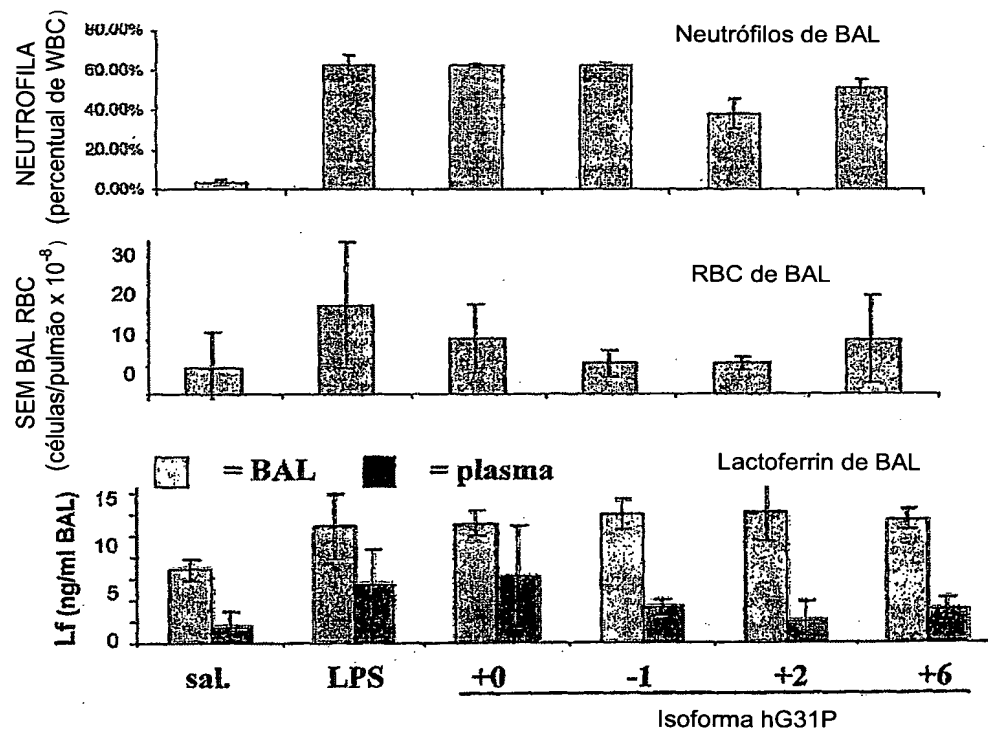


Figura 20 Efeito das diversas isoformas hG31P (& hbG31P) sobre patologia endotoxemia das vias respiratórias em porcos da índia



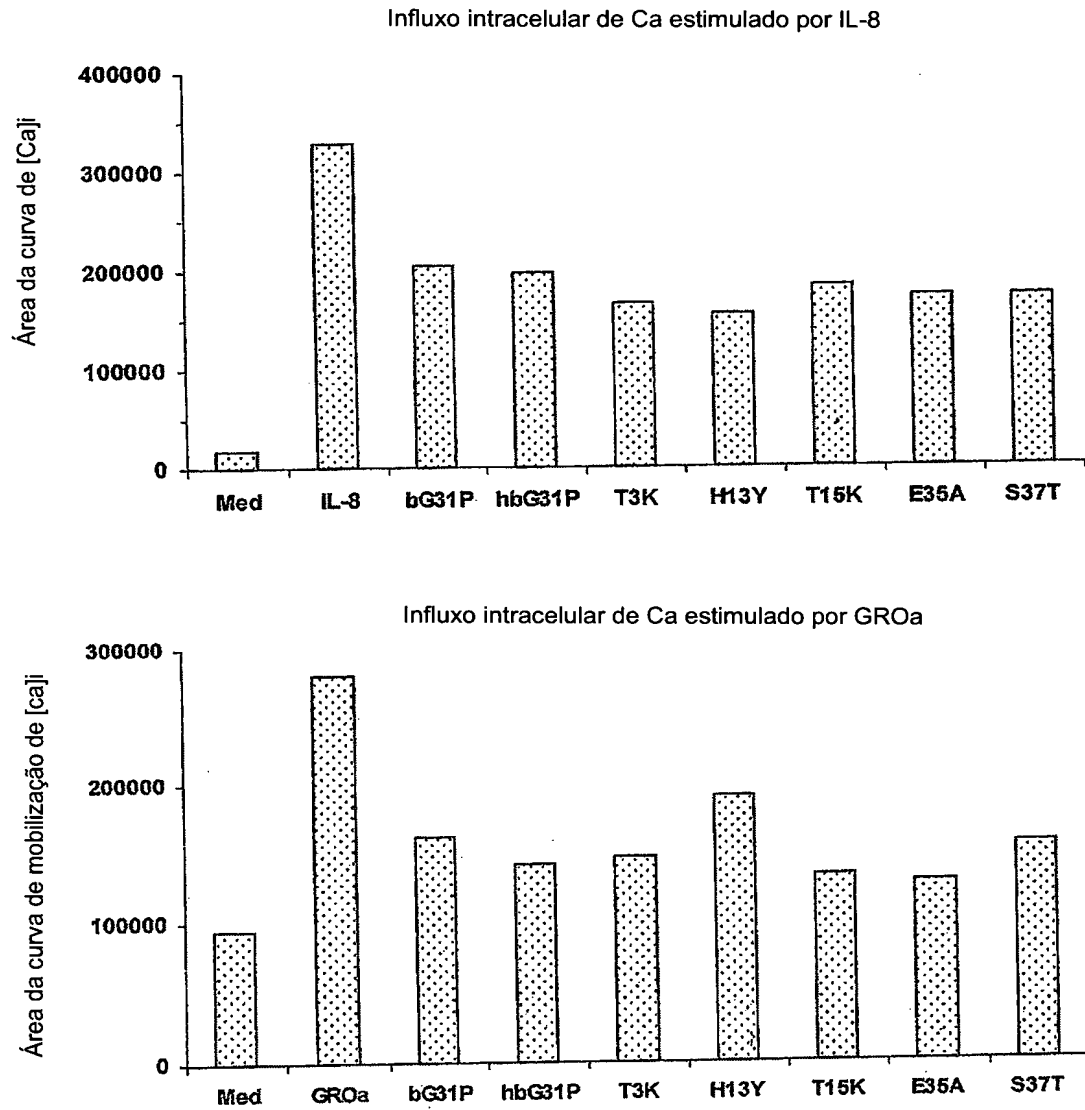


Fig. 21

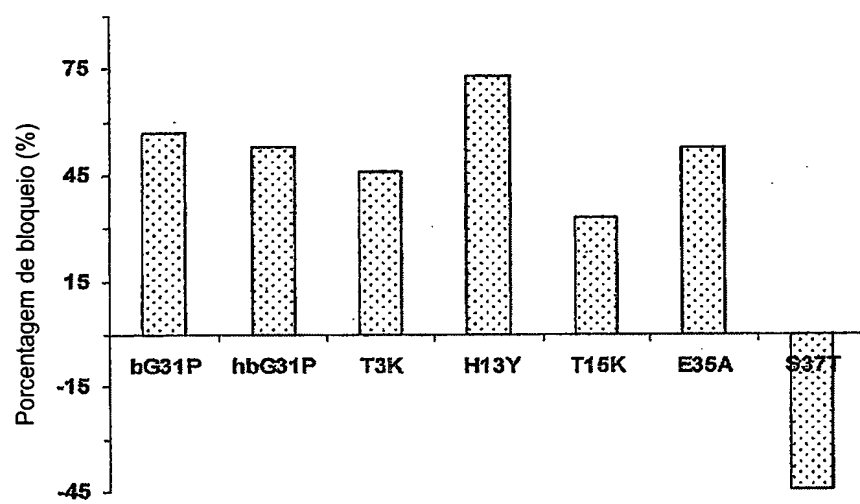


Fig. 22

RESUMO

"ANTAGONISTAS DE ALTA AFINIDADE DE QUIMIOCINAS ELR-CXC"

A presente invenção fornece novas seqüências de polipeptídeo, métodos para sua produção e seu uso para novos agonistas e antagonistas do receptor de quimiocina ELR-

5 CXC.