

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

**N.º** 95.072

**REQUERENTE:** THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION, norte-  
-americana, industrial, em Fruit Street,  
Boston, Massachusetts 02114 - E.U.A.

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE POLIPEP-  
TÍDEOS CD4 DE PRIMATAS NÃO HUMANOS, MO-  
LÉCULAS CD4 HUMANAS CAPAZES DE GLICOSILAÇÃO,  
SEUS FRAGMENTOS, SUAS PROTEÍNAS DE FUSÃO, S  
SEQUÊNCIAS GENÉTICAS E SUA UTILIZAÇÃO"

**INVENTORES:** BRIAN SEED e DAVID CAMERINI

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883. Nos Estados Unidos da América do Norte,  
em 23 de Agosto de 1989, sob o No. 397.782.

95.072



THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS CD4 DE PRIMATAS NÃO HUMANOS, MOLÉCULAS CD4 HUMANAS CAPAZES DE GLICOSILAÇÃO, SEUS FRAGMENTOS, SUAS PROTEÍNAS DE FUSÃO, SEQUÊNCIAS GENÉTICAS E SUA UTILIZAÇÃO"

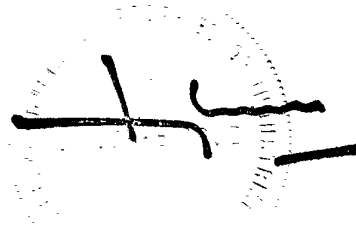
=====

#### MEMÓRIA DESCRITIVA

##### RESUMO

O invento está relacionado com processo para a produção de CD4 substancialmente puro de primata não-humano e seus fragmentos que se ligam a gp120 de HIV ou de SIV. O invento também está relacionado com o processo para a produção de moléculas que se ligam a gp120 relacionadas com CD4 humano mas que podem existir na forma glicosilada.

O invento também está relacionado com o processo para a produção de proteínas de fusão que compreendem moléculas CD4 do invento, ou seus fragmentos, e uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia leve ou pesada foi substituída por CD4 ou um seu fragmento que é capaz de se ligar a gp120. O invento também está relacionado com proteínas de fusão compreendendo as moléculas de CD4 do invento e um polipeptídeo citotóxico.



O invento também está relacionado com o processo para a produção de moléculas do tipo imunoglobulina compreendendo as proteínas de fusão do invento juntamente com uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina.

O invento também está relacionado com o método para o tratamento de infecção por HIV ou SIV que compreende a administração a um animal das moléculas de CD4 do invento, glicoproteínas, seus fragmentos, proteínas de fusão ou moléculas do tipo imunoglobulina do invento.

O invento também está relacionado com o método de ensaio ensaio para HIV ou SIV que compreende o contacto de uma amostra suspeita de conter gp120 de HIV ou SIV com as moléculas CD4 do invento, seus fragmentos, glicoproteínas, moléculas do tipo imunoglobulina ou proteínas de fusão do invento e a detecção da formação do complexo.

O invento também está relacionado com o processo para a produção de moléculas de ácido nucleico que especificam as proteínas, glicoproteínas e proteínas de fusão do invento assim como vectores e hospedeiros transformados.

### CAMPO DO INVENTO

Este invento situa-se no campo da genética recombinante e composições farmacêuticas.

### FUNDAMENTO DO INVENTO

Os vírus da imunodeficiência humana e símia HIV e SIV são os agentes causadores do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e Síndrome da Imunodeficiência Símia, (SIDS) respectivamente. Ver Curren, J. et al., Science 329:1359-1357 (1985); Weiss, R. et al., Nature 324:572-575 (1986). O vírus HIV contém uma glicoproteína do envoltório, gp120 que se liga à proteína CD4 presente na superfície de linfócitos T auxiliares, macrófagos e outras células. Dalglish et al., Nature, 312:763 (1984). Após a ligação de gp120 a CD4, a entrada do vírus é facilitada por uma fusão mediada pelo envoltório das membranas viral e da célula alvo.

No decurso da infecção, o organismo hospedeiro desenvolve anticorpos contra as proteínas virais, incluindo as principais proteínas do envoltório gp120 e gp41. Apesar desta imunidade humoral, a doença progride, resultando numa imunossupressão letal caracterizada por múltiplas infecções oportunistas, parasitemia, demência e morte. A incapacidade dos anticorpos do hospedeiro anti-virais para parar a progressão da doença representa um dos aspectos mais vexantes e alarmantes da infecção, e não faz prever êxito para as vacinações baseadas em abordagens convencionais.

Dois factores podem desempenhar um papel importante na ineficácia da resposta humoral aos vírus da imunodeficiência. Primeiro tal como outros vírus de RNA (e retrovírus semelhantes

em particular), os vírus da imunodeficiência apresentam uma elevada taxa de mutações que a variação antigénica progride a uma velocidade elevada em resposta à defesa imune do hospedeiro. Segundo, as próprias glicoproteínas do invólucro são moléculas altamente glicosiladas apresentando poucos epítomos adequados à ligação de anticorpos de elevada afinidade. O alvo «móvel» fracamente antigénico que o invólucro viral apresenta, deixa ao hospedeiro pouca oportunidade de restrição da infecção viral pela produção de anticorpos específicos.

As células infectadas pelo HIV expressam a glicoproteína gp120 na sua superfície. Gp120 medeia as fusões entre células CD4<sup>+</sup> através de uma reacção semelhante àquela usada pelo vírus para entrar numa célula não infectada, conduzindo à formação de uma única célula a partir de duas, iniciando a formação de sincícios está dependente de uma interacção directa da glicoproteína do invólucro gp120 com a proteína CD4. Dalglish et al., supra, Klatzmann, D. et al., Nature 312:763 (1984); McDougal, J.S. et al. Science, 231:382 (1986); Sodroski, J. et al., Nature, 323:725 (1986); Sodroski, J. et al. Nature 321:412 (1986).

A proteína CD4 humana consiste numa região extracelular de 372 aminoácidos contendo quatro domínios do tipo imunoglobulina, um domínio que atravessa a membrana e uma região intracelular carregada de 40 resíduos de aminoácidos. Maddon, P. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. (USA) 84:1649 (1987).

A evidência de que a ligação CD4-gp120 'é responsável pela infecção viral de células portadoras do antígeno CD4 inclui o facto de se formar um complexo específico entre gp120 e CD4. McDougal et al., supra. Outros investigadores que linhas celulares, que não eram infectadas pelo HIV, eram convertidas em linhas celulares infectáveis após transfecção e expressão do gene de

cDNA de CD4 humano. Maddon et al., Cell 47:333-348 (1986). Publicações de Pedidos de Patente Nº WO 88/01304 (1988) e WO89/01940 (1989) descreve que formas solúveis de CD4 humano compreendendo domínios de ligação do tipo imunoglobulina são úteis para o tratamento ou profilaxia de infecções pelo HIV.

Ao contrário da maioria das interações anticorpo-invólucro, a interação receptor-invólucro é caracterizada por uma associação imutável de elevada afinidade ( $k_a \approx 10^8$  l/mole). Ainda, a afinidade do vírus para CD4 humano é pelo menos três ordens de grandeza superior à afinidade de CD4 humano para o seu ligando endógeno putativo, os antigénios MHC classe II.

Vários investigadores descreveram métodos para a preparação de proteínas híbridas. Por exemplo, Murphy, Patente dos Estados Unidos 4,675,382 (1987), descreve a utilização de técnicas de DNA recombinante para fazer moléculas de proteína híbridas através da formação do gene fundido pretendido codificador de uma proteína híbrida da toxina da difteria e um ligando polipeptídico como seja uma hormona, seguido da expressão do gene fundido.

Muitos investigadores prepararam anticorpos monoclonais (Mabs) por técnicas de DNA recombinante. Os anticorpos monoclonais são moléculas altamente específicas muito bem caracterizadas na estrutura primária e terciária. Eles têm sido largamente usados na caracterização imunoquímica e quantificação de antigénios. Os genes das cadeias pesadas e leves foram introduzidos em hospedeiros adequados e expressos, seguido de reagregação das cadeias individuais em moléculas de anticorpos funcionais (ver, por exemplo, Munro, Nature 312:597 (1984); Morrison, S.L., Science 229:1202 (1985); Oi et al., Biotechniques 4:214 (1986); Wood et al., Nature 314:446-449 (1985)). As regiões variáveis das

cadeias leve e pesada foram clonadas e expressas em hospedeiros estranhos em que elas mantiveram a sua capacidade de ligação (Moore et al., Pedido de Patente Europeia 0088994 (publicado em 21 de Setembro, 1983)).

Também foram preparados anticorpos quiméricos ou híbridos por técnicas de DNA recombinante. Oi e Morrison, Biotechniques 4:214 (1986) descrevem uma estratégia para a produção de tais anticorpos quiméricos que incluem um anticorpo quimérico humano IgG anti-leu3

Gascoigne, N.R.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:2936-2940 (1987) descrevem a preparação de uma construção genética quimérica contendo um domínio variável (V) da cadeia  $\alpha$  do receptor de células T e a sequência codificadora da região constante (C) de uma molécula de imunoglobulina gama 2a. As células transfectadas com o gene quimérico sintetizam um produto proteico que expressa imunoglobulina e determinantes antigénicos do receptor das células T assim como sítios de ligação à proteína A. Esta proteína associa-se a uma cadeia lambda normal para formar uma molécula de imunoglobulina tetramérica aparentemente normal ( $H_2L_2$ , em que H=pesado e L=leve) que é secretada.

Sharon, J., et al. Nature 309:54 (1984), descreve a construção de um gene quimérico codificador da região variável (V) de uma cadeia pesada de ratinho específica do hapteno azofenilarsonato e da região constante (C) de uma cadeia leve Kappa ( $V_{H C_K}$ ). Este gene foi introduzido numa linha celular de mieloma de ratinho. O gene quimérico foi expresso para dar uma proteína que associada com cadeias leves foi secretada pela linha celular de mieloma para dar uma molécula de anticorpo específica de azofenilarsonato.

Morrison, Science 229:1202 (1985), descreve que as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas podem ser ligadas a uma sequência que não seja Ig para criar proteínas de fusão. Este artigo descreve que as potenciais utilizações para as proteínas de fusão são três: (1) ligar o anticorpo especificamente a enzimas para usar em ensaios; (2) para isolar proteínas não-Ig em colunas de antigénio; e (3) libertar especificamente agentes tóxicos.

Técnicas recentes para a introdução estável de genes de imunoglobulinas em células de mieloma (Banerji, et al., Cell 33:729-740 (1983); Potter, H., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:7161-7165 (1984)), acopladas à informação estrutural detalhada, permitiram a utilização de métodos de DNA in vitro tais como mutagénese, para gerar anticorpos recombinantes possuindo novas propriedades.

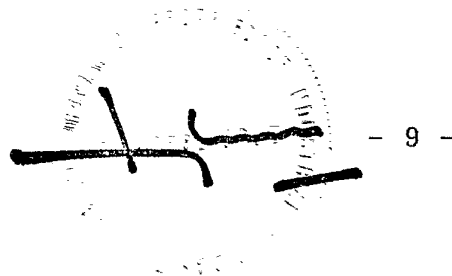
O Pedido de Patente WO87/02671 descreve métodos para a produção de anticorpos por engenharia genética com a região variável de especificidade pretendida e propriedades de regiões constantes através de clonagem de genes e expressão de cadeias leves e pesadas. O mRNA das linhas de hibridoma de células B clonadas que produziram anticorpos monoclonais da especificidade pretendida foi isolado por clonagem de cDNA. A geração de sequências codificadoras de cadeias leve e pesada é conseguida por remoção das regiões variáveis clonadas e sua ligação a vectores módulo das cadeias leve e pesada. Isto dá sequências de cDNA que codificam cadeias de imunoglobulina. A ausência de intrões permite que estas sequências de cDNA sejam expressas em hospedeiros procarióticos, tais como bactérias ou em hospedeiros eucarióticos inferiores, tais como leveduras.



A geração de anticorpos quiméricos em que a fracção de ligação ao antigénio da imunoglobulina é fundida com outras fracções foi demonstrada. Exemplos de genes de que não sejam de imunoglobulina fundidos a anticorpos incluem nuclease de Staphylococcus aureus, o oncogene de ratinho c-myc e o fragmento Klenow da DNA-polimerase I de E. coli (Neuberger, M.S., et al., Nature 312:604-612 (1984); neuberger, M.S., Trends in Biochemical Science, 347-349 (1985)). Pedido de Patente Europeia 120,694 descreve a manipulação de engenharia genética das regiões constante e variável de uma molécula de imunoglobulina que é expressa em células hospedeiras de E. coli. É ainda descrito que a molécula de imunoglobulina pode ser sintetizada por uma célula hospedeira com uma outra fracção peptídica ligada a um dos domínios constantes. Tais fracções peptídicas são descritas como citotóxicas ou enzimáticas. O pedido e os exemplos descrevem a utilização de uma cadeia tipo lambda derivada de um anticorpo monoclonal que se liga a haptenos de 4-hidroxi-3-nitrofenilo (NP).

O Pedido de Patente Europeia 125,023 está relacionado com a utilização de técnicas de DNA recombinante para produzir moléculas de imunoglobulina que são quiméricas ou modificadas de outro modo. Uma das utilizações descritas para estas moléculas de imunoglobulina é no diagnóstico e tratamento do corpo em geral pela injeção dos anticorpos dirigidos a tecidos alvo específicos. A presença da doença pode ser determinada pela ligação de uma marca adequada aos anticorpos ou o tecido doente pode ser atacado por anticorpos ligados a uma droga adequada. O pedido de patente descreve anticorpos modificados de modo a ajudar a libertação específica de um agente como «anticorpos alterados».

O Pedido de Parente PCT W083/101533 descreve anticorpos quiméricos em que a região variável de uma molécula de



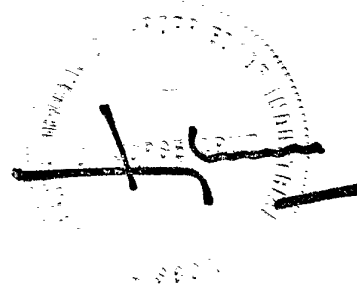
imunoglobulina está ligada a uma fracção de uma segunda proteína que pode compreender a fracção activa de uma enzima.

Boulianne *et al.*, Nature 312:643 (1984) construiu um gene de imunoglobulina em que os segmentos de DNA que codificam a regiões variáveis de ratinho específicas para o hapteno trinitro-fenol (TNP) são ligados a segmentos que codificam regiões mu e kapahumanas. Estes genes quiméricos foram expressos para dar IgM quimérica funcional de ligação a TNP.

Morrison *et al.*, P.N.A.S. (USA) 81:6851 (1984), descreve uma molécula quimérica que utiliza exões da região variável da cadeia pesada de uma proteína G de mieloma anti-fosforilcolina, que foram ligados aos exões de um dos genes da cadeia leve kapa humana. Os genes foram usados para transfectar linhas celulares de mieloma de ratinho, gerando células transformadas que produziram IgG quimérica ratinho-humano com função de ligação a antígeno.

O Pedido de Patente PCT Nº WO89/02922 (1989), descreve moléculas de anticorpos quiméricas compreendendo CD4 humano. Tais moléculas de anticorpo quiméricas podem ser administradas a um indivíduo infectado com HIV para tratar a infecção por HIV.

Apesar do progresso conseguido na determinação do mecanismo da infecção por HIV, continua a existir a necessidade de métodos de tratamento de infecções virais por HIV.

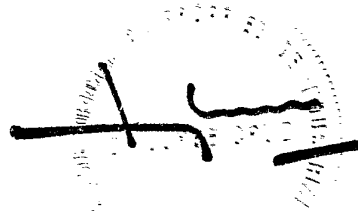


# SUMÁRIO DO INVENTO

O invento está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando CD4 de primata não humano ou um seu fragmento de ligação a gp120 de HIV ou de SIV.

Em particular, o invento está relacionado com uma molécula de ácido nucleico que especifica CD4 de macaco rhesus compreendendo a seguinte sequência de DNA:

|     |                                                              |     |
|-----|--------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | ATGAACCGGGGAATCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTACTCCCA |     |
| -25 | MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro |     |
|     | GCAGTCACCCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAGAAAGGGGATACAGTGGAACTGACC | 120 |
|     | AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr | 15  |
| 121 | TGTACAGCTTCGCAGAAGAAGAACACACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCGATAAAG   |     |
| 16  | CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys |     |
|     | ATTCTGGGAATTCAGGGTCTCTTCTTAACATAAGGTCCATCCAAGCTGAGCGATCGTGCT | 240 |
|     | IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla | 55  |
| 241 | GACTCAAGAAAAAGCCTTTGGGACCAAGGATGCTTTTCCATGATCATCAAGAATCTTAAG |     |
| 56  | AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys |     |
|     | ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGAACAAGAAGGAGGAGGTGGAATTG | 360 |
|     | IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu | 95  |
| 361 | CTGGTGTTCGGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTTGAGGGGCAAAGCCTGACC |     |
| 96  | LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGluGlyGlnSerLeuThr |     |
|     | CTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCTCAGTGAAATGTAGGAGTCCAGGGGGT   | 480 |
|     | LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValLysCysArgSerProGlyGly | 135 |
| 481 | AAAAACATAAGGGGGGGAGGACCATCTCTGTGCCTCAGCTGGAGCGCCAGGATAGTGGC  |     |
| 136 | LysAsnIleGlnGlyGlyArgThrIleSerValProGlnLeuGluArgGlnAspSerGly |     |
|     | ACCTGGACATGCACCGTCTCGCAGGACCAGAAGACGGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTG | 600 |
|     | ThrTrpThrCysThrValSerGlnAspGlnLysThrValGluPheLysIleAspIleVal | 175 |



601 GTGCTAGCTTTCCAGAAGGCCTCCAGCACAGTCTATAAGAAAGAGGGGGAACAGGTGGAG  
176 ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerThrValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu

TTCTCCTTCCACTCGCCTTTACACTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTGG 720  
PheSerPheProLeuAlaPheThrLeuGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp 215

721 CAGGCGGAGAGGGCCTCCTCCTCCAAGTCTTGGATTACCTTCGACCTGAAGAACAAGGAA  
216 GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu

GTGTCTGTAAACGGGTTACCCAGGACCCCAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTC 840  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu 255

841 CACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCCCTCAGTATGCTGGCTCTGGAAACCTCACGCTGGCC  
256 HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla

CTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTCGTGGTGATGAGAGCCACT 960  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr 295

961 CAGTTCCAGGAAAATTTGACCTGTGAAGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGACGCTG  
296 GlnPheGlnGluAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuThrLeu

AGCTTGAAACTGGAGAACAAGGGGGCAACGGTCTCGAAGCAGGCGAAGGCGGTGTGGGTG 1080  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGlyAlaThrValSerLysGlnAlaLysAlaValTrpVal 335

1081 CTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGAAGTCTGGGACAGGTCTGCTA  
336 LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu

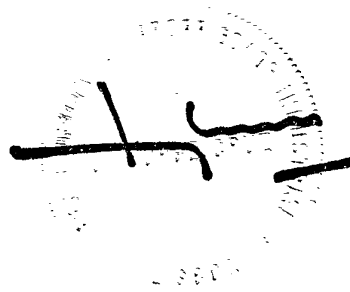
GAATCCAACATCAAGGTTGTGCCACATGGCCACCCCGGTGCAGCCAATGGCCCTGATT 1200  
GluSerAsnIleLysValValProThrTrpProThrProValGlnProMetAlaLeuIle 375

1201 GTGCTGGGGGGCGTTGCGGGCCTCCTGCTTTTCACTGGGCTAGGCATCTTCTTCTGTGTG  
376 ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheThrGlyLeuGlyIlePhePheCysVal

AGGTGCCGGCATCGAAGGCGTCAAGCAGAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCCTCAGT 1320  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer 415

1321 GAAAAGAAGACCTGCCAGTGCCCTCACCGGTTTCAGAAGACATGTAGCCCCATTTGA 1377  
416 GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIleEnd 433

ou uma sua variante degenerada.



O invento também está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando um fragmento de solúvel de CD4 de primata não humano. Em particular, o invento está relacionado com um fragmento solúvel de CD4 de rhesus (domínio I) que se liga a gp120 de HIV ou de SIV compreendendo a seguinte sequência de DNA:

```
1 ATGAACCGGGGAATCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTACTCCCA
-25 MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro

      GCAGTCACCCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAGAAAGGGGATACAGTGGAACTGACC 120
      AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr 15

121 TGTACAGCTTCGCAGAAGAAGAACACACAATTCCTGAAAACTCCAACCAGATAAAG
16 CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys

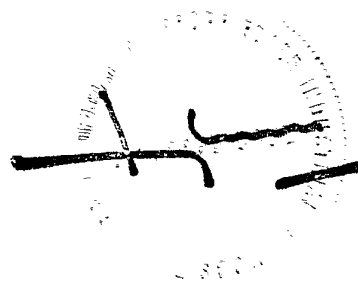
      ATTCTGGGAATTCAGGGTCTCTTCTTAACATAAGGTCCATCCAAGCTGAGCGATCGTGCT 240
      IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla 55

241 GACTCAAGAAAAAGCCTTTGGGACCAAGGATGCTTTTCCATGATCATCAAGAATCTTAAG
56 AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys

      ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGAACAGAAGGAGGAGGTGGAATTG 360
      IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu 95

361 CTGGTGTTCGGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTT
96 LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu
```

ou uma sua variante degenerada.



O invento também está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando CD4 de chimpanzé, compreendendo a seguinte sequência de DNA:

```
1  ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGTGCAACTGGCACTCCTCCCA
-25 MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro

      GCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGTGGGCAAGAAAGGGGACACAGTGGAACTGACC 120
      AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr 15

121 TGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGACAAAG
16  CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys

      ATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAACTAAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGTT 240
      IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal 55

241 GACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTTACCCTGATCATCAAGAATCTTAAG
56  AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys

      ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGGGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTG 360
      IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu 95

361 CTAGTGTTGCGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGCCTGACC
96  LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr

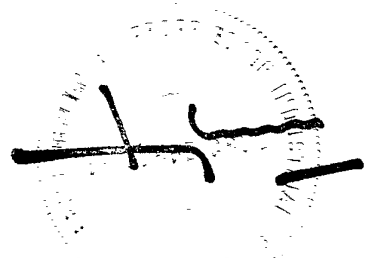
      CTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAAGGGGT 360
      LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly 135

481 AAAAACATACAGGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGC
136 LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly

      ACCTGGACATGCACTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAAGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTG 600
      ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal 175

601 GTGCTAGCTTTCAGAAAGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGGGAACAGGTGGAG
176 ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu

      TTCTCCTTCCCACTCGCCTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTGG 720
      PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp 215
```



721 CAGGCGGAGAGGGCTTCCTCCTCCAAGTCTTGGATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAA  
216 GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu

GTGTCTGTAAACGGGTTACCCAGGACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTC 840  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu 255

841 CACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCTCAGTATGCTGGCTCTGGAAACCTCACCTGGCC  
256 HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla

CTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTCGTGGTGTGAGAGCCACT 840  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr 295

961 CAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGATGCTG  
296 GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu

AGCTTGAAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTG 1080  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal 335

1081 CTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGAAGTCTGGGACAGGTCTGCTG  
336 LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu

GAATCCAACATCAAGGTTCTGCCACATGGTCCACCCGGTGCAGCCAATGGCCCTGATT 1200  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle 375

1201 GTGCTGGGGGGCGTCGCCGGCTCCTGCTTTTCATTGGGCTAGGCATCTTCTTCTGTGTC  
376 ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal

AGGTGCCGGCACCGAAGGCGCAAGCACAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCCTCAGT 1320  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer 415

1321 GAGAAGAAGACCTGCCAGTGCCCTCACCGGTTTCAGAAGACATGTAGCCCATTGA 1377  
416 GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIleEnd 433

ou uma sua sequência degenerada.

O invento também está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando um fragmento solúvel de CD4 de chimpanzé (domínio I) que se liga a gp120 de HIV ou de SIV, compreendendo a seguinte sequência de DNA:

```

1  ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCACTCCTCCA
-25 MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro

      GCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAGAAAGGGGACACAGTGGAACTGACC 120
      AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr 15

121 TGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGACAAAG
16  CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys

      ATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAACATAAGGTCCAATCCAAGCTGAATGATCGCGTT 240
      IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal 55

241 GACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTTACCCTGATCATCAAGAATCTTAAG
56  AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys

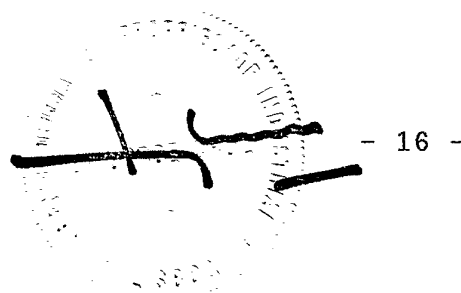
      ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGGGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTG 360
      IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu 95

361 CTAGTGTTGCGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTT
96  LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu

```

ou uma sua variante degenerada.





O invento também está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando CD4 de chimpanzé com o domínio citoplasmático, compreendendo a seguinte sequência de DNA:

```
1  ATGAACCGGGAGTCCCTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCACTCCTCCCA
-25 MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro

      GCAGCCACTCAGGGAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAGAAAGGGACACAGTGGAACTGACC 120
      AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr 15

121 TGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGAYAAAG
16  CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys
      Ile

      ATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAACATAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGYT 240
      IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal 55
      Ala

241 GACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTTMCCCTGATCATCAAGAATCTTAAG
56  AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys
      Pro

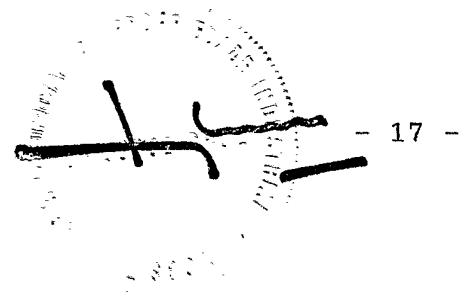
      ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGGGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTG 360
      IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu 95

361 CTAGTGTTGCGATTGACTGCCTCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGCCTGACC
96  LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr

      CTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAAGGGGT 360
      LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly 135

481 AAAACATACAGGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGC
136 LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly

      ACCTGGACATGCACTGTCTTGAGAACCAGAAGAAAGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTG 600
      ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal 175
```



601 GTGCTAGCTTTCCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGGGAACAGGTGGAG  
176 ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu

TTCTCCTTCCCACTCGCCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTGG 720  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp 215

721 CAGGCGGAGAGGGCTTCCTCCTCCAAGTCTTGGATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAA  
216 GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu

GTGTCTGTAAACGGGTTACCCAGGACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTC 840  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu 255

841 CACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCCCTCAGTATGCTGGCTCTGGAAACCTCACCTGGCC  
256 HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla

CTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTCGTGGTGATGAGAGCCACT 840  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr 295

961 CAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGATGCTG  
296 GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu

AGCTTGAAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTG 1080  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal 335

1081 CTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGACTCGGGACAGGTCTGCTG  
336 LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu

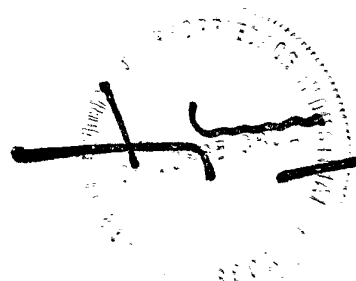
GAATCCAACATCAAGGTTCTGCCACATGGTCCACCCCGGTGCAGCCAATGGCCCTGATT 1200  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle 375

1201 GTGCTGGGGGGCGTCGCCGGCCTCCTGCTTTTCATTGGGCTAGGCATCTTCTTCTGTGTC  
376 ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal

AGGTGCCGGCACCGAAGGCGCCAAGCASAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCCTCAGT 1320  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer 415  
Glu

1321 GAGAAGAAGACCTGCCAGTGCCCTCACCGGTTTCAGAAGACATGTAGCCCCATTTGA 1377  
416 GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIleEnd 433

em que Y é C ou T,  
M é A ou C e  
S é C ou G;  
ou uma sua variante degenerada.



O invento também está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando um fragmento CD4 de chimpanzé, compreendendo a seguinte sequência de DNA:

```
1  ATGAACCGGGGAGTCCCTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCACTCCTCCCA
-25 MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro

      GCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGTCTGGCAAGAAAGGGGACACAGTGGAACTGACC 120
      AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr 15

121 TGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGAYAAAG
16  CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys
      Ile

      ATTCTGGGAATCAGGGCTCCTTCTTAATAAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGYT 240
      IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal 55
      Ala

241 GACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTTMCCCTGATCATCAAGAATCTTAAG
56  AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys
      Pro

      ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGGGGACAGAGGAGGAGGTGCAATTG 360
      IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu 95

361 CTAGTGTTTCGGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTT
96  LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu
```

em que Y é C ou T e  
M é A ou C;  
ou uma sua variante degenerada.

O invento também está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando uma molécula de ligação a gp120 capaz de glicosilação que está relacionada com CD4 humana com o domínio citoplasmático, compreendendo a seguinte sequência de DNA:

```

1  ATGAACCGGGGAGTCCCTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCCTCCCA
-25 MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro

      GCAGCCACTCAGGGAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAGGGGATACAGTGGAAGTGACC 120
      AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr 15

121 TGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGAYAAAG
16  CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys
      Ile

      ATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAACATAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGCT 240
      IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgAla 55

241 GACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTCMCCCTGATCATCAAGAATCTTAAG
56  AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys
      Pro

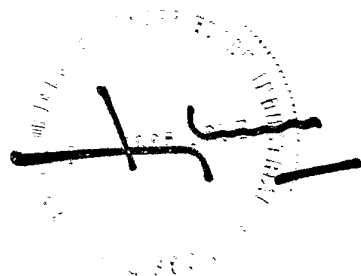
      ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTG 360
      IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAspGlnLysGluGluValGlnLeu 95

361 CTAGTGTTCTGGATTGACTGCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGCCTGACC
96  LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr

      CTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAAGGGGT 360
      LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly 135

481 AAAACATACAGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGC
136 LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly

```



ACCTGGACATGCACTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAGGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTG 600  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal 175

601 GTGCTAGCTTTCCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGGGAACAGGTGGAG  
176 ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu

TTCTCCTTCCACTCGCCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTGG 720  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp 215

721 CAGGCGGAGAGGGCTTCTCCTCCAAGTCTTGATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAA  
216 GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu

GTGTCTGTAAACGGGTTACCCAGGACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTC 840  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu 255

841 CACCTACCCTGCCCCAGGCCTTGCCTCAGTATGCTGGCTCTGGAAACCTCACCTGGCC  
256 HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla

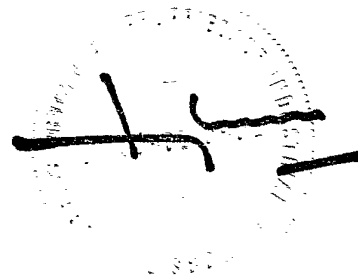
CTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTGGTGAAGAGCCACT 840  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr 295

961 CAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGATGCTG  
296 GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu

AGCTTGAAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTG 1080  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal 335

1081 CTGAACCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGAAGTGGGACAGGTCCTGCTG  
336 LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu

GAATCCAACATCAAGGTTCTGCCACATGGTCCACCCCGGTGCAGCCAATGGCCCTGATT 1200  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle 375



1201 GTGCTGGGGGCGTCGCCGGCCTCCTGCTTTTCATTGGGCTAGGCATCTTCTTCTGTGTCT  
376 ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal

AGGTGCCGGCACCGAAGGCGCCAAGCAGAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCCTCAGT 1320  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer 415

1321 GAGAAGAAGACCTGCCAGTGCCCTCACCGGTTTCAGAAGACATGTAGCCCCATTTGA 1377  
416 GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIleEnd 433

em que Y é C ou T e

M é A ou C;

ou uma sua variante degenerada;

com a condição de Y não ser T e M não ser C ao mesmo tempo.

O invento também está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando uma molécula de ligação a gp120 capaz de glicosilação que está relacionada com um fragmento de CD4b humano, compreendendo a seguinte sequência de DNA:

```

1  ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCCTCCA
-25 MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro

      GCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAGGGGATACAGTGGAACTGACC 120
      AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr 15

121 TGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGAYAAAG
16  CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys
      Ile

      ATTCTGGGAATCAGGGCTCCTTCTTAATAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGCT 240
      IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgAla 55

241 GACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTCMCCCTGATCATCAAGAATCTTAAG
56  AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys
      Pro

      ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTG 360
      IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAspGlnLysGluGluValGlnLeu 95

361 CTAGTGTTTCGGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTT
96  LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu

```

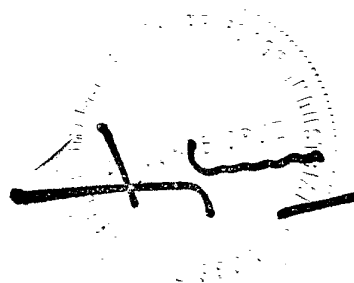
em que Y é C ou T e

M é A ou C;

ou uma sua variante degenerada;

com a condição de YU não ser T e M não ser C simultaneamente.





O invento também está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando uma proteína de fusão, compreendendo

- 1) uma molécula de ácido nucleico especificando CD4 de primata não humano ou seu fragmento que se liga a gp120 de HIV ou SIV e

- 2) uma molécula de ácido nucleico especificando uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina,

em que a molécula de ácido nucleico que especifica a região variável da referida cadeia de imunoglobulina foi substituída com a molécula de ácido nucleico especificando o referido CD4 primata não humano ou seu fragmento.

O invento também está relacionado com uma molécula de ácido nucleico especificando uma proteína de fusão, compreendendo

- 1) uma molécula de ácido nucleico especificando CD4 de primata não humano ou um seu fragmento que se liga a gp120 de HIV ou SIV, ligada a

- 2) uma molécula de ácido nucleico especificando um polipeptídeo citotóxico.

O invento também está relacionado com vetores compreendendo as moléculas de ácido nucleico do invento.

O invento também está relacionado com hospedeiros transformados com os vetores do invento. Em particular, o invento está relacionado com hospedeiros que expressam cadeias leves e pesadas complementares de imunoglobulina juntamente com o produto de expressão da referida molécula de ácido nucleico da proteína de fusão para dar uma molécula tipo imunoglobulina que se liga a gp120 de HIV ou de SIV.

O invento também está relacionado com métodos para a produção de CD4 de primata não humano ou seu fragmento que se liga a gp120 de HIV ou SIV, que se caracteriza por

cultura, num meio nutritivo adequado em condições de produção de proteína, de uma estirpe hospedeira transformada com um vector compreendendo uma molécula de ácido nucleico especificando um CD4 de primata não humano ou seu fragmento solúvel que se liga a gp120 de HIV ou SIV, o referido vector compreendendo ainda sinais de expressão que são reconhecidos pela referida estirpe hospedeira e dirigem a expressão do referido CD4 de primata não humano ou seu fragmento e recuperação do CD4 de primata não humano ou seu fragmento solúvel assim produzido.

O invento também está relacionado com um método para a produção de uma proteína de fusão compreendendo CD4 de primata não humano ou seu fragmento que se liga a gp120 e uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia de imunoglobulina foi substituída por CD4 de primata não humano ou seu fragmento que se liga a gp120 de HIV ou SIV, que se caracteriza por

cultura, num meio nutritivo adequado em condições de produção de proteína, de uma estirpe hospedeira transformada com um vector especificando a a referida proteína de fusão, o referido vector compreendendo ainda sinais de expressão que são reconhecidos pela referida estirpe hospedeira e dirigem a expressão do referido CD4 de primata não humano e

recuperação da proteína de fusão assim produzida.

Em particular, o invento está relacionado com um método para a preparação de uma molécula do tipo imunoglobulina, em que a referida estirpe hospedeira é uma linha celular de mieloma que produz cadeias leves de imunoglobulina e a referida proteína de fusão compreende uma cadeia pesada de imunoglobulina da classe IgM, IgG1 ou IgG3, em que é produzida uma molécula do tipo imunoglobulina compreendendo a referida proteína de fusão. O invento também está relacionado com um método para a preparação de uma molécula do tipo imunoglobulina, em que o referido hospedeiro produz cadeias pesadas de imunoglobulina da classe IgM, IgG1 e IgG3 juntamente com a referida proteína de fusão compreendendo uma cadeia leve de imunoglobulina para dar uma molécula do tipo imunoglobulina que se liga a gp120 de HIV ou SIV.

O invento também está relacionado com CD4 de primata não humano substancialmente puro. Em particular, o invento relaciona-se com CD4 de rhesus substancialmente puro compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla  
AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGluGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValLysCysArgSerProGlyGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyArgThrIleSerValProGlnLeuGluArgGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValSerGlnAspGlnLysThrValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerThrValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrLeuGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnPheGlnGluAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuThrLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGlyAlaThrValSerLysGlnAlaLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValValProThrTrpProThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheThrGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle.

O invento também está relacionado com CD4 de chimpanzé substancialmente puro compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle;

ou

o seu derivado glicosado

O invento também está relacionado com uma molécula de CD4 não humano substancialmente puro compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAla-%-ArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle,

em que

- @- é Tre ou Ile,
- #- é Val ou Ala,
- \$- é Tre ou Pro e
- %- é Gln ou Glu;

ou o seu derivado glicosilado.

O invento também está relacionado com uma molécula de ligação a gp120 relacionada com CD4 não humano, compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgAla  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle,

em que

-@- é Tre ou Ile e

-\$- é Tre ou Pro; ou

o seu derivado glicosilado;

com a condição de pelo menos um de -@- e -\$- ser Tre.

O invento também está relacionado com fragmentos de CD4 de primata não humano que se ligam a gp120 de HIV ou SIV. De preferência tais fragmentos de CD4 de primata não humano são solúveis em solução aquosa.

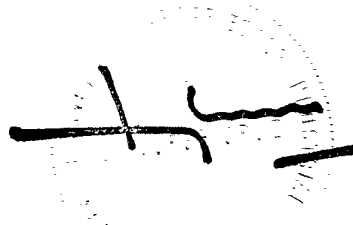
Em particular, o invento está relacionado com um fragmento solúvel de CD4 que é derivado do macaco rhesus e compreende a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla  
AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu.

O invento está também relacionado com um fragmento solúvel de CD4 de chimpanzé compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu.





O invento está também relacionado com uma molécula de ligação a gp120 capaz de ser glicosilada compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu

em que

-@- é Tre ou Ile,

-#- é Val ou Ala e

-\$- é Tre ou Pro; ou

o seu derivado glicosilado.

O invento também está relacionado com uma molécula de ligação a gp120 capaz de ser glicosilada relacionada com fragmentos de CD4 humanos. Em particular, o invento está relacionado com um fragmento de CD4 humano glicosilado compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro

AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgAla  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu

em que

-@- é Tre ou Ile e

-\$- é Tre ou Pro; ou

o seu derivado glicosilado;

com a condição de pelo menos um de -@- e -\$- ser Tre.

O invento também está relacionado com proteínas de fusão, compreendendo CD4 de primata não humano ou moléculas de ligação a gp120 do invento, ou seus fragmentos de ligação a HIV ou a SIV, ligados a um polipeptídeo citotóxico.

O invento também está relacionado com uma proteína de fusão compreendendo CD4 de primata não humano ou moléculas de ligação a gp120 do invento ou seus fragmentos que sejam capazes de se ligar a gp120 de HIV ou de SIV, ligados ao extremo C de uma segunda proteína que compreende uma cadeia pesada de imunoglobulina da classe IgM, IgG1 ou IgG3, em que a região variável da referida cadeia pesada de imunoglobulina foi substituída por CD4 ou um seu fragmento de ligação a gp120 de HIV.

O invento também está relacionado com uma molécula do tipo imunoglobulina, compreendendo:

- (1) uma proteína de fusão de CD4 de primata não humano ou um seu fragmento que se liga a gp120 de HIV ou de SIV e uma cadeia pesada de imunoglobulina, ligado a
- (2) uma cadeia leve de imunoglobulina.

O invento também está relacionado com uma proteína de fusão compreendendo CD4 de primata não humano ou moléculas de ligação a gp120 do invento, ou seus fragmentos que se liguem a gp120 de HIV ou de SIV, fundidos no extremo C a uma segunda proteína compreendendo uma cadeia leve de imunoglobulina em que a região variável foi eliminada.

O invento também está relacionado com uma molécula do tipo imunoglobulina compreendendo:

- 1) uma proteína de fusão de CD4 de primata não humano

ou molécula de ligação a gp120 do invento ou seu fragmento que se liga a gp120 de HIV ou SIV e uma cadeia leve de imunoglobulina, ligada a

- 2) uma cadeia pesada de imunoglobulina.

O invento também está relacionado com composições farmacêuticas, compreendendo

- 1) uma quantidade terapêuticamente eficaz de CD4 de primata não humano e
- 2) um veículo farmacêuticamente aceitável.

O invento também está relacionado com composições farmacêuticas, compreendendo

- 1) uma quantidade terapêuticamente eficaz de um fragmento solúvel de CD4 não humano e
- 2) um veículo farmacêuticamente aceitável.

O invento também está relacionado com composições farmacêuticas compreendendo as proteínas, glicoproteínas, proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina do invento.

O invento também está relacionado com complexos entre CD4 de primata não humano substancialmente puro e gp120 de HIV ou SIV.

O invento também está relacionado com complexos compreendendo fragmentos de CD4 não humano do invento e gp120 de HIV ou SIV.

O invento também está relacionado com complexos compreendendo as proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina do invento e gp120 de HIV ou SIV.

O invento também está relacionado com complexos entre as moléculas de ligação a gp120 capazes de sofrerem glicosilação e gp120 de HIV ou de SIV.

O invento também está relacionado com um método para o tratamento de infecções por HIV ou SIV, caracterizado pela administração a um animal necessitado de tal tratamento de uma quantidade terapêuticamente eficaz de CD4 de primata não humano substancialmente puro ou um seu fragmento solúvel.

O invento também está relacionado com um método para o tratamento de infecções por HIV ou SIV, caracterizado pela administração a um animal necessitado de tal tratamento de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma das proteínas de fusão do invento.

O invento também está relacionado com um método para o tratamento de infecções por HIV ou SIV, caracterizado pela administração a um animal necessitado de tal tratamento de uma quantidade terapêuticamente eficaz de moléculas do tipo imunoglobulina do invento.

O invento também está relacionado com um método para o tratamento de infecções por HIV ou SIV, caracterizado pela administração a um animal necessitado de tal tratamento de uma quantidade terapêuticamente eficaz das moléculas de ligação a gp120 do invento.

O invento também está relacionado com um método para a detecção de gp120 de HIV ou de SIV numa amostra, caracterizado por

(a) contacto de uma amostra suspeita de conter gp120 de HIV ou de SIV com a proteína de fusão ou molécula do tipo imunoglobulina do invento e

(b) detecção da formação do complexo

O invento também está relacionado com um método para a detecção de gp120 de HIV ou de SIV numa amostra, caracterizado por

(a) contacto de uma amostra suspeita de conter gp120 de HIV ou de SIV com CD4 de primata não humano ou um seu fragmento que seja capaz de se ligar a gp120 de HIV ou de SIV e

(b) detecção da formação do complexo.

O invento está relacionado com a descoberta de que os primatas não humanos têm CD4 com uma sequência de aminoácidos diferente do CD4 humano. O invento também está relacionado com a descoberta de que quando CD4 de primata não humano é expresso na superfície de células humanas, substancialmente menos células gigantes multinucleadas ou sincícios são formados do que quando CD4 humano é expresso na superfície da célula. O invento também está relacionado com a descoberta de que a presença de um resíduo glicina na posição 87 em CD4 de primata não humano derivado de chimpanzé, em vez de resíduo de ácido glutâmico tal como se encontra em CD4 humano é responsável pela ausência da formação de sincícios. Como resultado a molécula de CD4 derivada de chimpanzé pode agora ser usada em aplicações terapêuticas sem o potencial de causar a formação de sincícios.

O invento está também relacionado com a descoberta inesperada que CD4 de chimpanzé contem dois sítios de

glicosilação (posições 36 e 66 (ASN)). A descoberta permite a preparação de moléculas glicosiladas de ligação a gp120 e seus fragmentos que se ligam a gp120 e provavelmente são mais estáveis in vivo. Vantajosamente, as moléculas glicosiladas de ligação a gp120 e seus fragmentos podem ser administradas menos frequentemente a um animal do que outras moléculas CD4 humanas ou de outros primatas que não sejam glicosiladas. Assim, o invento também está relacionado com moléculas CD4 de primatas (incluindo humanos) tendo um ou mais sítios de glicosilação, por exemplo, a sequência de chimpanzé nos resíduos de aminoácidos 34 e 68, só em 34 e só em 68. O invento também está relacionado com outras moléculas de CD4 com sítios de glicosilação noutras posições, desde que a molécula retenha a ligação a gp120.

#### DESCRIÇÃO DE REALIZAÇÕES PREFERIDAS

O invento é dirigido a moléculas de ácido nucleico especificando CD4 de primata não humano, seus fragmentos de ligação a gp120 de HIV, seus fragmentos solúveis de ligação a gp120 de HIV, suas proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina. O invento também está relacionado com moléculas de ligação a gp120 capazes de serem glicosiladas, seus fragmentos de ligação a gp120, suas proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina. As moléculas de ácido nucleico do invento pode ser uma molécula de DNA ou de RNA.

O termo «solúvel» pretende significar que o fragmento de CD4 é solúvel em soluções aquosas que incluem, mas não estão limitadas a tampões aquosos sem detergentes e fluidos do corpo tais como sangue, plasma e soro.

O invento também é dirigido à expressão destas novas moléculas de ácido nucleico em hospedeiros transformados para dar proteínas e glicoproteínas. O invento também está relacionado com a utilização destas proteínas e glicoproteínas para tratar e diagnosticar infecções pelo HIV.

Em particular, o invento está relacionado com a expressão das referidas moléculas de ácido nucleico, as quais especificam uma proteína de fusão compreendendo uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina, em hospedeiros mamíferos que expressem imunoglobulinas de cadeias leves ou pesadas complementares para dar uma molécula do tipo imunoglobulina que se liga a gp120 de HIV ou de SIV.

As proteínas CD4, glicoproteínas, fragmentos de CD4, proteínas de fusão ou moléculas do tipo imunoglobulina do invento podem ser administradas a um animal para tratamento de infecções por HIV ou SIV. O termo «infecções por HIV» significa a condição de ter AIDS, complexo relacionado com AIDS (ARC) ou sempre que um animal seja portador do vírus AIDS, mas não apresente os sintomas clínicos de AIDS ou ARC. O termo «infecção por SIV» significa a condição de estar infectado com o vírus da imunodeficiência símia.

O termo «animal» engloba todos os animais que possam beneficiar da administração das proteínas CD4, glicoproteínas, fragmentos de CD4, moléculas de ligação a gp120, proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina do invento. Entre tais animais estão os humanos, no entanto o invento não pretende estar-lhes limitado.



O termo «proteína de fusão» significa uma proteína fundida compreendendo uma molécula CD4 do invento ou seu fragmento que seja capaz de se ligar a gp120, ligada no seu extremo C a uma cadeia de imunoglobulina em que a fracção do extremo N da imunoglobulina foi substituída por CD4 de primata não humano. Como alternativa, a molécula de CD4 ou seu fragmento pode ser ligado a um polipeptídeo citotóxico como seja ricino ou toxina da difteria.

O termo «primata não humano» significa qualquer membro da subordem Anthropeidea exceptuando a família Hominidae. Tais primatas não humanos incluem a superfamília Ceboidea, a família Cebidae (os macacos do Novo Mundo incluindo os capuchinhos, macacos urradores, macacos-aranha, e macacos-esquilo) e a família Callithricidae (incluindo saguins); a superfamília Cercopitheciidae (incluindo os macacos, mandris, babuínos, macacos narigudos, macacos monos e os macacos hanumanos sagrados da Índia); a superfamília Hominoidea, a família Pongidae (incluindo gibões, orangotangos, gorilas e chimpanzés). O macaco rhesus é um membro dos macacos.

As moléculas de ácido nucleico e proteínas do invento podem ser preparados de acordo com métodos aqui divulgados e de acordo com métodos bem conhecidos de síntese em fase sólida usando as sequências de aminoácidos e de DNA aqui divulgadas.

Como descrito mais detalhadamente nos exemplos abaixo, o resíduo gli na posição 87 de CD4 derivado de chimpanzé difere do resíduo glu presente em CD4 humano que é responsável pela formação de sincícios. Esta descoberta permite a preparação de novas moléculas CD4 que não medeiem a formação de sincícios. Um exemplo de tal proteína relacionada com a molécula CD4 de chimpanzé compreende a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAla-%-ArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle,

em que

- @- é Tre ou Ile,
- #- é Val ou Ala,
- \$- é Tre ou Pro e
- %- é Gln ou Glu;

ou o seu derivado glicosilado.

As moléculas de DNA recombinante que codificam esta família de proteínas e glicoroteínas tem a seguinte sequência:

```

1  ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCACTCCTCCCA
   GCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAGAAAGGGGACACAGTGGAACTGACC
121 TGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACAGAYAAAG
   ATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAATAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGYT
241 GACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTTWCCCTGATCATCAAGAATCTTAAG
   ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGGGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTG
361 CTAGTGTTCCGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGCCTGACC
   CTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAAGGGGT
481 AAAACATACAGGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGC
   ACCTGGACATGCACTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAAGTGGAGTTCAAATAGACATCGTG
601 GTGCTAGCTTTCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGGGAACAGGTGGAG
   TTCTCCTTCCCACTCGCCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTG
721 CAGGCGGAGAGGGCTTCTCTCCAAGTCTTGATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAA
   GTGTCTGTAAACGGGTTACCCAGGACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTC
841 CACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCCCTCAGTATGCTGGCTCTGGAAACCTCACCTGGCC
   CTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTCGTGGTGATGAGAGCCACT
961 CAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGATGCTG
   AGCTTGAACTGGAGAACAAGGAGGCAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTG
1081 CTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGACTCGGGACAGGTCTGCTG
   GAATCCAACATCAAGGTTCTGCCCACATGGTCCACCCCGGTGCAGCCAATGGCCCTGATT
1201 GTGCTGGGGGGCGTCGCCGGCTCTGCTTTTCATTGGGCTAGGCATCTTCTTCTGTGTC
   AGGTGCCGGCACCGAAGGCGCCAAGCASAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCCTCAGT
1321 GAGAAGAAGACCTGCCAGTGCCTCACCGGTTTCAGAAGACATGTAGCCCCATTGA

```

em que Y é C ou T,

W é A ou C e

S é C ou G;

ou uma sua variante degenerada.

Em geral, para a preparação de proteínas de fusão compreendendo uma imunoglobulina, a fracção da imunoglobulina que é eliminada é a região variável. As proteínas de fusão do invento podem compreender também imunoglobulinas em foi eliminado mais do que a região variável e substituido por pela molécula de CD4 ou seu fragmento de ligação a gp120 de HIV. Por exemplo, as regiões  $V_H$  e CH1 de uma cadeia de imunoglobulina podem ser eliminadas. Na prática, qualquer quantidade do extremo N da cadeia pesada de imunoglobulina pode ser eliminada desde que o restante fragmento medeie a morte celular pela função efectora de anticorpos ou outro mecanismo. A sequência mínima necessária para a ligação do complemento inclui os domínios CH2 e CH3. A ligação de fracções Fc pela região de de charneira é vantajoso para o aumento da eficácia da ligação do complemento.

As moléculas de CD4 do invento e as suas proteínas de fusão podem compreender a sequência completa de CD4, a região extracelular de 327 aminoácidos e o domínio que atravessa a membrana ou só a região extracelular. Ainda, as proteínas de fusão podem compreender fragmentos da região extracelular que retenham a ligação a gp120 de HIV. O domínio extracelular de CD4 consiste em quayro regiões contíguas cada uma sendo semelhante na sequência de aminoácidos e estruturalmente com os domínios variável e de ligação (V-J) das cadeias leves de imunoglobulina assim como com regiões relacionadas noutros membros da superfamília de genes das imunoglobulinas. Estas regiões estruturalmente semelhantes de CD4 são designadas domínios  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$  e  $V_4$ . Ver Pedido de Patente PCT Nº WO 89/02922 (publicado em 3 de Outubro, 1988). Assim, a CD4 de primata não humano e as suas proteínas de fusão podem compreender qualquer combinação de tais regiões de ligação. Em geral, qualquer fragmento das proteínas e glicoproteínas CD4 do invento podem ser usadas desde que retenham a capacidade de ligação a gp1120.

Os fragmentos CD4 de ligação a gp120 podem ser obtidos cortando a sequência de DNA que codifica CD4 de chimpanzé no sítio Nhe na posição 603 (para dar uma molécula que codifica dois domínios de ligação) ou o sítio BspM1 na posição 405 (para dar uma molécula que codifica um domínio). Como alternativa, a molécula de DNA codificadora de CD4 de rhesus pode ser cortada no sítio Nhe na posição 603 (para dar uma molécula que codifica dois domínios) ou no sítio BspM1 na posição 405 (para dar uma molécula que codifica um domínio). Podem ser obtidos outros fragmentos usando por exemplo uma exonuclease. O fragmento de DNA pode então ser incorporado num vector de clonagem e introduzido num hospedeiro, seguindo-se o despiste do hospedeiro transformado quanto à presença de uma proteína que se ligue a gp120. Os métodos para o despiste de clones relativamente a actividade específica de ligação são bem conhecidos dos familiarizados com a matéria. De preferência, tais fragmentos CD4 são solúveis em solução aquosa.

Sempre que a proteína de fusão compreende uma cadeia leve de imunoglobulina, é necessário que se retire à cadeia de Ig apenas o necessário para a formação de um complexo estável com uma cadeia pesada de Ig. Em particular, devem ser preservados os resíduos cisteína para a formação de uma ponte dissulfureto tanto na fracção de cadeia pesada como na de leve.

Quando expressa num hospedeiro, e.g., uma célula de mamífero, a proteína de fusão pode associar-se a outras cadeias de Ig leves ou pesadas secretadas pela célula para dar uma molécula do tipo imunoglobulina funcional que é capaz de se ligar a gp120. a gp120 pode estar em solução, estar expressa na superfície de células infectadas ou pode estar presente na superfície do próprio vírus HIV. Como alternativa, a proteína de fusão pode ser expressa numa célula de mamífero que não secreta outras

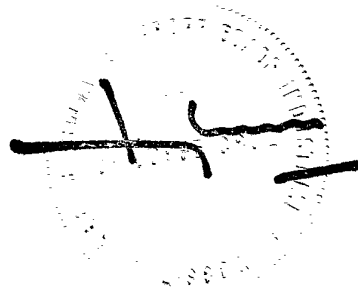
cadeias de Ig leves ou pesadas. Quando expressa nestas condições, a proteína de fusão pode formar um homodímero.

Na realização do invento podem ser usadas sequências genómicas ou de cDNA. As sequências genómicas são expressas eficazmente em células de mieloma, uma vez que elas contêm estruturas de promotores nativas.

As regiões constantes do anticorpo clonado e usado na molécula quimérica tipo imunoglobulina podem ser derivadas de qualquer fonte de mamífero. Elas podem ser activas na ligação do complemento ou em ADCC. As regiões constantes podem ser derivadas de qualquer isotipo adequado, incluindo IgG1, IgG3 ou IgM.

A ligação dos vários fragmentos de DNA, é efectuada de acordo com técnicas convencionais, empregando extremos cerses ou coesivos na ligação, digestão com enzimas de restrição para proporcionar extremos adequados, preenchimento dos extremos coesivos conforme adequado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar ligações indesejáveis e ligação com ligases adequadas. A construção genética pode facultativamente codificar uma sequência líder para permitir expressão eficaz da proteína de fusão. Por exemplo pode ser usada a sequência líder utilizada por Maddon et al., Cell 42:93-104 (1985) para a expressão de CD4 humano.

Para o isolamento de cDNA, as bibliotecas de cDNA podem ser despistadas, por exemplo, usando uma sonda complementar ou por ensaio da molécula CD4 expressa do invento usando um anticorpo específico de CD4. Os métodos para a preparação de anticorpos por imunização de animais com um antigénio estão descritas, por exemplo, por Kohler e Milstein, Nature (London) 256:495 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler et al., Eur.



J. Immunol. 6:292 (1976); ou Hammerling et al., em Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, NY., pp.563-681 (1981). O invento está ainda relacionado com anticorpos monoclonais e policlonais que são específicos para as proteínas CD4 não humanas, glicoproteínas do invento e seus fragmentos solúveis e não solúveis.

CD4 de primata não humano pode ser derivado de qualquer membro da subordem Anthropeidea exceptuando a família Hominidae. De preferência, CD4 de primata não humano deriva de macaco rhesus ou chimpanzé, se bem que o invento não pretenda estar-lhe limitado. Os familiarizados com a matéria podem obter CD4 de qualquer outra fonte de primatas através do isolamento de RNA poli-A a partir de células mononucleadas do sangue periférico obtidas do animal particular. Após preparação do cDNA por exemplo com transcriptase reversa, o cDNA pode ser ligado num vector de clonagem adequado e usado para transformar um hospedeiro adequado. Os clones podem então ser despistados com um anticorpo monoclonal dirigido contra CD4 de macaco rhesus ou de chimpanzé do invento seguido de selecção dos clones positivos ou por hibridação com os cDNAs de CD4 de chimpanzés ou de rhesus.

Para expressar as moléculas CD4 e as proteínas híbridas de fusão do invento, são necessários sinais de transcrição e tradução reconhecidos por um elemento hospedeiro adequado. Os hospedeiros eucarióticos que podem ser usados incluem células de mamífero susceptíveis de serem cultivadas in vitro, particularmente leucócitos, mais particularmente células de mieloma ou outros linfócitos transformados ou oncogénicos, e.g., células transformadas com EBV. Com vantagem são usadas células de mamífero para expressar as proteínas CD4 glicosiladas. Como alternativa, podem ser empregues células que não sejam de mamífero, tais

como bactérias, fungos, e.g., leveduras, fungos filamentosos ou similares.

Os hospedeiros preferidos para a produção de proteínas de fusão são células de mamífero, cultivadas in vitro em cultura de tecidos ou in vivo em animais. As células de mamífero proporcionam modificação pós-tradução às moléculas de proteína imunoglobulina o que confere o enrolamento correcto e glicosilação dos sítios adequados. As células de mamífero que podem úteis como hospedeiros incluem células de origem fibroblástica tais como VERO ou CHO-K1 ou células de origem linfóide, tais como o híbrido SP2/O-AG14 ou o mieloma P3x63Sgh e seus derivados. Com a finalidade de preparar uma molécula do tipo imunoglobulina, um plasmídeo contendo um gene que codifica uma cadeia pesada de imunoglobulina, em que a região variável foi substituída por uma das moléculas CD4 do invento, pode ser introduzido, por exemplo, em células de mieloma J558L, um plasmacitoma de ratinho que expressa a cadeia leve lambda-1 mas que não expressa a cadeia pesada (ver Oi et al., P.N.A.S. (USA) 80:825-829 (1983)). Outros hospedeiros preferidos incluem células COS, células BHK e células de hepatoma. Outros hospedeiros preferidos incluem células COS, células BHK e células de hepatoma.

As construções podem ser ligadas umas às outras para formar um único segmento de DNA ou podem ser mantidas como segmentos separados, por eles próprios ou conjuntamente com vectores.

Sempre que a proteína não seja glicosilada, pode ser usado qualquer hospedeiro para expressar a proteína que é compatível com a replicação e transcrição de sequências no plasmídeo de expressão. Em geral, os vectores contendo sequências de controle da replicação e transcrição derivam de espécies



compatíveis com a célula hospedeira a ser usada. Normalmente o vector é portador de uma origem de replicação, assim como de genes específicos que são capazes de proporcionar selecção fenotípica em células transformadas. A expressão de moléculas CD4 de primata não humano e de proteínas de fusão pode também ser colocada sob o controle de outras sequências reguladoras que possam ser homólogas para o organismo no seu estado não transformado. Por exemplo, DNA cromossómico de E. coli dependente de lactose ou operão lac que medeia a utilização de lactose ao elaborar a enzima beta-galactosidase. Os elementos de controle lac podem ser obtidos a partir do fago bacteriano lambda plac5 que é infeccioso para E. coli. O sistema promotor-operador lac pode ser induzido por IPTG.

Podem igualmente ser empregues outros sistemas promotores/operadores ou fracções dele. Por exemplo, podem ser usados colicina E1, galactose, fosfatase alcalina, triptofano, xilose, tax e similares.

Para os hospedeiros mamíferos existem disponíveis para expressão vários sistemas vectores possíveis. Uma classe de vectores utiliza elementos de DNA que derivam de vírus animais tais como vírus de papiloma bovino, vírus polioma, adenovírus, vírus da vacina, baculovírus, retrovírus (RSV, MMTV ou MOMLV) ou vírus SV40. As células que têm estávelmente integrado o DNA nos seus cromossomas podem ser seleccionadas por introdução de uma ou mais marcas que permitam a selecção de células hospedeiras transfectadas. A marca pode proporcionar prototrofia a um hospedeiro auxotrófico, resistência a biocidas, e.g., antibióticos ou metais pesados tais como cobre ou similares. O gene da marca seleccionável pode ser ligado directamente às sequências de DNA a serem expressas ou introduzido na mesma célula por cotransformação. Podem ser também necessários elementos adicionais para a

síntese óptima de mRNA. Estes elementos podem incluir sinais de «splicing», assim como promotores, potenciadores e sinais de terminação da transcrição. Os vectores de expressão de cDNA que possuem tais elementos incluem os descritos por Okayama, H., Mol. Cel. Biol., 3:280 (1983) e outros.

Uma vez preparado para expressão o vector ou sequência de DNA contendo as construções, as construções de DNA podem ser introduzidas num hospedeiro adequado. Podem ser empregues várias técnicas, tais como fusão de protoplastos, precipitação com fosfato de cálcio, electroporação ou outras técnicas convencionais. Após a fusão as células são cultivadas em meio e despistadas quanto à actividade adequada. A expressão do(s) gene(s) resulta na produção da proteína pretendida. Se o produto expresso fôr uma proteína de fusão, ela pode então ser submetida a posterior montagem com uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina para formar uma molécula tipo imunoglobulina.

As células hospedeiras para a proteína e glicoproteína CD4, fragmento de CD4 e produção de imunoglobulina podem ser células imortalizadas, principalmente células de mieloma ou de linfoma. Estas células podem ser cultivadas em meio nutritivo adequado em frascos de cultura ou injectadas num hospedeiro sinérgico, e.g., murganho ou rato, ou hospedeiro imunodeficiente ou parte imunodeficiente do hospedeiro, e.g., murganho labro ou bolsa de cobaio. Em particular, as células podem ser introduzidas na cavidade abdominal de um animal para permitir a produção de fluido ascítico que contenha a molécula tipo imunoglobulina. Como alternativa, as células podem ser injectadas subcutâneamente e o anticorpo quimérico ser colhido do sangue do hospedeiro. As células podem ser usadas como as células de hibridoma. Ver Diamond et al., N. Eng. J. Med. 304:1344 (1981) e Kennatt,

McKearn e Bechtol (Eds.), Monoclonal Antibodies: Hybridomas: -- A New Dimension in Biologic Analysis, Plenum, 1980.

As proteínas CD4, glicoproteínas, fragmentos de CD4, proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina do invento podem ser isolados e purificados de acordo com condições convencionais, tais como extracção, precipitação, cromatografia, cromatografia de afinidade, electroforese ou similares. Por exemplo, as proteínas, glicoproteínas e fragmentos de CD4 podem ser purificados por passagem de uma solução contendo-os através de uma coluna com gp120 nela imobilizado (ver Patente U.S. Nº 4,725,669). A molécula de CD4 ligada pode então ser eluida por tratamento com um sal caotrópico ou por eluição com ácido acético aquoso (1 M).

As proteínas de fusão de Ig podem ser purificadas por passagem de uma solução contendo a proteína de fusão através de uma coluna que contem proteína A ou proteína G imobilizada que selectivamente se liga à fracção Fc da proteína de fusão. Ver por exemplo, Reis, K.J., et al., J. Immunol. 132:3098-3102 (1984); Pedido de Patente PCT, Publicação Nº WO87/00329. O anticorpo quimérico pode ser eluido por tratamento com um sal caotrópico ou por eluição com ácido acético aquoso (1 M).

Como alternativa as proteínas CD4 de primata não humano e glicoproteínas, fragmentos, proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina podem ser purificadas em colunas de anticorpo anti-CD4 ou em colunas de anticorpo anti-imunoglobulina para dar uma proteína substancialmente pura.

O termo «substancialmente puro» pretende significar que a proteína está livre de impurezas que normalmente lhe estão

associadas. Este grau de pureza pode ser evidenciado por uma única banda em electroforese.

Numa realização do invento, as sequências de cDNA que codificam moléculas de CD4 do invento ou um seu fragmento que se ligue a gp120, podem ser ligadas num plasmídeo de expressão que codifique um anticorpo em que a região variável do gene foi eliminada. Métodos para a preparação de genes que codificam as regiões constantes da cadeia pesada ou leve estão descritos por exemplo por Robinson, et al., Pedido de Patente PCT, Publicação N<sup>o</sup> WO87-02671. A sequência de cDNA codificadora da molécula CD4 ou seu fragmento pode ser directamente ligada ao cDNA codificador das regiões constantes de Ig leves ou pesadas ou pode sere através de uma sequênci de ligação. De preferência a sequência de ligação não codifica um produto proteico que dê origem a uma reacção antigénica no indivíduo.

As moléculas tipo imunoglobulina preferidas contendo CD4 do invento, ou seus fragmentos, contêm a região constante de um anticorpo IgM, IgG1 ou IgG3.

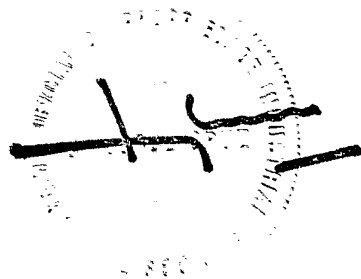
As proteínas CD4, glicoproteínas, fragmentos, proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina e suas composições farmacêuticas podem ser usadas no tratamento ou profiláxia de infecções virais por HIV. Este método caracteriza-se pela administração a um animal de uma quantidade eficaz de proteínas CD4, glicoproteínas, fragmentos, proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina e suas composições farmacêuticas, as quais são capazes de formar especificamente um complexo com gp120 de modo a tornar HIV ou SIV, com os quais estão infectadas as células do indivíduo, incapazes de infectar células T4<sup>+</sup>.

A proteína de fusão e a molécula do tipo imunoglobulina podem-se complexar com gp120 que é expresso nas células infectadas. Se bem que o inventor não esteja ligado a qualquer teoria particular, parece que a fracção Fc de proteína de fusão ou da molécula tipo imunoglobulina pode ligar-se ao complemento para mediar a destruição da célula. Deste modo, as células infectadas são destruídas de modo a parar a produção adicional de partículas virais.

Com a finalidade de tratar as infecções por HIV, as moléculas de CD4 de primata não humano ou seus fragmentos, proteínas de fusão ou moléculas tipo imunoglobulinado invento podem conter adicionalmente uma marca radioactiva, agente terapêutico ou polipeptídeo citotóxico que aumente a destruição da partícula HIV ou da célula infectada com HIV.

São exemplos de radiosíotopos que se podem ligar a proteínas, glicoproteínas, proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina do invento para usar na terapia do HIV  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{217}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$  e  $^{109}\text{Pd}$ . Facultativamente, uma marca tal como bóron pode ser usada a qual emite partículas  $\beta$  quando do bombardeamento com radiação de neutrões.

Para o diagnóstico in vivo os radionuclídeos podem ser ligados a proteínas CD4, glicoproteínas ou seus fragmentos, proteínas de fusão ou moléculas do tipo imunoglobulina directamente ou usando um grupo funcional intermediário. Um grupo intermediário que é muitas vezes usado para ligar radioisótopos, os quais existem como catiões metálicos, a anticorpos é o ácido dietilenotriaminapentacético (DTPA). São exemplos típicos de catiões metálicos que se ligam desta forma  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  e  $^{68}\text{Ga}$ .



Ainda, as proteínas CD4 e glicoproteínas ou seus fragmentos, proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina podem ser ligadas a um agente para formação de imagens por NMR que inclui átomos paramagnéticos. A utilização de um agente de formação de imagens por NMR permite o diagnóstico in vivo da presença e do grau de infecção pelo HIV num paciente usando técnicas de NMR. Elementos particularmente úteis com esta finalidade são  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{52}\text{Cr}$  e  $^{56}\text{Fe}$ .

A introdução de moléculas de ácido nucleico do invento por terapia genética pode também ser considerada, por exemplo, usando retrovírus ou outros meios para introduzir o material genético especificando as proteínas de fusão em tecidos alvo adequados. Nesta realização, os tecidos alvo tendo as moléculas de ácido nucleico do invento podem então produzir as moléculas CD4 ou proteína de fusão in vivo.

As moléculas de ácido nucleico especificando as moléculas de CD4 ou seus fragmentos podem ser usadas para reconstituir o sistema imune de um indivíduo que sofra de HIV. Por exemplo, as células de medula óssea de um indivíduo infectado por HIV podem ser removidas e as células hematopoiéticas, quer como parte de uma população mista quer como uma fracção purificada, podem ser infectadas ou transfectadas com um vírus ou construção de DNA que especifique CD4 de primata não humano ou seu fragmento. A produção de CD4 humano pode ser parada ao incluir-se na mesma construção genética ou noutra diferente, um gene que interfira com a expressão de CD4 humano. Tal gene pode tomar muitas formas, por exemplo ele pode codificar RNA que se liga a uma proteína reguladora (uma vez que CD4 de primata não humano pode estar sob outro controle, a sua expressão não será afectada); um RNA anticódon que se ligue selectivamente ao gene CD4 humano; ou uma proteína de ligação a DNA a que tenha sido removida a sua região

reguladora. As células modificadas serão então injectadas novamente parao paciente onde migrarão para a medula óssea. De preferência, a medula terá sido previamente limpa de células hematopoiéticas normais por irradiação ou com uma droga citotóxica. Ver Baltimore, D. Nature 335:395-396 (1988).

São bem conhecidos os métodos para a transfecção de células hematopoiéticas e estão descritos por exemplo por Wetherall, D.J., Nature 331:13-14 (1988); Dick, J.E., Ann. N. Acad. Sci. 507:242-251 (1987); Eglitis, D.B. et al., Science 230:1395-1398 (1985); Gillio, A. et al., Ann. N. Acad. Sci. 511:406-417 (1987). Métodos para a transfecção de células com RNA anti-codão estão descritos, por exemplo, por Hambor, J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:4010-4014 (1988); Sanford, J.C., J. Theor. Biol. 130:469-480 (1988); Izant, J.G. et al., Science 229:345-352 (1985); e Hambor, J.E. et al., J. Exp. Med. 168:1237-1245 (1988).

CD4 de primata não humano e seus fragmentos solúveis e não solúveis que se ligam a gp120 de HIV ou de SIV, podem também ser usados in vivo para tratar infecções por HIV através do bloqueio da infecção de linfócitos humanos portadores de CD4 e a formação de sincícios. Ver Lui, M. et al., J. Clin. Invest. 82:2176-2180 (1988) ou Fischer, R.A. et al., Nature 331:76-78 (1988) para uma discussão sobre a utilização de CD4 humano e seus fragmentos solúveis para bloquear a infecção por HIV de linfócitos portadores de CD4 e a formação de sincícios.

As proteínas de fusão compreendendo as proteínas CD4, glicoproteínas e seus fragmentos e um agente terapêutico podem também ser usados para tratar individuos infectados com HIV matando as células infectadas in vivo. Os agentes terapêuticos podem incluir, por exemplo, polipeptídeos citotóxicos tais como

toxinas bacterianas, toxina da difteria ou ricino. Métodos para a produção de proteínas de fusão compreendendo o fragmento A da toxina da difteria estão descritos na Patente U.S. 4,675,382 (1987) que aqui é incluído como referência. A toxina da difteria contém duas cadeias polipeptídicas. A cadeia B liga a toxina a um receptor na superfície celular. A cadeia A entra no citoplasma e inibe a síntese proteica ao inactivar o factor de elongação 2, o factor que faz a translocação dos ribossomas ao longo do mRNA simultâneamente com a hidrólise de ATP. Ver Darnell, J., et al., em Molecular Cell Biology, Scientific American Books, Inc., página 662 (1986). Como alternativa, pode ser preparada uma proteína de fusão compreendendo ricino, uma lectina tóxica. Métodos para a preparação de uma proteína de fusão compreendendo CD4 humano ligado a regiões activas da endotoxina A de Pseudomonas e a sua utilização para matar selectivamente células infectadas por HIV estão descritos por Chaudhary, V.K. et al., Nature 335:369-372 (1988), que é aqui incluído como referência.

As gamas das doses para a administração das proteínas CD4, glicoproteínas e seus fragmentos, proteínas de fusão e moléculas do tipo imunoglobulina serão as suficientes para produzir o efeito pretendido ou seja, o melhoramento dos sintomas da infecção por HIV ou SIV. A dosagem não deve demasiadamente grande para poder causar efeitos secundários adversos, tais como reacções cruzadas indesejáveis, reacções anafiláticas e similares. De um modo geral, a dosagem variará com a idade, estado, sexo e grau de doença do paciente, contra-indicações, caso existam, tolerância imune e outras variáveis deste tipo a serem consideradas pelo médico assistente. A dosagem pode variar de 0,001 mg/Kg a 50 mg/Kg, de preferência 0,1 mg/Kg a 1,0 mg/Kg da molécula CD4 do invento, molécula de ligação a gp120 ou seu fragmento, proteína de fusão ou molécula tipo imunoglobulina, numa ou mais administrações diárias, durante um ou vários dias. A

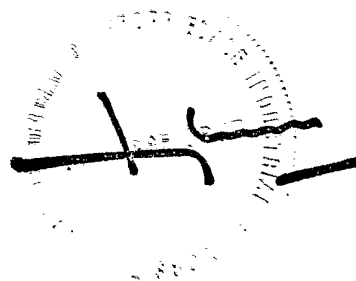


molécula tipo imunoglobulina pode ser administrada parenteralmente por injeção ou por perfusão gradual ao longo do tempo. Elas podem ser administradas intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente ou subcutâneamente.

As preparações para administração parenteral incluem soluções aquosas ou não aquosas, suspensões e emulsões. São exemplos de solventes não aquosos propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais tais como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis tais como oleato de etilo. Os veículos aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo soro fisiológico e meios tamponados. Os veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, solução de Ringer lactada ou óleos fixos. Os veículos intravenosos incluem agentes de enchimento fluidos e nutrientes, electrólitos, tais como os baseados na dextrose de Ringer e similares. Os preservativos e outros aditivos podem também estar presentes, tais como, por exemplo, agentes anti-microbianos, anti-oxidantes, agentes de quelação, gases inertes, e similares. Ver, para informação geral, Remington's Pharmaceutical Science, 16ª Ed., Mack Ads., 1980.

O invento também está relacionado com um método para a preparação de um medicamento ou composição farmacêutica compreendendo os componentes do invento, o medicamento a ser usado para terapia da infecção por HIV ou SIV em animais.

As proteínas e glicoproteínas do presente invento podem também ser usadas em combinação com outras terapêuticas usadas no tratamento de AIDS, ARC e infecção por HIV. Por exemplo, as proteínas e glicoproteínas podem ser coadministradas com agentes anti-retrovirais que bloqueiam a transcriptase reversa tais como AZT, DDI, HPA-23, fosfonoformato, suramina, ribavirina e



desoxicitidina. Como alternativa, as proteínas e glicoproteínas do invento podem ser coadministradas com tais agentes anti-virais tais como interferões, incluindo interferão alfa, interferão gama, interferão ômega ou inibidores de glucosidase tais como castanospermina. Tais terapias de combinação podem ser com vantagem utilizar doses mais baixas daqueles agentes de modo a minimizar a toxicidade e aumentar a eficácia do tratamento.

A detecção e quantificação de substâncias antigénicas e amostras biológicas frequentemente utilizam técnicas de imunoen-saio. Estas técnicas são baseadas na formação do complexo entre a substância antigénica, e.g., gp120, a ser testada e um anticorpo ou anticorpos em que um dos membros do complexo pode ser marcado de forma detectável. No presente invento, as proteínas Cd4, glicoproteínas ou seus fragmentos, moléculas do tipo imunoglobulina ou proteínas de fusão podem ser marcadas com qualquer marca convencional.

Assim, a proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, proteína de fusão ou molécula do tipo imunoglobulina podem também ser usadas no ensaio da infecção viral por HIV ou SIV numa amostra biológica através do contacto de uma amostra, derivada de um animal suspeito de ter uma infecção por HIV ou SIV, com a proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, proteína de fusão, ou molécula tipo imunoglobulina e detecção da formação de um complexo com gp120, sózinho ou na superfície de uma célula infectada com HIV.

Por exemplo, uma amostra biológica pode ser tratada com nitrocelulose ou outro suporte sólido que seja capaz de imobilizar células, partículas celulares ou proteína solúvel. O suporte pode então ser lavado com tampões adequados seguido de tratamento com a proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, proteína de

fusão ou molécula tipo imunoglobulina, qualquer uma das quais pode ser marcada de forma detectável. O suporte da fase sólida pode então ser lavado com um tampão uma segunda vez para remover a proteína não ligada e a marca detectada.

Na realização do ensaio do presente invento com uma amostra contendo gp120, o processo caracteriza-se por:

a) contacto de uma amostra suspeita de conter gp120 com um suporte sólido para efectuar a imobilização de gp120 ou célula que expresse gp120 na sua superfície;

b) contacto do referido suporte sólido com a proteína CD4 marcada de forma detectável, glicoproteína ou seu fragmento que se liga a gp120 de HIV, molécula tipo imunoglobulina ou molécula proteína de fusão do invento;

c) incubação da referida molécula marcada de modo detectável com o referido suporte durante um período de tempo suficiente para permitir que a molécula marcada de forma detectável se ligue à gp120 ou célula imobilizada que expressa gp120 na sua superfície;

d) separação do suporte de fase sólida da mistura de incubação obtida no passo c); e

e) detecção da molécula marcada de forma detectável ligada e deste modo detecção e quantificação de gp120.

Como alternativa, o complexo da proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula tipo imunoglobulina ou proteína de fusão marcada de forma detectável - gp120 numa amostra podem ser separados de uma mistura de reacção pondo em contacto o complexo com o anticorpo imobilizado ou proteína que seja específico para uma imunoglobulina ou, e.g., proteína A, proteína G, anticorpos anti-IgM ou anti-IgG. Tais anticorpos anti-imunoglobulina podem ser monoclonais ou policlonais. O suporte sólido pode então ser lavado com tampões adequados para dar um complexo

imobilizado. A marca pode então ser detectada para dar uma medição da quantidade de gp120 e portanto da presença de HIV.

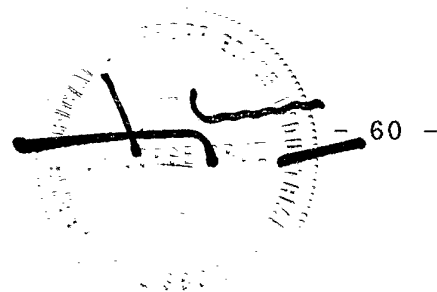
Este aspecto do invento está relacionado com um método para a detecção de infecção viral por HIV ou SIV numa amostra caracterizando-se por:

- a) contacto de uma amostra suspeita de ter gp120 com uma proteína de fusão compreendendo CD4 de primata não humano ou seu fragmento que se liga a gp120 de HIV e a fracção Fc de uma cadeia de imunoglobulina e
- b) detecção da formação do complexo.

O invento também está relacionado com um método para a detecção de gp120 numa amostra, caracterizando-se ainda por:

- c) contacto da mistura obtida no passo (a) com uma molécula de ligação a Fc, como seja um anticorpo, proteína A ou proteína G, a qual é é imobilizada num suporte de fase sólida e é específica para a proteína de fusão, para dar um complexo anticorpo imobilizado - proteína de fusão-gp120
- d) lavagem do suporte de fase sólida obtido no passo c) para remover a proteína de fusão não ligada e
- e) detecção da marca na proteína de fusão.

Certamente as concentrações específicas da molécula tipo imunoglobulina (ou proteína de fusão) marcada de forma detectável e gp120, a temperatura e o tempo de incubação, assim como outras condições do ensaio podem ser variadas, dependendo de vários factores incluindo a concentração de gp120 na amostra, da natureza da amostra e similares. Os familiarizados com a matéria serão capazes de determinar as condições operacionais e óptimas do ensaio para cada determinação empregando experimentação de rotina.



Outros destes passos tais como lavagem, agitação magnética, agitação, filtração e similares podem ser adicionados aos ensaios conforme necessário para a situação particular.

Uma das maneiras em que a proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula tipo imunoglobulina ou proteína de fusão pode ser marcada de modo detectável por ligação da mesma a uma enzima. Esta enzima, por sua vez, quando mais tarde exposta ao seu substrato, catalizará a formação de um produto que pode ser detectado como, por exemplo, por meios espectrofotométricos, fluorimétricos ou visuais. Enzimas que podem ser usadas para marcar de modo detectável a proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula tipo imunoglobulina ou proteína de fusão do presente invento incluem, mas não estão limitados a malato-desidrogenase, nuclease estafilocócica, isomerase delta-V-esteróide, álcool-desidrogenase de levedura, alfa-glicerofosfato-desidrogenase, triose-fosfato-isomerase, peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, asparaginase, glucose-oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-VI-fosfato-desidrogenase, glucoamilase e acetilcolina-estearase.

A proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula tipo imunoglobulina ou proteína de fusão do presente invento pode também ser marcada com um isótopo radioativo que pode ser determinado por meios tais como utilização de um contador de cintilação ou por autorradiografia. Isótopos que são particularmente úteis para fins do presente invento são:  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$  e  $^{75}\text{Se}$ .

É também possível marcar a Proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula tipo imunoglobulina ou proteína de fusão com um composto fluorescente. Quando a molécula tipo imunoglobulina marcada fluorescentemente é exposta a luz do

comprimento de onda adequado, a sua presença pode então ser detectada devido à fluorescência emitida pelo corante. Entre os compostos de marcação por fluorescência mais usados encontram-se o isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldeído e flourescamina.

A proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento ou proteína de fusão do invento pode também ser marcada de modo detectável usando metais que emitem fluorescência tais como <sup>152</sup>Eu ou outros da série dos lantanídeos. Estes metais podem ser ligados à proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula do tipo imunoglobulina ou proteína de fusão, usando grupos de quelatação de metais como seja o ácido dietilenotriaminapentacético (DTPA) ou o ácido etilenodiaminatetracético (EDTA).

A proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula tipo imunoglobulina ou proteína de fusão do presente invento pode também ser marcada de forma detectável através do seu acoplamento a um composto quimioluminescente. A presença da proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula do tipo imunoglobulina ou proteína de fusão quimioluminescente é então determinado pela detecção da presença de luminescência que surge no decurso de uma reacção química. São exemplos de compostos para marcação quimioluminescente particularmente úteis o luminol, isoluminol, éster de acridínio teromático, imidazole, sal de acridínio e éster oxalato.

Do mesmo modo, pode ser usado um composto bioluminescente para marcar a proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula do tipo imunoglobulina ou proteína de fusão do presente invento. A bioluminescência é um tipo de quimioluminescência encontrada em sistemas biológicos em que uma proteína catalítica aumenta a eficácia da reacção quimioluminescente. A presença de

uma proteína bioluminescente é determinada por detecção da presença de luminescência. A luciferina, luciferase e aequorina são compostos importantes para usar em marcação.

A detecção de proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula tipo imunoglobulina ou proteína de fusão pode ser conseguida usando um contador de cintilação, por exemplo, se a marca detectável for um emissor radioactivo gama ou um fluorómetro, por exemplo, se a marca for material fluorescente. No caso de uma marca enzimática a detecção pode ser conseguida por métodos colorimétricos que empregam um substrato da enzima. A detecção pode também ser conseguida por comparação visual do grau de reacção enzimática de um substrato comparativamente com padrões preparados de modo semelhante.

O ensaio do presente invento é idealmente adequado para a preparação de um kit. Tal kit pode compreender um sistema de transporte compartimentado para acomodar um ou mais contentores tais como ampolas tubos e similares, cada um dos referidos contentores compreendendo os elementos separados do imunoensaio. Por exemplo, pode existir um contentor contendo um suporte de fase sólida e ainda outro contentor contendo a proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula do tipo imunoglobulina ou proteína de fusão marcada de forma detectável. O contentor pode ainda conter soluções padrão compreendendo diluições seriadas do material a detectar como seja gp120 ou seus fragmentos. As soluções padrão destes materiais a serem detectados podem ser usados para preparar uma curva padrão com a concentração de gp120 em função do sinal de detecção na ordenada. Os resultados obtidos a partir de uma amostra contendo gp120 podem ser interpolados a partir de tal curva padrão para dar a concentração de gp120.

A proteína CD4, glicoproteína ou seu fragmento, molécula tipo imunoglobulina ou proteína de fusão do presente invento podem também ser usadas como corante de secções de tecido. Por exemplo, uma molécula marcada compreendendo proteína CD4 ou glicoproteína ou seu fragmento de ligação a gp120 de HIV pode ser colocada em contacto com uma secção de tecido, e.g., uma amostra de biópsia do cérebro. Esta secção pode então ser lavada e a marca detectada.

Os exemplos que se seguem são ilustrativos, mas não limitantes do método e composição do presente invento. Outras modificações adequadas e adaptações que são óbvias para os familiarizados com a matéria estão dentro do espírito e âmbito deste invento.

#### EXEMPLOS

##### EXEMPLO 1 ISOLAMENTO DE cDNAs DE CD4 DE CHIMPANZÉ E DE MACACO RHESUS

Clones de cDNA codificador de antígenos CD4 do Chimpanzé (Pan troglodytes) e do Macaco Rhesus (Maccaca mulatta) foram isolados, sequenciados e expressos. cDNAs de CD4 de primata não humano foram sintetizados a partir de RNA poli-A de células mononucleadas do sangue periférico estimuladas com mitogénio obtidas a partir destes animais. Fizeram-se bibliotecas de expressão de cDNA no vector CDM8 e isolaram-se cDNAs de CD4 por quatro ciclos de imuno-selecção como previamente descrito por Seed et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:3365-3369 (1987). Fez-se sequenciação usando o método de terminação de cadeias de didesoxinucleotídeos em moldes de cadeia simples ou dupla. As sequências de DNA e de aminoácidos de CD4 do Chimpanzé e do Macaco Rhesus estão apresentadas abaixo. Também está apresentada uma comparação das respectivas sequências com CD4 humano.



SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE CD4 DE RHESUS E SEQUÊNCIA DE  
AMINOÁCIDOS PREVISTA MOSTRANDO DIFERENÇAS RELATIVAMENTE  
ÀS SEQUÊNCIAS HUMANAS

1 ATGAACCGGGGAATCCCTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTACTCCCA  
-25 MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
Val  
G C

GCAGTCACCCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAGAAAGGGGATACAGTGGAACTGACC 120  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr 15  
Ala  
C T A

\*  
121 TGTACAGCTTCGCAGAAGAAGAACACACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGATAAAG  
16 CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
SerIle  
C G T

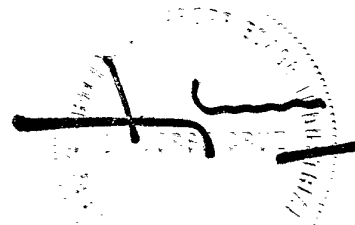
ATTCTGGGAATTCAGGGTCTCTTCTTAACATAAGGTCCATCCAAGCTGAGCGATCGTGCT 240  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla 55  
Asn Ser Asn  
A CTC AT C

241 GACTCAAGAAAAAGCCTTTGGGACCAAGGATGCTTTTCCATGATCATCAAGAATCTTAAG  
56 AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
Arg Asn ProLeu  
G AA CC C

\*  
ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGAACAAGAAGGAGGAGGTGGAATTG 360  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu 95  
AspGln Gln  
G C C

361 CTGGTGTTCGGATTGACTGCCTCACTCTGACCCACCTGCTTGAGGGGCAAGCCTGACC  
96 LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGluGlyGlnSerLeuThr  
Gln  
A C G





CTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTCGTGGTGATGAGAGCCACT 960  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr 295

G

----- \*  
961 CAGTTCCAGGAAAATTTGACCTGTGAAGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGACGCTG  
296 GlnPheGlnGluAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuThrLeu  
Leu Lys Met

C A G T

AGCTTGAAACTGGAGAACAAGGGGGCAACGGTCTCGAAGCAGGCGAAGGCGGTGTGGGTG 1080  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGlyAlaThrValSerLysGlnAlaLysAlaValTrpVal 335  
Glu Lys ArgGlu  
A A G A

\*  
1081 CTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGAAGTCTGGGACAGGTCCTGCTA  
336 LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu

G

GAATCCAACATCAAGGTTGTGCCACATGGCCACCCCGGTGCAGCCAATGGCCCTGATT 1200  
GluSerAsnIleLysValValProThrTrpProThrProValGlnProMetAlaLeuIle 375  
Leu Ser  
C T

1201 GTGCTGGGGGCGGTTGCGGGCCTCCTGCTTTTCACTGGGCTAGGCATCTTCTTGTGTG  
376 ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheThrGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
----- Ile-----

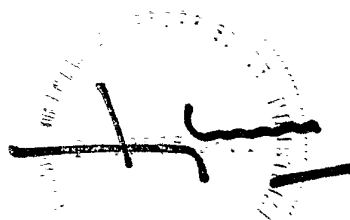
C C T

AGGTGCCGGCATCGAAGGCGTCAAGCAGAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCCTCAGT 1320  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer 415

C C

1321 GAAAAGAAGACCTGCCAGTGCCTCACCGGTTTCAGAAGACATGTAGCCCATTTGA 1377  
416 GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIleEnd 433

G



SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE CD4 DE CHIMPANZÉ E SEQUÊNCIA DE  
AMINOÁCIDOS PREVISTA MOSTRANDO DIFERENÇAS RELATIVAMENTE  
ÀS SEQUÊNCIAS HUMANAS

1 ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCACTCCTCCCA  
-25 MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro

G

1

GCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAGAAAGGGGACACAGTGGAAGTACC 120  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr 15

A T

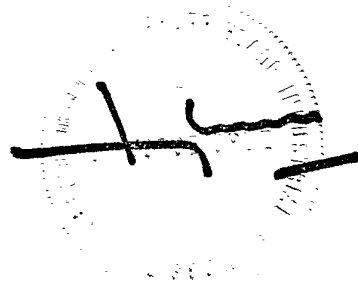
\*\*\*\*\*

121 \* TGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGACAAAG  
16 CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
Ile  
T

ATTCTGGGAATCAGGGCTCCTTCTTAACATAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGTT 240  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal 55  
Ala  
C

\*\*\*\*\*

241 GACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTTACCCTGATCATCAAGAATCTTAAG  
56 AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
Pro  
CC



\*

ATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGGGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTG 360  
 IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu 95  
 Glu  
 A

361 CTAGTGTTCCGGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGCCTGACC 360  
 96 LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr

\*

CTGACCTTGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAAGGGGT 360  
 LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly 135

481 AAAACATACAGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGC 360  
 136 LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly

\*

ACCTGGACATGCACTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAAGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTG 600  
 ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal 175  
 G

601 GTGCTAGCTTTCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGGGACAGGTGGAG 360  
 176 ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu

TTCTCCTTCCCACTCGCCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTGG 720  
 PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp 215

721 CAGGCGGAGAGGGCTTCCTCCTCCAAGTCTTGGATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAA 360  
 216 GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu

GTGTCTGTAAACGGGTTACCCAGGACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTC 840  
 ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu 255

841 CACCTACCCCTGCCCCAGGCCTTGCCTCAGTATGCTGGCTCTGGAAACCTCACCTGGCC 360  
 256 HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla

CTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTCGTGGTGAATGAGAGCCACT 840  
 LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr 295

----- \*

961 CAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGATGCTG  
 296 GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu

----- \*

AGCTTGAAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTG 1080  
 SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal 335

----- \*

1081 CTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGACTCGGGACAGGTCTCTGCTG  
 336 LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu

----- \*

GAATCCAACATCAAGGTTCTGCCACATGGTCCACCCCGGTGCAGCCAATGGCCCTGATT 1200  
 GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle 375

----- \*

1201 GTGCTGGGGGCGCTCGCCGGCCTCTGCTTTTCATTGGGCTAGGCATCTTCTTCTGTGTG  
 376 ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal

----- \*

AGGTGCCGGCACCGAAGGCGCCAAGCACAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCCTCAGT 1320  
 ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer 415  
 Glu  
 G

----- \*

1321 GAGAAGAAGACCTGCCAGTGCCTCACCAGTTTCAGAAGACATGTAGCCCATTGA 1377  
 416 GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIleEnd 433

O antígeno CD4 de chimpanzé é 99% homólogo da sua contraparte, possuindo 5 substituições de aminoácidos no polipeptídeo maduro previsto de 433 aminoácidos, enquanto que CD4 de macaco rhesus é 92% homólogo tendo 34 divergências da sequência de aminoácidos de CD4 humano. A expressão de antígenos foi efectuada transitóriamente em CDM (assim como estávelmente usando o vector retroviral pMNCS).

EXEMPLO 2 CARACTERIZAÇÃO DO DOMÍNIO CD4 HUMANO QUE É NECESSÁRIO PARA A FORMAÇÃO DE SÍNCICIOS MEDIADA POR HIV

Estes antigénios CD4 de primata não humano foram expressos em células humanas que se tornaram assim susceptíveis à infecção por HIV, mas formaram muito menos células gigantes multinucleads, ou sincícios, do que as suas contrapartes expressando o antigénio CD4 humano. Usando mutagénese in vitro este fenótipo foi atribuído a uma diferença num único aminoácido entre as glicoproteínas de chimpanzé e humanas. Esta substituição de aminoácido afecta quantitativamente a capacidade das células HeLa para formar sincícios quando estes antigénios são expressos juntamente com as proteínas externa e transmembranar (EMP e TMP) do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV). Isto foi conseguido através da expressão transitória de seis antigénios CD4 híbridos trans-espécies, que contêm uma das três alterações não conservadora na sequência de aminoácidos extracelularentre as duas espécies sózinhas e em pares, seguido da infecção com Vacina:(env de HIV) vírus recombinante VSC25 de Vacina:(env de HIV). A presença de um resíduo glicina na posição 87, conforme encontrado em CD4 de chimpanzé, em vez do resíduo de ácido glutâmico encontrado em CD4 humano, elimina essencialmente a formação de sincícios multinucleados. Pelo contrário a transferência do resíduo de ácido glutâmico humano na posição 87 para CD4 de chimpanzé confere a capacidade de formação de sincícios na presença de EMP e TMP de HIV. Pelo contrário, a ausência ou presença de uma das duas substituições de aminoácidos que dão origem a sítios únicos de glicosilação no antigénio CD4 de chimpanzé, nos aminoácidos 34 e 68 no primeiro domínio homólogo da região variável de imunoglobulina, tem pouco ou nenhum efeito no grau de formação de sincícios neste ensaio. Esperamos que todos estas glicoproteínas CD4 híbridas apresentem igual afinidade para

EMP de HIV, uma vez que nenhuma destas diferenças de aminoácidos estão no sítio de ligação ao HIV definido anteriormente.

Se a formação de sincícios for um mecanismo importante da doença induzida por HIV este bloqueio da formação de sincícios mediada por HIV pode justificar a resistência do chimpanzé à patologia do síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) apesar da infecção prolongada pelo HIV.

### EXEMPLO 3 PREPARAÇÃO DE CONSTRUÇÕES DE cDNA DE CD4-IG

A fracção extracelular da sequência codificadora de chimpanzé ou de macaco rhesus (codificadora de peptídeos sinal e dos aminoácidos 1-372 das glicoproteínas maduras) foi fundido em três sítios diferentes com um gene da região constante da cadeia pesada de IgG1 humana por meio de uma molécula sintética de adaptador dadora de um sítio de «splicing». Para utilizar o adaptador dador de «splicing», um adaptador BamHI tendo a sequência CGCGGATCCGCG é primeiro inserido no resíduo de aminoácido 395 da sequência precursora de CD4 (resíduo de nucleotídeo 1295). Criou-se uma sequência sintética dadora de «splicing»

GATCCCGAGGGTGAGTACTA

GGCTCCCACTCATGATTCGA

delimitada por extremos complementares HindIII e BamHI e fundiu-se com o sítio HindIII no intrão que precede o domínio CH1, ao sítio EspI no intrão que precede o domínio CH2 da sequência genómica da IgG1. A montagem dos genes quiméricos por ligação no sítio BamHI dá moléculas em que a região variável (V), as regiões V+CH1 ou as regiões V, CH1 e de charneira foram substituídas por CD4. No último caso, espera-se que a molécula forme uma estrutura



monomérica enquanto que no primeiro espera-se que seja formado um dímero.

A imunoprecipitação das proteínas de fusão com um painel de anticorpos monoclonais dirigidos contra epítomos CD4 mostra que todos os epítomos estão preservados. Demonstrou-se uma associação de afinidade específica elevada entre as moléculas quiméricas e as proteínas do invólucro de HIV expressas na superfície de células transfectadas com uma construção proviral atenuada (transcriptase reversa eliminada) ou infectada com um vírus recombinante vacina:env de HIV.

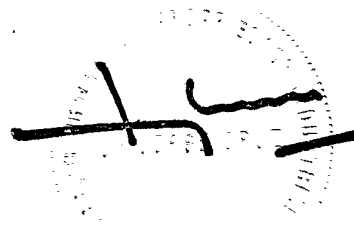
#### EXEMPLO 4 PREPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CÉLULAS COS

Células COS foram cultivadas em meio DME suplementado com 10% de Soro de Vitela e sulfato de gentamicina a 15 µg/ml foram passadas para meio DMEM contendo 10% de NuSerum (Collaborative Research) e gentamicina para dar 50% de confluência no dia antes da transfecção. No dia seguinte, adicionou-se DNA de plasmídeo purificado em CsCl para uma concentração final de 0,1 a 2,0 µg/ml seguido de DEAE Dextran para 400µg/ml e cloroquina para 100 µM. Após 4 horas a 37°C, o meio foi aspirado e adicionada uma solução de dimetilsulfóxido a 10% em tampão de fosfatos salino durante 2 minutos, aspirado e substituído por DME/10%de Soro de Vitela. 8 a 24 horas mais tarde, as células foram tripsinizadas e passadas a 1:2.

Para a marcação radioactiva, o meio foi aspirado 40 a 48 horas após transfecção, as células foram lavadas uma vez com tampão de fosfatos salino e adicionado meio DME sem cisteína ou metionina. 30 minutos mais tarde, adicionou-se cisteína e

metionina marcadas com com  $^{35}\text{S}$  para concentrações finais de 30-60  $\mu\text{Ci}$  e 100-200  $\mu\text{Ci}$  respectivamente e as células foram deixadas a incorporar a marca durante 8 a 24 horas mais. Os sobrenadantes foram recuperados e examinados por electroforese em géis de 7,5% de poliacrilamida após desnaturação e redução ou num gel de 5% de poliacrilamida após desnaturação sem redução. As proteínas de fusão IgG-CD4 formam estruturas diméricas. As proteínas de fusão CD4-IgM formam multímeros grandes para lá da resolução do gel sem redução e monómeros do tamanho esperado com redução.

Prepararam-se proteínas não marcadas deixando as células crescer durante 5 a 10 dias após transfecção em meio DME contendo 5% de NuSerum e gentamicina como atrás. Os sobrenadantes foram colhidos, centrifugados e purificados por adsorção em bloco a proteína A trisacrilo, proteína A agarose, anticorpo de acbra anti-IgG humana agarose, anticorpo de coelho anti-IgM humana agarose ou anticorpo monoclonal anti-CD4 agarose. Os conjugados de anticorpo agarose foram preparados acoplando anticorpos purificados a agarose activada com brometo de cianogénio de acordo com as recomendações do fabricante e usando uma concentração de anticorpo de 1 mg/ml. Após adsorção em bloco por agitação durante a noite num plataforma rotatória, as esferas foram colhidas por decantação para um funil de vidro com filtro e lavadas algumas vezes no funil com tampão de fosfatos salino contendo 1 % do detergente Nonidet P40. As esferas foram removidas do funil e vertidas para uma pequena coluna de plástico não reutilizável (coluna Quick-Sep QS-Q, Isolab), lavadas com pelo menos vinte volumes de coluna de tampão de fosfatos salino contendo 1% de Nonidet P40, com 5 volumes de 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0) e eluidas pela adição de ácido acético 0,1 M contendo 0,1 M NaCl ou tampão glicina-HCl 0,25 M, pH 2,5.



EXEMPLO 5 BLOQUEIO DA FORMAÇÃO DE SÍNCICIOS PELAS PROTEÍNAS DE FUSÃO

Proteínas de fusão purificadas ou parcialmente purificadas foram adicionadas a células HPB-ALL infectadas 12 horas antes com um vírus da vacina recombinante codificador da proteína do invólucro de HIV. Após incubação durante mais 6-8 horas, as células foram lavadas com tampão de fosfatos salino, fixadas com formaldeído e fotografadas. Todas as proteínas de fusão CD4 de tamanho completo - imunoglobulina apresentarão inibição da formação de síncícios.

Tendo agora descrito detalhadamente este invento, será apreciado pelos familiarizados com a matéria que o mesmo pode ser realizado com uma larga gama de parâmetros equivalentes no que respeita a composição, condições e métodos de preparação de tais moléculas recombinantes, vectores, hospedeiros transformados e proteínas sem se afastar do espírito ou âmbito do invento ou de qualquer sua realização.

REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Processo para a produção de CD4 de primata não humano ou seu fragmento que se liga a gp120 de HIV ou de SIV, caracterizado por compreender:

a cultura, num meio nutritivo adequado em condições de produção de proteína, de uma estirpe hospedeira transformada com um vector compreendendo a molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda o referido vector sinais de expressão que são reconhecidos pela referida estirpe hospedeira e dirigem a expressão do referido CD4 de primata não humano e

a recuperação do CD4 de primata não humano assim produzido.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido primata não humano ser o macaco rhesus, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla  
AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGluGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValLysCysArgSerProGlyGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyArgThrIleSerValProGlnLeuGluArgGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValSerGlnAspGlnLysThrValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerThrValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrLeuGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnPheGlnGluAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuThrLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGlyAlaThrValSerLysGlnAlaLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValValProThrTrpProThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheThrGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle.

Handwritten signature and a circular stamp.

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido primata não humano ser o chimpanzé, e por o o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle;

ou o seu fragmento glicosilado.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-θ-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-§-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAla-ζ-ArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle,

em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala,
- \$- é Thr ou Pro, e
- %- é Gln ou Glu;

ou o seu derivado glicosilado.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu

em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala, e
- \$- é Thr ou Pro; ou

ou o seu derivado glicosilado.



6a. - Processo para a produção de uma proteína de fusão que compreende CD4 de primata não humano, ou um seu fragmento que se ligue a gp120 de HIV ou SIV, e uma cadeia pesada de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia de imunoglobulina foi substituída com CD4 de primata não humano, ou um seu fragmento que se ligue a gp120 de HIV ou de SIV, caracteriza por compreender:

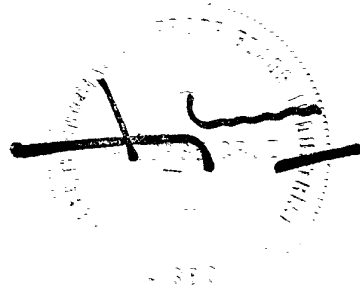
a cultura, num meio nutritivo adequado em condições de produção de proteína, de uma estirpe hospedeira transformada com um vector compreendendo a sequência que especifica CD4 de primata não humano, ou um seu fragmento que se ligue a gp120 de HIV, ligada a uma molécula de ácido nucleico que especifica uma cadeia pesada de imunoglobulina, em que a referida sequência de ácido nucleico que especifica a região variável da referida cadeia pesada de imunoglobulina foi substituída pela referida molécula de ácido nucleico que especifica o referido CD4 de primata não humano ou seu fragmento, compreendendo ainda o referido vector sinais de expressão que são reconhecidos pela referida estirpe hospedeira e dirigem a expressão da referida proteína de fusão, e

a recuperação da proteína de fusão assim produzida.

7a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido hospedeiro transformado ser uma linha celular de mieloma que produz cadeias leves de imunoglobulina e por a referida proteína de fusão compreender uma molécula de imunoglobulina de cadeia pesada da classe IgM, IgG1 ou IgG3, em que é produzida a referida molécula do tipo imunoglobulina que compreende a referida proteína de fusão.

8a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido primata não humano ser o macaco rhesus, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla  
AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGluGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValLysCysArgSerProGlyGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyArgThrIleSerValProGlnLeuGluArgGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValSerGlnAspGlnLysThrValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerThrValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrLeuGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnPheGlnGluAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuThrLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGlyAlaThrValSerLysGlnAlaLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValValProThrTrpProThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheThrGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle.



9a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido primata não humano ser o chimpanzé, e por o o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle;

ou o seu fragmento glicosilado.

10a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-θ-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAla-ζ-ArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle,

em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala,
- \$- é Thr ou Pro, e
- %- é Gln ou Glu;

ou o seu derivado glicosilado.

11a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu

em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala, e
- \$- é Thr ou Pro; ou

ou o seu derivado glicosilado.

12a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a proteína de fusão ser marcada de modo detectável.

13a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a referida proteína de fusão estar ligada a um polipeptídeo citotóxico, marca radioactiva ou agente de formação de imagens por NMR.

14a. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o referido polipeptídeo citotóxico ser ricina ou toxina da difteria.

15a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a referida proteína de fusão incluir uma cadeia leve de imunoglobulina.

16a. - Processo para a produção de uma proteína de fusão que compreende CD4 de primata não humano, ou um seu fragmento que se ligue a gp120 de HIV ou SIV, e uma cadeia leve de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia de imunoglobulina foi substituída com CD4 de primata não humano, ou um seu fragmento que se ligue a gp120 de HIV ou de SIV, caracterizado por compreender:

a cultura, num meio nutritivo adequado em condições de produção de proteína, de uma estirpe hospedeira transformada com um vector compreendendo uma molécula de ácido nucleico que compreende a sequência de ácido nucleico que especifica CD4 de primata não humano, ou um seu fragmento que se ligue a gp120 de HIV, ligada a uma sequência de

ácido nucleico que especifica uma cadeia leve de imunoglobulina, em que a referida sequência de ácido nucleico que especifica a região variável da referida cadeia leve de imunoglobulina foi substituída pela referida molécula de ácido nucleico que especifica o referido fragmento, compreendendo ainda o referido vector sinais de expressão que são reconhecidos pela referida estirpe hospedeira e dirigem a expressão da referida proteína de fusão, e

a recuperação da proteína de fusão assim produzida.

17<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o referido hospedeiro produzir cadeias pesadas de imunoglobulina das classes IgM, IgG1 e IgG3 juntamente com a referida proteína de fusão para dar uma molécula do tipo imunoglobulina que se ligue a gp120 de HIV ou de SIV.

18a. - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o referido primata não humano ser o macaco rhesus, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla  
AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGluGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValLysCysArgSerProGlyGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyArgThrIleSerValProGlnLeuGluArgGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValSerGlnAspGlnLysThrValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerThrValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrLeuGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnPheGlnGluAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuThrLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGlyAlaThrValSerLysGlnAlaLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValValProThrTrpProThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheThrGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle.



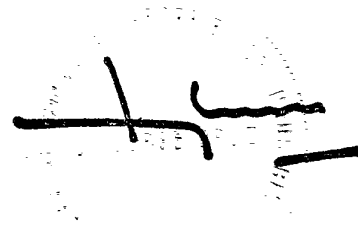
19a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido primata não humano ser o chimpanzé, e por o o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle;

ou o seu fragmento glicosilado.

20a. - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-θ-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAla-ζ-ArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle,



em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala,
- \$- é Thr ou Pro, e
- %- é Gln ou Glu;

ou o seu derivado glicosilado.

21<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu

em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala, e
- \$- é Thr ou Pro; ou

ou o seu derivado glicosilado.

22a. - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por a proteína de fusão ser marcada de modo detectável.

23a. - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por a referida proteína de fusão estar ligada a um polipeptídeo citotóxico, marca radioactiva ou agente de formação de imagens por NMR.

24a. - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por o referido polipeptídeo citotóxico ser ricina ou toxina da difteria.

25a. - Processo para purificar substancialmente CD4 de primata não humano, caracterizado por compreender o isolamento do referido CD4 por meio de extracção, precipitação, cromatografia, cromatografia de afinidade, ou electroforese.

26a. - Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por o referido primata não humano ser o macaco rhesus, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla  
AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGluGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValLysCysArgSerProGlyGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyArgThrIleSerValProGlnLeuGluArgGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValSerGlnAspGlnLysThrValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerThrValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrLeuGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnPheGlnGluAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuThrLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGlyAlaThrValSerLysGlnAlaLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValValProThrTrpProThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheThrGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle.

27a. - Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por o referido primata não humano ser o chimpanzé, e por o o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle;

ou um seu fragmento glicosilado.

28a. - Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-ε-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-§-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAla-ζ-ArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle,

em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala,
- \$- é Thr ou Pro, e
- %- é Gln ou Glu;

ou o seu derivado glicosilado.

29a. - Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu

em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala, e
- \$- é Thr ou Pro; ou

ou o seu derivado glicosilado.



308. - Método para o tratamento de infecções por HIV ou SIV, de preferência em seres humanos, caracterizado por compreender a administração de uma composição farmacêutica que compreende 0,001 mg/kg até 50 mg/kg de CD4 de primata não humano, de preferência macaco rhesus ou chimpanzé, ou de um seu fragmento que se ligue a gp120 de HIV ou SIV, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

312. - Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o referido fragmento de CD4 de primata não humano ser solúvel em solução aquosa.

328. - Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o referido primata não humano ser o macaco rhesus, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla  
AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGluGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValLysCysArgSerProGlyGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyArgThrIleSerValProGlnLeuGluArgGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValSerGlnAspGlnLysThrValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerThrValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrLeuGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnPheGlnGluAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuThrLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGlyAlaThrValSerLysGlnAlaLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValValProThrTrpProThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheThrGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle.

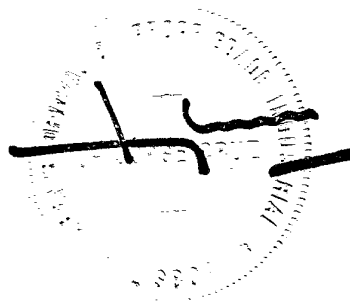
338. - Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o referido primata não humano ser o chimpanzé, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle;

ou um seu fragmento glicosilado.

342. - Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAla-@-ArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle,



em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala,
- \$- é Thr ou Pro, e
- %- é Gln ou Glu;

ou o seu derivado glicosilado.

352. - Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o referido primata não humano ser o macaco rhesus, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla  
AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu.

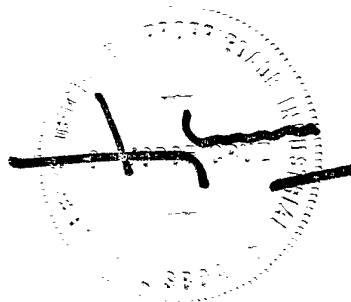
368. - Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o referido primata não humano ser o chimpanzé, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu;

ou o seu derivado glicosilado.

378. - Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln- $\epsilon$ -Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgAla  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe- $\delta$ -LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu



em que

-@- é Thr ou Ile,

-#- é Val ou Ala, e

-\$- é Thr ou Pro; ou

ou o seu derivado glicosilado;

com a condição de que pelo menos um de -@- e -\$- é Thr.

382. - Método para o tratamento de infecções por HIV ou SIV, caracterizado por compreender a administração de uma composição farmacêutica que compreende 0,001 mg/kg até 50 mg/kg de uma proteína de fusão que compreende CD4 de primata não humano, ou de um seu fragmento que se ligue a gp120, e uma cadeia pesada de imunoglobulina ou uma cadeia leve imunológica, em que a referida região variável da cadeia de imunoglobulina foi substituída com CD4 de primata não humano, ou com seu fragmento que se ligue a gp120 de HIV ou SIV, fragmento esse de CD4 de primata que é capaz de se ligar a gp120 de HIV e SIV.



398. - Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por o referido primata não humano ser o macaco rhesus, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyIleProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaValThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysAsnThrGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnIleLys  
IleLeuGlyIleGlnGlyLeuPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuSerAspArgAla  
AspSerArgLysSerLeuTrpAspGlnGlyCysPheSerMetIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAsnLysLysGluGluValGluLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGluGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValLysCysArgSerProGlyGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyArgThrIleSerValProGlnLeuGluArgGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValSerGlnAspGlnLysThrValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerThrValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrLeuGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnPheGlnGluAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuThrLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGlyAlaThrValSerLysGlnAlaLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValValProThrTrpProThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheThrGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGluArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle.

402. - Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por o referido primata não humano ser o chimpanzé, e por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGlnThrLys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArgVal  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheThrLeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAlaGlnArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle;

ou um seu fragmento glicosilado.





418. - Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-θ-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGlnGlyGlnSerLeuThr  
LeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCysArgSerProArgGly  
LysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGluLeuGlnAspSerGly  
ThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPheLysIleAspIleVal  
ValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGluGlyGluGlnValGlu  
PheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySerGlyGluLeuTrpTrp  
GlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAspLeuLysAsnLysGlu  
ValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGlyLysLysLeuProLeu  
HisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGlyAsnLeuThrLeuAla  
LeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuValValMetArgAlaThr  
GlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSerProLysLeuMetLeu  
SerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGluLysAlaValTrpVal  
LeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSerGlyGlnValLeuLeu  
GluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValGlnProMetAlaLeuIle  
ValLeuGlyGlyValAlaGlyLeuLeuLeuPheIleGlyLeuGlyIlePhePheCysVal  
ArgCysArgHisArgArgArgGlnAla-ζ-ArgMetSerGlnIleLysArgLeuLeuSer  
GluLysLysThrCysGlnCysProHisArgPheGlnLysThrCysSerProIle,

em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala,
- \$- é Thr ou Pro, e
- %- é Gln ou Glu;

ou o seu derivado glicosilado.

422. - Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por o referido CD4 ou seu fragmento compreender a seguinte sequência de aminoácidos:

MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGlnLeuAlaLeuLeuPro  
AlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAspThrValGluLeuThr  
CysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsnSerAsnGln-@-Lys  
IleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLysLeuAsnAspArg-#-  
AspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPhe-\$-LeuIleIleLysAsnLeuLys  
IleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGlyAspGlnLysGluGluValGlnLeu  
LeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeu

em que

- @- é Thr ou Ile,
- #- é Val ou Ala, e
- \$- é Thr ou Pro; ou

ou o seu derivado glicosilado.

43a. - Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por a proteína de fusão ser marcada de modo detectável.

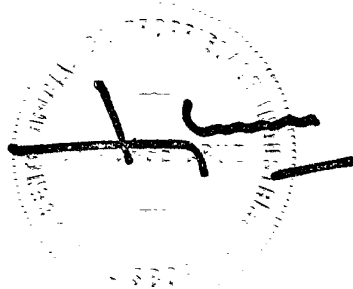
44a. - Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por a referida proteína de fusão estar ligada a um polipeptídeo citotóxico, marca radioactiva ou agente de formação de imagens por NMR.

45a. - Método de acordo com reivindicação 38, caracterizado por o referido polipeptídeo citotóxico ser ricina ou toxina da difteria.

46a. - Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por a proteína de fusão incluir uma cadeia leve de imunoglobulina e uma cadeia pesada de imunoglobulina.

47a. - Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por a proteína de fusão compreender cadeia pesada de imunoglobulina da classe IgM, IgG1 ou IgG3.

48a. - Processo para a produção de um complexo, caracterizado por compreender o contacto de uma proteína, glicoproteína ou fragmento de CD4 de primata não humano, ou uma sua composição farmacêutica, com gp120, produzindo deste modo o referido complexo.



49a. - Processo de acordo com a reivindicação 48, caracterizado por compreender a ligação dos referidos proteína, glicoproteína ou fragmento de CD4, ou uma sua composição farmacêutica, a um polipeptídeo citotóxico, marca radioactiva ou agente de formação de imagens por NMR, que se ligue a células infectadas com gp120 de HIV ou SIV, produzindo deste modo o referido complexo.

50a. - Processo de acordo com a reivindicação 49, caracterizado por o referido polipeptídeo citotóxico ser ricina ou toxina da difteria.

51a. - Processo para a detecção de gp120 de HIV ou de SIV numa amostra, caracterizado por compreender:

(a) o contacto de uma amostra suspeita de conter gp120 de HIV ou de SIV com a proteína de fusão que compreende CD4 de primata não humano, ou de um seu fragmento que se ligue a gp120, e uma cadeia pesada de imunoglobulina ou uma cadeia leve imunológica, em que a referida região variável da cadeia de imunoglobulina foi substituída com CD4 de primata não humano, ou om seu fragmento que se ligue a gp120 de HIV ou SIV, fragmento esse de CD4 de primata que é capaz de se ligar a gp120 de HIV e SIV; e

(b) detecção da formação do complexo.

52a. - Processo de acordo com a reivindicação 51, caracterizado por a proteína de fusão ser marcada de modo detectável.

53a. - Processo para a detecção de gp120 de HIV ou de SIV numa amostra, caracterizado por compreender:

(a) o contacto de uma amostra suspeita de conter gp120 de HIV ou de SIV com CD4 de primata não humano, ou um seu fragmento, que é capaz de se ligar a gp129 de HIV ou SIV, e

(b) a detecção da formação do complexo.

54a. - Processo de acordo com a reivindicação 53, caracterizado por o referido CD4 de primata não humano ou seu fragmento ser marcada de modo detectável.

Lisboa, 22 de Agosto de 1990

  
**J. PEREIRA DA CRUZ**

Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º  
1200 LISBOA