



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(11) Número de Publicação: **PT 1278534 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 38/00** (2006.01) **A61K 38/04** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01) **A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 39/21** (2006.01) **C07K 16/00** (2006.01)  
**C07K 17/00** (2006.01) **C07K 7/00** (2006.01)  
**C07K 14/16** (2006.01) **C07K 16/10** (2006.01)

(22) Data de pedido: **2001.04.20**

(30) Prioridade(s): **2000.04.28 US 0561366**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.01.29**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.01.03**  
**002/2007**

(73) Titular(es):

**THYMON L.L.C.**  
**30 DORISON DRIVE SHORT HILLS, NJ 07078 US**

(72) Inventor(es):

**GIDEON GOLDSTEIN** **US**

(74) Mandatário:

**PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA**  
**RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PREJUDICAR A MULTIPLICAÇÃO DO HIV-1**

(57) Resumo:

## RESUMO

### **"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PREJUDICAR A MULTIPLICAÇÃO DO HIV-1"**

Uma composição que promove anticorpos contra a maioria (e. g., mais de 95%) das variantes conhecidas da proteína Tat do HIV-1 tanto do grupo B como do não-B, contém, pelo menos, duas variantes de um péptido ou polipéptido da fórmula: R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID NO: 8]. De acordo com esta fórmula, Y<sub>7</sub> é Arg, Lys, Ser ou Asn; X<sub>9</sub> é Glu ou Asp; Z<sub>12</sub> é Lys ou Asn; R1 é hidrogénio, um alquilo inferior, um alcanóilo inferior ou uma sequência com entre 1, a cerca de, 5 aminoácidos, opcionalmente, substituída com um alquilo inferior ou alcanóilo inferior; e R2 é um hidroxilo livre, uma amida ou uma sequência com um ou até cerca de 5 aminoácidos adicionais, opcionalmente, substituída com uma amida. Nesta composição, pelo menos, uma das duas variantes contém Arg em Y<sub>7</sub> e Lys em Z<sub>12</sub> e em, pelo menos, uma segunda das duas variantes, em que Y<sub>7</sub> é Asn e Z<sub>12</sub> é Asn. As composições de vacina e farmacêuticas podem conter um ou mais desses péptidos associados com proteínas veículo, associados em péptidos antigénicos múltiplos ou como parte de proteínas recombinantes. A adição de outros imunogénios opcionais a esta combinação, pode proporcionar outras composições úteis na obtenção de anticorpos de primata anti-Tat, que inter-reagem com várias estirpes e variantes da proteína Tat do HIV-1. As composições de vacina e farmacêuticas podem conter os anticorpos de primata induzidos pelas composições peptídicas para utilização em terapia passiva. São descritas composições e utilizações de diagnóstico, para avaliar o estado imunitário de doentes vacinados.

## DESCRIÇÃO

### "MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PREJUDICAR A MULTIPLICAÇÃO DO HIV-1"

#### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se, de um modo geral, a composições e métodos úteis para inibir a multiplicação do vírus-1 da imunodeficiência humana (HIV-1) em doentes infectados, sintomáticos ou assintomáticos e para atenuar a multiplicação do HIV-1 após infecção primária em indivíduos anteriormente não infectados, minimizando, deste modo, a progressão da SIDA.

#### Antecedentes da Invenção

Várias abordagens ao tratamento do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) concentraram-se no gene (*tat*) transactivante do HIV-1, que produz uma proteína (Tat) essencial para a transcrição do vírus. O gene *tat* e a sua proteína foram sequenciados e estudados para utilização em tratamentos propostos do HIV [ver, e. g., Patentes US N°. 5158877; 5238882; e 5110802; Pedidos Internacionais de Patente N°. WO92/07871, WO91/10453, WO91/09958 e WO87/02989, publicados, respectivamente, em 14 de Maio de 1992, 25 de Julho de 1991, 11 de Julho de 1991 e 21 de Maio de 1987]. A proteína Tat é libertada extracelularmente, tornando-a disponível para ser incorporada por outras células infectadas, para intensificar a

transcrição do HIV-1 nas células e por células não-infectadas, para alterar as activações de genes da célula hospedeira. A Tat torna as células susceptíveis à infecção pelo vírus. A incorporação da Tat pelas células é muito forte e foi descrita como mediada por uma sequência básica curta da proteína [S. Fawell *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **91**: 664-668 (1994)].

A imunização com a proteína Tat do HIV-1 como uma potencial vacina contra a SIDA está sob investigação activa. A sequência HXB/LAV da Tat do HIV-1 foi utilizada como imunogénio em estudos descritos, sob a forma de uma proteína recombinante [A. Cafaro *et al.*, *Nat. Med.*, **5**: 643-650 (1999)], de uma vacina de ADN [S. Calarota *et al.*, *Lancet*, **351**: 1320-5 (1998)], de uma proteína inactivada (toxóide Tat) [S. S. Cohen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** (19): 10842-10847 (1999); A. Gringeri *et al.*, *J. Hum. Virol.*, **1**: 293-8 (1998)] ou uma vacina de ADN expressando Tat inactiva [E. Caselli *et al.*, *J. Immunol.*, **162**:5631-5638 (1999)]. As imunizações com a sequência Tat completa induziram imunidade, tanto celular como humoral. Ver, também, M. C. Rhe *et al.*, *J. Acquir. ImmuneDefic. Syndr. Hum. Virol.* **10**: 408-416 (1995); C. J. Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8116-8120 (1997); e outros].

O Pedido de Patente Internacional N°. WO92/14755, publicado a 3 de Setembro de 1992, refere-se à proteína Tat e ao receptor da integrina da superfície celular capaz de se ligar à proteína Tat. Estão identificadas duas sequências da Tat que se ligam à integrina: -Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg- [SEQ ID N°: 1], assim como -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro- [SEQ ID N°: 2]. Estas sequências são a região ou o domínio básico que constitui o local de ligação dominante para a integrina. Esta descrição demonstra que vários péptidos correspondentes a estas sequências

da Tat e as integrinas correspondentes bloqueiam, *in vitro*, a ligação de células a placas revestidas com Tat, como fazem os anticorpos às integrinas adequadas. No entanto, a descrição mostra, também, que estes reagentes não bloqueiam a incorporação de Tat funcional pelas células (ver o Exemplo 9, no documento W092/14755), anulando, deste modo, o mecanismo de acção proposto para utilização terapêutica na infecção com HIV. As sequências da Tat descritas neste pedido internacional são distintas dos imunogénios peptídicos da presente invenção.

Foram já produzidos anticorpos em animais contra a proteína Tat, tanto monoclonais, como policlonais, que demonstram bloquear a incorporação da proteína Tat *in vitro* [ver, e. g., D. Brake *et al.*, *J. Virol.*, **64**: 962 (1990); D. Mann *et al.*, *EMBO J.*, **10**: 1733 (1991); J. Abraham *et al.*, citado acima; P. Auron *et al.*, citado acima; M. Jaye *et al.*, citado acima; G. Zauli *et al.*, citado acima]. As descrições mais recentes mostraram, que a adição de anticorpos monoclonais ou policlonais, contra a proteína Tat, a meio de cultura de tecidos, atenuou a infecção com HIV-1 *in vitro* [L. Steinaa *et al.*, *Arch. Virol.*, **139**: 263 (1994); M. Re *et al.*, citado acima; e G. Zauli *et al.*, *J. Acq. Imm. Def. Syndr. Hum. Retrovirol.*, **10**: 306 (1995)].

As próprias publicações do requerente [G. Goldstein, *Nature Med.*, **2**: 960 (1996); e Pedido de Patente Internacional N°. W095/31999, publicado a 30 de Novembro de 1995] reviu indícios sugerindo que a secreção da proteína Tat do HIV-1, a partir de células infectadas e a incorporação por células, tanto infectadas como não infectadas, era importante para o infectividade do HIV-1. Estudos anteriores demonstraram, também, que os anticorpos contra a proteína Tat bloqueavam a incorporação da Tat *in vitro* e inibiam a infectividade *in vitro*.

Foi sugerida a imunização activa de mamíferos, para induzir anticorpos contra a proteína Tat do HIV-1, como uma potencial vacina contra a SIDA. Ver, também, G. Goldstein *et al.*, "Minimization of chronic plasma viremia in rhesus macaques immunized with synthetic HIV-1 Tat peptides and infected with a chimeric simian/human immunodeficiency virus (SHIV<sub>33</sub>)", *Vaccine*, **18**:2789 (2000).

Outras publicações do requerente, o Pedido de Patente Internacional N°. WO99/02185, publicado a 21 de Janeiro de 1999 e a Patente U.S. N°. 5891994, concedida a 6 de Abril de 1999, divulgaram um novo conceito no tratamento e prevenção da infecção com HIV-1, que utilizava sequências da Tat que eram reconhecidas como epitopos pelo sistema imunitário do coelho. Ao contrário das divulgações anteriores discutidas acima, estas publicações referem-se a combinações terapêuticas e imunogénicas que requerem, pelo menos, dois e, de um modo preferido, a totalidade dos quatro péptidos ou polipéptidos da Tat, compreendendo as sequências do "Epitopo I" que se estendem dos resíduos de aminoácido 4 (ou 5) a 10 da Tat, como se segue: -Asp-Pro-X<sub>1</sub>-Leu-Glu-Pro- [SEQ ID N°: 3] ou R<sup>1</sup>-Val-Asp-Pro-X<sub>7</sub>-Leu-Glu-Pro-R<sup>2</sup> [SEQ ID N°: 4], em que X<sub>7</sub> é Arg, Lys, Ser ou Asn. Essas composições induzem anticorpos que reagem com a maioria das proteínas Tat do HIV-1 e impedem a multiplicação do HIV-1. De acordo com esta publicação, podem ser adicionadas algumas outras sequências da Tat a esta composição, as quais compreendem um péptido ou polipéptido do "Epitopo II", que se estende pelos resíduos de aminoácido 41-50 da Tat, da fórmula R<sup>3</sup>-Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R<sup>4</sup> [SEQ ID N°: 5], em que X<sub>42</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Gly ou Ala. Alternativamente, pode ser adicionado a esta composição um péptido ou polipéptido do "Epitopo III", que se estende pelos

resíduos de aminoácido 56-62 da Tat, da fórmula R5-Arg-Arg-X<sub>58</sub>-Z<sub>59</sub>-A<sub>60</sub>-Y<sub>61</sub>-Ser-R6 [SEQ ID N°: 6], em que X<sub>58</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Ala, Pro, Ser e Gln; em que Y<sub>61</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Asp, Asn, Gly e Ser; em que Z<sub>59</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Pro e His; em que A<sub>60</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Gln e Pro. Ainda alternativamente, pode ser adicionado a esta composição um péptido ou polipéptido do "Epitopo IV", que se estende pelos resíduos de AA 62-73 da Tat da fórmula R7-Ser-Gln-X<sub>64</sub>-His-Gln-Y<sub>67</sub>-Ser-Leu-Ser-Lys-Gln-Pro-R8 [SEQ ID N°: 7], em que X<sub>64</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Asn e Thr; em que Y<sub>67</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Ala e Val. A própria composição pode ser utilizada para induzir anticorpos contra um grande número de sequências da Tat, características de várias variantes do HIV-1. As composições ou os anticorpos produzidos são utilizados como vacina ou tratamentos profilácticos contra estas várias variantes.

Apesar do conhecimento crescente sobre a progressão da doença do HIV-1, persiste uma necessidade na técnica de desenvolvimento de composições e métodos para o tratamento do HIV-1, tanto profilaticamente como terapêuticamente, que sejam úteis para baixar os níveis virais do HIV-1, para o tratamento e possível prevenção da subsequente doença da SIDA, geralmente fatal.

#### Sumário da Invenção

Num aspecto, a presente invenção proporciona uma composição compreendendo, pelo menos, duas variantes de um péptido ou polipéptido do Epitopo I da fórmula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-

Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID N°: 8], em que Y<sub>7</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Arg, Lys, Ser e Asn; em que X<sub>9</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Glu e Asp; em que Z<sub>12</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Lys e Asn; em que R1 é seleccionado do grupo consistindo em hidrogénio, alquilo inferior, alcanóilo inferior e uma sequência com entre 1, a cerca de, 5 aminoácidos, opcionalmente, substituída com um alquilo inferior ou alcanóilo inferior; em que R2 é seleccionado do grupo consistindo num hidroxilo livre, uma amida e numa sequência com um ou até, cerca de, 5 aminoácidos adicionais, opcionalmente, substituída com uma amida. Nesta composição, pelo menos, uma das duas variantes deve ter a fórmula em que Y<sub>7</sub> é Arg e Z<sub>12</sub> é Lys e, pelo menos, uma segunda das duas variantes deve ter a fórmula em que Y<sub>7</sub> é Asn e Z<sub>12</sub> é Asn. Cada péptido desta composição é reconhecido como um Epitopo I da Tat do HIV-1 pelo sistema imunitário de um primata. Esta fórmula permite a construção e a utilização de várias combinações peptídicas.

Num outro aspecto, a composição acima descrita contém ainda um ou mais péptidos ou polipéptidos adicionais, os quais representam outras sequências de aminoácidos que correspondem ao resíduos de aminoácidos 5 ao resíduo de aminoácido 12 da Tat do HIV-1. Estas sequências de aminoácidos opcionais são descritas detalhadamente abaixo. Estas sequências são, de um modo preferido, provenientes de uma estirpe de HIV-1 com uma variante da proteína Tat nessa localização.

Num outro aspecto, esta invenção proporciona uma composição descrita acima, que contém péptidos ou polipéptidos que compreendem, pelo menos, os dois péptidos do Epitopo I requeridos, reconhecidos por primatas (e, de um modo preferido, péptidos do Epitopo I adicionais), em combinação com um ou mais



Epitopos II, III e/ou IV da Tat do HIV-1. Os epitopos II, III e IV são as fórmulas peptídicas da Tat do HIV-1, descritas na Publicação Internacional de Patente N°. WO99/02185. Essas composições podem combinar péptidos da Tat do HIV-1 adequados, de forma a proporcionar uma composição que induz anticorpos reactivos com mais de, cerca de, 95% da totalidade das proteínas Tat do HIV-1 conhecidas.

Ainda num aspecto adicional a invenção proporciona uma composição de anticorpo compreendendo anticorpos, de um modo preferido, produzidos num primata, os quais se ligam, especificamente, a um péptido ou polipéptido da fórmula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-trp-Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID N°: 8], em que Y<sub>7</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Arg, Lys, Ser e Asn; em que X<sub>9</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Glu e Asp; em que Z<sub>12</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Lys e Asn; em que R1 é seleccionado do grupo consistindo em hidrogénio, num alquilo inferior, num alcanóilo inferior e numa sequência com entre 1 a, cerca de, 5 aminoácidos, opcionalmente, substituída com um alquilo inferior ou alcanóilo inferior; em que R2 é seleccionado do grupo consistindo em hidroxilo livre, uma amida e uma sequência com um ou até cerca de 5 aminoácidos adicionais, opcionalmente, substituída com uma amida. Esta composição de anticorpo, compreende um anticorpo que se liga à variante do Epitopo I em que Y<sub>7</sub> é Arg e Z<sub>12</sub> é Lys e, pelo menos, um segundo anticorpo que se liga a uma segunda variante do Epitopo I, em que Y<sub>7</sub> é Asn e Z<sub>12</sub> é Asn. Podem ser, também, incluídos outros anticorpos dirigidos contra outras variantes, para além das duas variantes especificadas nesta composição. Estes anticorpos na composição ligam-se às sequências do Epitopo I reconhecidas pelo sistema imunitário do primata, em que o epitopo está presente sob a forma de várias variantes das proteínas Tat do HIV-1.

Estes anticorpos incluem várias construções de anticorpo, tais como anticorpos monoclonais, como descrito detalhadamente abaixo.

Ainda num aspecto adicional a invenção proporciona um gene sintético que codifica, sequencialmente, um péptido ou um polipéptido, que contém, pelo menos, duas variantes de um péptido ou polipéptido do Epitopo I da fórmula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID N°: 8], como definida acima. Neste gene sintético, pelo menos, uma das duas variantes deve ter a fórmula em que Y<sub>7</sub> é Arg e Z<sub>12</sub> é Lys e, pelo menos, uma segunda das duas variantes deve ter a fórmula na qual Y<sub>7</sub> é Asn e Z<sub>12</sub> é Asn. Opcionalmente, este gene sintético compreende um péptido do Epitopo II do terminal carboxilo, como reconhecido pelo sistema imunitário dos primatas. Alternativamente, o gene recombinante ou sintético contém as sete ou oito sequências de aminoácidos preferidas do Epitopo I, reconhecidas por primatas, identificadas abaixo. O gene sintético pode conter cada sequência de aminoácidos separada por uma sequência espaçadora ou pode expressar cada péptido/polipéptido numa grelha de leitura aberta com uma proteína veículo. O gene sintético pode ser separado da proteína veículo, através de um espaçador, se o espaçador se encontrar fundido com uma sequência do Epitopo I reconhecido por primatas, deixando uma sequência do Epitopo II no terminal carboxilo da proteína recombinante. As formas de realização adicionais incluem vários péptidos do Epitopo I, da fórmula acima, fundidos conjuntamente e com a proteína veículo.

Ainda num aspecto adicional, a invenção proporciona uma molécula sintética, e. g., um vector, compreendendo o gene sintético acima descrito, ligado operativamente a sequências de

ácido nucleico reguladoras que dirigem e controlam a expressão do produto do gene sintético numa célula hospedeira.

É, também, aqui descrito um microrganismo recombinante, *e. g.*, um vírus ou bactéria comensal, que contém o gene ou a molécula sintéticos, descritos acima. Este microrganismo é capaz de expressar várias cópias do produto do gene ou molécula num hospedeiro.

Ainda um outro aspecto da invenção, consiste numa composição farmacêutica útil para induzir anticorpos que reagem com um grande número de proteínas Tat do HTV-1 conhecidas, *e. g.*, mais de 95% e, de um modo preferido, mais de 99%, das proteínas Tat conhecidas. Estes anticorpos induzidos podem impedir a multiplicação do HIV-1. A composição farmacêutica compreende, pelo menos, uma das composições de péptidos/polipéptidos recombinantes ou sintéticas descritas acima; ou o gene sintético/molécula descrito acima; ou o microrganismo recombinante descrito acima, num veículo farmacêuticamente aceitável.

Ainda um aspecto adicional, da invenção consiste numa composição farmacêutica útil para prejudicar a multiplicação do HIV-1, contendo, esta composição, uma composição de anticorpo ou uma composição de anticorpo monoclonal acima descrita.

É, também, divulgado um método para reduzir os níveis virais do HIV-1, que envolve a exposição de um humano ou outro primata a composições farmacêuticas que induzem anticorpos, descritas acima, induzindo activamente anticorpos que reagem com a maioria das proteínas Tat do HIV-1 e prejudicando a multiplicação do vírus *in vivo*. Este método é apropriado para um

indivíduo infectado com o HIV-1, com um sistema imunitário competente ou para um indivíduo não infectado ou cronicamente infectado, mas assintomático. O método induz anticorpos que reagem com as proteínas Tat do HIV-1, as quais reduzem a multiplicação viral durante qualquer infecção aguda inicial com o HIV-1 e as quais minimizam adicionalmente a viremia crónica que leva à SIDA.

É, também, divulgado um método para reduzir os níveis virais do HIV-1, pela administração a um humano que é incapaz de estabelecer uma resposta imunitária eficaz ou rápida contra a infecção com o HIV-1, uma composição farmacêutica contendo as composições de anticorpo descritas acima. O método pode envolver a administração da composição de um modo crónico.

São, também, divulgados métodos para produzir as composições descritas acima, assim como células hospedeiras transfectadas com essas composições.

É, também, divulgado um kit útil para a medição e a detecção dos títulos e das especificidades dos anticorpos induzidos pela imunização com as composições descritas acima. O kit da invenção inclui, de um modo preferido, os dois péptidos do Epitopo I requeridos, descritos acima, assim como péptidos de adição do Epitopo I, reconhecido por primatas e, possivelmente, péptidos adicionais dos Epitopos II a IV e suportes sólidos revestidos, um reagente marcado para detectar a ligação de anticorpos a estes péptidos e diversos substratos e aparelhos para produzir ou detectar os sinais proporcionados pelas marcações, assim como aparelhos convencionais para recolher amostras de sangue, frascos apropriados e outros componentes de ensaio de diagnóstico.

É, também, divulgado um método para detectar os títulos e os padrões de reactividade de anticorpos em indivíduos imunizados com as composições desta invenção. O método inclui os passos de incubação de diluições do fluido biológico do indivíduo, e. g. soro, com placas ou esferas nas quais estão ligados um ou mais péptidos das sequências do Epitopo I desta invenção e, opcionalmente, os Epitopos II a IV, eliminando os materiais biológicos não-ligados, por lavagem e medindo qualquer anticorpo ligado aos péptidos, com o reagente marcado, e. g., uma anti-imunoglobulina humana à qual está associada uma enzima. Dependendo do tipo de marcação utilizada, o sinal produzido pela marcação pode ser produzido pela adição de mais substrato, o qual reage com a enzima, e. g., produzindo uma alteração da coloração. Podem ser, também, incorporadas outras marcações convencionais na concepção deste ensaio.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção são descritos adicionalmente na seguinte descrição detalhada das suas formas de realização preferidas.

#### Breve Descrição dos Desenhos

A Fig. 1A é um gráfico dos títulos de ELISA do antisoro de coelho contra péptidos do Epitopo I lineares maiores, em péptidos detectores truncados, expressos como uma percentagem da ligação máxima aos péptidos maiores. São apresentados os aminoácidos do terminal N ou C dos péptidos detectores correspondentes, em baixo de cada coluna, no código de uma letra.

A Fig. 1B é um gráfico dos títulos de ELISA do antisoro de primata contra péptidos do Epitopo I lineares maiores, em péptidos detectores truncados, expressos como uma percentagem da ligação máxima aos péptidos maiores. São apresentados os aminoácidos do terminal N ou C dos péptidos detectores correspondentes, em baixo de cada coluna, no código de uma letra.

A Fig. 2A é um gráfico dos títulos de ELISA do antisoro de coelho contra péptidos do Epitopo II lineares, em péptidos detectores truncados, expressos como uma percentagem da ligação máxima aos péptidos maiores. São apresentados os aminoácidos do terminal N ou C dos péptidos detectores correspondentes, em baixo de cada coluna, no código de uma letra.

A Fig. 2B é um gráfico dos títulos de ELISA do antisoro de primata contra péptidos do Epitopo II lineares maiores, em péptidos detectores truncados, expressos como uma percentagem da ligação máxima aos péptidos maiores. São apresentados os aminoácidos do terminal N ou C dos péptidos detectores correspondentes, em baixo de cada coluna, no código de uma letra.

A Fig. 3A ilustra a concepção de uma construção imunogénica de Epitopo I/Epitopo II da Tat do HIV-1, pentavalente, no código de aminoácidos de três letras [SEQ ID N°: 12].

A Fig. 3B ilustra a concepção de um Epitopo I universal octavalente, no código de aminoácidos de três letras [SEQ ID N°: 13].

A Fig. 3C ilustra a concepção de uma construção do Epitopo II universal imunogénico, univalente, no código de aminoácidos de três letras [SEQ ID N°: 14].

#### Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção proporciona uma solução para o problema apresentado acima, proporcionando composições adicionais que induzem anticorpos em indivíduos não infectados ou nas etapas iniciais da infecção com HIV-1, ainda capazes de estabelecer uma resposta imunitária a um imunogénio, reagindo, os anticorpos, com um grande número (*i. e.*, superior a 95% e de um modo preferido, superior a 99%) de variantes conhecidas da proteína Tat do HIV-1. O termo "variante da sequência (ou da proteína) Tat" designa um polipéptido ou péptido contendo resíduos de aminoácido da proteína Tat ou uma sequência de uma proteína Tat de outra estirpe do HIV-1, que é substancialmente semelhante à sequência de consenso da Tabela I [SEQ ID N°: 15]. Cada variante pode diferir da sequência de consenso e/ou de outra variante em, pelo menos, uma modificação de aminoácido dentro dos resíduos de interesse para os Epitopos I a IV. Esta modificação pode proporcionar a mesma ou outra especificidade antigénica contra esse Epitopo Tat particular, quando adicionada à composição da invenção.

Os anticorpos induzidos por composições desta invenção podem inibir a multiplicação do HIV-1, a qual previne a continuação da progressão da doença para SIDA. São, também, proporcionadas composições de anticorpo para utilização em humanos infectados ou não-infectados, que sejam incapazes de estabelecer uma resposta imunitária eficaz ou rápida contra a

infecção com HIV-1. Estas composições são capazes de reagir com um grande número de proteínas Tat reduzindo, deste modo, os níveis virais do HIV-1. Estes anticorpos são úteis, tanto em contextos terapêuticos, como profiláticos, para controlar o desenvolvimento da SIDA numa grande população, exposta ou infectada com estirpes de HIV-1 que produzem proteínas Tat imunologicamente distintas após a infecção.

As composições da presente invenção incluem péptidos ou proteínas, baseados em péptidos proporcionados por um epitopo da proteína Tat do HIV-1, contra a qual os primatas desenvolveram anticorpos ou sequências de ácido nucleico que codificam péptidos e polipéptidos que induzem anticorpos contra a Tat, em primatas. Estes anticorpos induzidos, por sua vez, impedem a multiplicação do HIV-1.

A proteína Tat do HIV-1 é produzida a partir de dois exões: o Exão 1 codifica uma proteína com 72 aminoácidos (AA) que pode ser expressa sem excisão ou que pode ser excisada com os aproximadamente 15-32 aminoácidos codificados pelo Exão 2. A sequência do Exão 1 da Tat do HIV-1 encontra-se na Tabela I e é uma sequência de consenso baseada nas sequências da proteína Tat de 31 estirpes HIV-1 conhecidas, encontradas no subtipo B comum [base de dados NIH Los Alamos]. As posições de aminoácido nas quais aparecem variações encontram-se em letras minúsculas. Na Tabela I [SEQ ID N°: 15], o resíduo de aminoácido na posição 73 é a primeira Pro do Exão 2 da Tat do HIV-1. Uma vez que o produto com 72 aminoácidos do Exão 1, isolado, tem capacidade de incorporação e activação celular, é essencial que os anticorpos reajam e interditem o transporte intercelular do péptido com 72 aminoácidos. A Tat do HIV-1 contém uma região rica em cisteína entre as posições dos AA 22 e 37 do Exão 1 [SEQ ID N°: 15], com



uma ligação covalente simples entre Cys<sub>21</sub> e Cys<sub>37</sub>, produzindo uma estrutura terciária complexa. A literatura científica tem indicado que esta região não parece ser imunogénica. Os anticorpos predominantes contra a Tat, são contra a região linear do terminal N, rica em Pro (AA1-21) e a região linear básica (AA44-65), com um anticorpo adicional descrito, contra AA62-73.

O requerente identificou anteriormente epitopos, *i. e.*, regiões de ligação, reconhecidas por anticorpos de coelho (sequências antigénicas) na sequência linear 1-21 do terminal N (22 AA) do Exão 1 [SEQ ID N°: 15] de variantes da Tat e definiu quatro epitopos de célula B na Tat do HIV-1. Como anteriormente descrito na Publicação de Patente Internacional WO99/02185, as regiões imunogénicas desta sequência maior foram reconhecidas pelo sistema imunitário do coelho. Estas regiões estão identificadas na sequência de consenso do Exão 1 na Tabela I abaixo: o Epitopo I foi identificado por anticorpos de coelho como a sequência de nove aminoácidos das posições dos AA 2-10 do Exão 1. O Epitopo II foi identificado como a sequência com oito aminoácidos das posições dos AA 43-50 do Exão 1. O epitopo III foi identificado como a sequência de 7 aminoácidos das posições dos AA 56-62 do Exão 1. O epitopo IV foi identificado como a sequência de doze aminoácidos das posições dos AA 62-73 da Tat, incluindo a primeira Pro (AA 73) do Exão 2 e sobrepondo-se à Ser 62 do Epitopo III.

**Tabela I - Sequência Tat de Consenso**

|  |    |    |
|--|----|----|
| 1  | 10 | 20 |
| Met glu Pro <u>Val asp pro arg Leu Glu Pro Trp lys</u> His Pro Gly Ser Gln Pro lys thr |    |    |
|  | 30 | 40 |
| ala cys thr asn Cys Tyr Cys Lys lys Cys Cys phe his Cys gln val Cys Phe ile thr        |    |    |
|  | 50 | 60 |
| <u>Lys gly Leu gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg arg arg ala pro gln</u> |    |    |
|  | 70 |    |
| asp Ser gln thr his Gln val ser Leu ser Lys gln [SEQ ID NO: 15].                       |    |    |

No entanto, na presente invenção, o requerente detectou uma alteração surpreendente nas sequências de aminoácido, em particular do Epitopo I, reconhecido pelas células B em primatas. Na Tabela I, as sequências dos Epitopos I e II reconhecidas por primatas encontram-se sublinhadas. O Epitopo I reconhecido por primatas estende-se dos resíduos de aminoácido 5 a 12 da Tat. A sequência do Epitopo II reconhecida pelas células B em primatas estende-se pelos aminoácidos 41-50. Os epitopos III e IV são os mesmos epitopos reconhecidos em coelhos, como descrito no documento W099/02185.

*A. Composições Imunogénicas do Epitopo I Reconhecido por Primatas*

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona uma composição contendo, pelo menos, duas variantes de um péptido ou polipéptido reconhecido pelo sistema imunitário dos primatas e promove uma resposta imunitária humoral específica (para o objectivo desta invenção) num primata exposto *in vivo* às sequências. Estas sequências de aminoácidos do Epitopo I reconhecido por primatas, correspondem aos resíduos de

aminoácido 5-12 da sequência de consenso da Tat [SEQ ID N°: 15] da Tabela I, derivadas de várias "variantes da sequência da Tat". O Epitopo I reconhecido por primatas define péptidos da fórmula geral: R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID N°: 8], em que Y<sub>7</sub> é Arg, Lys, Ser ou Asn; X<sub>9</sub> é Glu ou a Asp; e Z<sub>12</sub> é Lys ou Asn. Esta fórmula possibilita vários péptidos variantes do Epitopo I de mamífero. A composição desta invenção deve conter, pelo menos, uma variante peptídica em que Y<sub>7</sub> é Arg e Z<sub>12</sub> é Lys e, pelo menos, uma segunda variante peptídica, na qual Y<sub>7</sub> é Asn e Z<sub>12</sub> é Asn.

Os aminoácidos especificados que aparecem na fórmula do Epitopo I reconhecido por primatas acima é uma sequência reactiva do Epitopo I mínimo de primata. Cada imunogénio definido por essa fórmula que é utilizado em métodos desta invenção para desenvolver anticorpos contra a sequência do Epitopo I mínimo, pode ser uma sequência de aminoácidos maior. Por exemplo, os aminoácidos do Epitopo I mínimo são flanqueados por outros aminoácidos, de forma a que a totalidade da sequência imunogénica do Epitopo I tenha entre, cerca de, 8 e 25 aminoácidos de comprimento. A identidade dos aminoácidos flanqueadores não é essencial para a função biológica do Epitopo I imunogénico. Em particular, os aminoácidos adicionais no terminal N das sequências do Epitopo I reconhecidas por primatas, não afectam a imunogenicidade. Deste modo, para cada péptido do Epitopo I reconhecido por primatas, o R1 do terminal N pode ser um hidrogénio livre, no aminoácido não modificado do terminal N ou um alquilo inferior (*i. e.*, alquilo C1-C10) ou um alcanóilo C1-C10 inferior, tal como um grupo acetilo. O R1 pode, também, incluir uma sequência com, entre 1 a, cerca de, 5 aminoácidos, opcionalmente, substituída com um alquilo inferior ou alcanóilo inferior. De um modo preferido, R1 representa 2

aminoácidos. Numa forma de realização, R1 é Val, resultando na sequência Val-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub> [SEQ ID N°: 37], em que Y<sub>7</sub>, X<sub>9</sub> e Z<sub>12</sub> são definidos como acima. Numa outra forma de realização, R1 é -X<sub>2</sub>-Pro-Val-, resultando na sequência X<sub>2</sub>-Pro-Val-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub> [SEQ ID N°: 38], em que X<sub>2</sub> é Glu ou a Asp e em que Y<sub>7</sub>, X<sub>9</sub> e Z<sub>12</sub> são definidos como acima. De um modo preferido, R1 representa 3 aminoácidos.

Aminoácidos adicionais no terminal C da sequência do Epitopo I mínimo reconhecido por primatas, podem intensificar o título do anticorpo. Embora o R2 do terminal C possa ser um grupo hidroxilo livre simples no aminoácido do terminal C, este pode ser, também, uma amida no terminal C. No entanto, para aumentar o título, R2 é, de um modo preferido, uma sequência com entre 1, a cerca de, 14, de um modo preferido, cerca de 4 aminoácidos adicionais amidados no terminal carboxilo. Numa forma de realização preferida, R2 é -His-Pro-Gly-Ser-amida, resultando na sequência Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-His-Pro-Gly-Ser [SEQ ID N°: 16], em que Y<sub>7</sub>, X<sub>9</sub> e Z<sub>12</sub> são definidos como acima.

De um modo preferido, uma composição desta invenção inclui, para além dos dois péptidos requeridos, identificados acima, pelo menos, cinco ou seis sequências de aminoácidos diferentes da fórmula do Epitopo I reconhecido por primatas. De um modo mais preferido, a composição compreende sete ou oito sequências de aminoácidos variantes, identificadas imediatamente abaixo. A composição pode, também, conter outras sequências de péptido ou de polipéptido, contendo, cada uma, uma combinação diferente de X<sub>9</sub>, Y<sub>7</sub> e Z<sub>12</sub>. Como demonstrado nos exemplos abaixo, com três locais de variabilidade antigénica no Epitopo I reconhecido por primatas, uma composição preferida desta invenção pode conter péptidos suficientes do Epitopo I reconhecido por primatas, para

compreender 95% da totalidade das variantes conhecidas da Tat do grupo B e grupo não-B do HIV-I, pela inclusão de dois péptidos "requeridos":

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID N°: 17]; e

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID N°: 18],  
assim como um a cinco dos péptidos do Epitopo I adicionais,  
seguintes:

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID N°: 19];

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID N°: 20];

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID N°: 21];

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID N°: 22]; e

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID N°: 23];  
assim como, ainda opcionalmente, a variante rara R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID N°: 24].

A composição da invenção do Epitopo I reconhecido por primatas, pode conter vários péptidos ou polipéptidos adicionais que contenham outras sequências que correspondam aos resíduos de aminoácido entre AA 5 a AA 12 da SEQ ID N°: 15, mas que sejam derivadas de outras variantes da Tat que não inter-reajam bem com anticorpos contra composições do Epitopo I reconhecido por primatas. As composições do Epitopo I desta invenção podem conter várias cópias de cinco ou mais péptidos do Epitopo I diferentes, sob qualquer ordem. Numa forma de realização estão

presentes, pelo menos, uma cópia de sete ou de todas as oito sequências de aminoácidos descritas acima [SEQ ID N<sup>os</sup>: 17-24].

Estes péptidos ou polipéptidos da invenção são produzidos sinteticamente ou de modo recombinante. Podem ser incluídos aminoácidos opcionais (e. g., -Gly-Ser-) ou outros espaçadores de aminoácidos ou de compostos químicos, nos terminais dos péptidos, com o objectivo de ligar os péptidos em conjunto ou a um veículo. Esta composição pode tomar a forma de um ou mais dos péptidos descritos acima, expressos como um péptido sintético ligado a uma proteína veículo. Alternativamente, uma composição pode conter vários péptidos do Epitopo I, cada um expresso como um péptido antigénico múltiplo, opcionalmente, ligado à proteína veículo. Alternativamente, os péptidos seleccionados podem ser ligados sequencialmente e expressos dentro de uma proteína produzida de modo recombinante. Como uma forma de realização, as oito sequências especificamente identificadas acima encontram-se ligadas em sequência, com e sem aminoácidos espaçadores entre estas, para formar uma proteína recombinante maior. Alternativamente, a proteína recombinante pode ser fundida com uma proteína veículo, na grelha de leitura correcta. Estas composições de Epitopo I de primata são concebidas para induzir anticorpos reactivos com mais de 95% das variantes conhecidas da proteína Tat do HIV-1, incluindo proteínas Tat dos grupos B e não-B do HIV-1.

As composições de Epitopo I reconhecido por primatas apresentam uma actividade biológica de indução num primata imunitariamente competente, imunizado, *i. e.*, um humano não-infectado ou um humano infectado assintomático, uma resposta imunitária humoral activa (*i. e.*, anticorpos) que é dirigida contra mais de 95% e, de um modo preferido, mais de 99%, das

variantes conhecidas de proteínas Tat do HIV-1. O resultado final desse tratamento é um impedimento da multiplicação do HIV-1 após uma infecção aguda. Este impedimento previne níveis do HIV-1 elevados no plasma, após seroconversão, associados com a progressão para a SIDA. A indução activa de anticorpos na fase assintomática da infecção com HIV pode reduzir a multiplicação viral, baixar a carga viral do plasma e reduzir a probabilidade da progressão para a SIDA. A composição contendo, pelo menos, os dois imunogénios do Epitopo I reconhecido por primatas requeridos e, de um modo preferido, sete ou oito dessas sequências do Epitopo I [e. g., SEQ ID N°: 17-24], pode promover uma resposta imunitária contra, cerca de, 95% das 294 sequências da Tat dos subtipos B comuns do HIV-1 conhecidas e contra as proteínas Tat da totalidade dos 56 subtipos não-B do HIV-1, que foram sequenciados [cortesia da Dr<sup>a</sup>. Esther Guzman, base de dados do HIV Los Alamos NIAID; base de dados GenBank].

#### *B. Composições Imunogénicas Contendo Epitopos Adicionais*

Numa outra forma de realização, a presente invenção proporciona outras composições que utilizam duas ou mais sequências do Epitopo I reconhecido por primatas combinadas com, pelo menos, uma sequência do Epitopo II e, opcionalmente, com um ou mais péptidos do Epitopo III ou IV. Estes Epitopos II, III e IV da Tat do HIV-1, como reconhecidos pelo sistema imunitário do coelho, são descritos em detalhe no Pedido de Patente Internacional N°. WO99/02185.

Descrito resumidamente, a sequência do Epitopo II promove uma resposta imunitária humoral específica num primata exposto à sequência do Epitopo II *in vivo*. O epitopo II, como reconhecido

por primatas, define péptidos da fórmula R3-Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R4 [SEQ ID N°: 5], em que X<sub>42</sub> é Gly ou Ala. O epitopo mínimo reconhecido pelo sistema imunitário dos primatas é o dos aminoácidos especificamente identificados com essa fórmula, *i. e.*, -Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- (aminoácidos 41-50 da SEQ ID N°: 15). Esta é, também, a sequência do imunogénio para o Epitopo II presentemente preferido. Este imunogénio em que X<sub>42</sub> é Gly induz anticorpos inter-reactivos com a sequência em que X<sub>42</sub> é Ala. Este irá reagir/inter-reagir com mais de 95% das proteínas Tat do HIV-1 conhecidas. Esta sequência do epitopo II não tem qualquer variabilidade antigénica num grande número de variantes da Tat do HIV-1 conhecidas. O R3 do terminal N pode representar o hidrogénio no aminoácido Lys não modificado do terminal N ou R3 pode ser um alquilo inferior ou um alcanóilo inferior, tal como um grupo acetilo, substituinte na Lys. O R3 pode, também, incluir uma sequência com entre 1 a cerca de 5 aminoácidos, opcionalmente, substituída com um alquilo inferior ou alcanóilo inferior. O R4 do terminal C pode representar o hidroxilo livre do aminoácido do terminal C ou R4 pode ser uma amida nesse aminoácido do terminal C. O R4 pode incluir aminoácidos não-polares adicionais, tal como um espaçador. Pode ser utilizado um exemplo de espaçador, gly-ser-gly-ser, resultando na sequência Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Gly-Ser-Gly-Ser [SEQ ID N°: 25], em que X<sub>42</sub> é Gly ou Ala. No entanto, R4 não pode consistir nos aminoácidos básicos -Lys-Arg-Arg-, os quais ocorrem naturalmente na sequência Tat, após o último aminoácido na fórmula do Epitopo II. Esta sequência do Epitopo II encontrada em 294 variantes da Tat do grupo B, é reconhecida por primatas (Como descrito no documento WO99/02185, o sistema imunitário do coelho reconhece o epitopo AA43-50 da SEQ ID N°: 15).



O Epitopo II é fracamente imunogénico quando apresentado dentro de outras sequências. Deste modo, para uma imunogenicidade óptima, esta sequência é preparada como um péptido sintético fundido com ou ligado a, uma proteína veículo ou como um péptido antigénico múltiplo, opcionalmente, ligado à proteína veículo. Alternativamente, o Epitopo II pode ser expresso como a sequência do terminal C de uma proteína recombinante, a qual está, opcionalmente, fundida, na grelha de leitura correcta, com uma proteína veículo na sua sequência do terminal amino. Numa composição desta invenção, um péptido do Epitopo II é, de um modo preferido, apresentado isolado ou em combinação com um ou mais péptidos do Epitopo I reconhecido por primatas.

Descrito resumidamente, e como identificado no documento W099/02185, o Epitopo III define péptidos da fórmula: R5-Arg-Arg-X<sub>58</sub>-Z<sub>59</sub>-A<sub>60</sub>-Y<sub>61</sub>-Ser-R6 [SEQ ID N°: 6], em que X<sub>58</sub> pode ser Ala, Pro, Ser ou Gln; Y<sub>61</sub> pode ser Asp, Asn, Gly ou Ser; Z<sub>59</sub> pode ser Pro ou His; e A<sub>60</sub> pode ser Gln ou Pro. O epitopo IV define péptidos da fórmula: R7-Ser-Gln-X<sub>64</sub>-His-Gln-Y<sub>67</sub>-Ser-Leu-Ser-Lys-Gln-Pro-R8 [SEQ ID N°: 7], em que X<sub>64</sub> pode ser Asn ou Thr; e Y<sub>67</sub> pode ser Ala ou Val.

Deste modo, as composições desta invenção, *i. e.*, os péptidos/polipéptidos contendo as sequências de aminoácidos acima identificadas, quando fornecidas a um indivíduo humano, são úteis na interdição imunológica das proteínas Tat extracelulares da maioria das estirpes do HIV-1. Estas composições funcionam para reduzir significativamente a multiplicação crónica do vírus e para permitir o controlo imunitário eficaz do vírus.

Os imunogénios para cada Epitopo são, de um modo preferido, concebidos para induzir anticorpos reactivos com maior proporção de variantes de ocorrência natural de cada epitopo. Para um epitopo, tal como o Epitopo I reconhecido por primatas, podem ser incorporadas várias cópias de um imunogénio, num imunogénio sintético ou recombinante, para intensificar a imunogenicidade e produzir anticorpos com títulos mais elevados. Para além disso, podem ser combinados imunogénios para dois ou mais epitopos, para ampliar a cobertura, uma vez que ocorrem independentemente variações na sequência de cada epitopo. Deste modo, como um exemplo, uma composição desta invenção contém os dois péptidos do Epitopo I reconhecido por primatas requeridos, assim como quatro ou cinco dos outros péptidos do Epitopo I, especificamente identificados acima, com um Cys no terminal, o qual está ligado à proteína veículo. Alternativamente, podem ser preparados péptidos antigénicos múltiplos, opcionalmente, ligados à proteína veículo e combinados para formar uma composição desta invenção. Alternativamente, podem ser utilizadas misturas de dois ou mais imunogénios.

Os imunogénios do Epitopo I reconhecidos por primatas, desta invenção, com ou sem qualquer Epitopo II, III ou IV ou outros imunogénios opcionais, podem ser preparados e utilizados em composições imunogénicas sob várias formas, por exemplo, sintetizados quimicamente ou como péptidos recombinantes, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusão ou péptidos de fusão.

## 1. Péptidos/Proteínas Recombinantes ou Sintéticos, Ligados a um Veículo

Como uma forma de realização, uma composição da presente invenção pode ser um péptido sintético ou produzido de modo recombinante, contendo, pelo menos, as duas sequências de aminoácidos imunogénicas do Epitopo I reconhecido por primatas requeridas (assim como outras sequências adicionais do Epitopo I) e contendo, também, uma ou mais sequências de aminoácidos imunogénicas do Epitopo II/III/IV, ligadas a uma proteína veículo seleccionada. Nesta forma de realização de uma composição desta invenção, podem ser combinadas várias sequências de aminoácidos do Epitopo I reconhecido por primatas acima descritas com ou sem sequências flanqueadoras, sequencialmente, num polipéptido e ligadas ao mesmo veículo. Alternativamente, os imunogénios do Epitopo I, II, III ou IV, podem ser ligados individualmente como péptidos, à mesma ou a diferentes proteínas veículo e as construções imunogénio-veículo resultantes podem ser misturadas em conjunto, para formar uma única composição. Essas sequências podem ser preparadas sinteticamente, por métodos convencionais de síntese química ou de um modo recombinante, por expressão numa célula hospedeira seleccionada, assim como por meios não-convencionais.

Para esta forma de realização, a proteína veículo é, desejavelmente, uma proteína ou outra molécula que possa intensificar a imunogenicidade do imunogénio seleccionado. Esse veículo pode ser uma molécula maior que tem um efeito de adjuvante. Os exemplos de proteína veículo convencionais incluem, sem limitação, proteína DnaK de *E. coli*, galactocinase (galK, a qual catalisa o primeiro passo do metabolismo da galactose em bactérias), ubiquitina, factor  $\alpha$  de conjugação,

$\beta$ -galactosidase e proteína NS-1 de influenza. Os toxóides (*i. e.*, a sequência que codifica a toxina de ocorrência natural, com modificações suficientes para eliminar a sua actividade tóxica) tal como o toxóide da difteria e o toxóide do tétano podem ser, também, utilizados como veículos. De um modo semelhante, podem ser utilizadas várias proteínas de choque térmico bacterianas, *e. g.*, hsp-70 micobacteriana. A redutase da glutathione (GST) é outro veículo útil. Um especialista na técnica pode seleccionar facilmente um veículo adequado.

Numa construção de imunogénio-proteína veículo particularmente desejável, os dois imunogénios do Epitopo I requeridos e três a seis imunogénios do Epitopo I reconhecido por primatas, adicionais e péptidos/polipéptidos imunogénicos opcionais, podem ser covalentemente ligados a uma proteína 70 de choque térmico (hsp70) micobacteriana de *E. coli* [K. Suzue *et al.*, *J. Immunol.*, **156**: 873 (1996)]. Numa outra forma de realização pretendida, a composição é formada por ligação covalente das sequências do péptido ou do polipéptido contendo o imunogénio, com o toxóide da difteria.

## 2. Péptido Antigénico Múltiplo

Ainda numa outra forma de realização, os imunogénios de epitopos peptídicos ou polipeptídicos e quaisquer imunogénios opcionais seleccionados podem encontrar-se sob a forma de uma construção de péptido antigénico múltiplo ("MAP", também designado como péptido octamérico com núcleo de lisina). Essa construção pode ser concebida utilizando o sistema MAP descrito por Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5409-5413 (1988). Este sistema utiliza uma matriz nuclear de resíduos de lisina, no

qual são sintetizadas várias cópias do mesmo Epitopo I reconhecido por primatas, da invenção, como descrito [D. Posnett *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **263** (4): 1719-1725 (1988); J. Tam, "Chemically Defined Synthetic Immunogens and Vaccines by the Multiple Antigen Peptide Approach", *Vaccine Research and Developments*, Vol. 1, ed. W. Koff e H. Six, pp 51-87 (Marcel Deblau, Inc., Nova Iorque 1992)]. Cada MAP contém várias cópias de apenas um péptido. Consequentemente, uma composição contendo MAP irá conter, pelo menos, dois e, de um modo preferido, cerca de sete, MAP. Um MAP irá apresentar o primeiro imunogénio do Epitopo I peptídico ou polipeptídico requerido, ligado a cada núcleo de lisina; um segundo MAP irá ter o segundo imunogénio do Epitopo I peptídico ou polipeptídico requerido, ligado a cada núcleo de lisina. Podem, ainda, ser incluídos outros MAP, cada um com uma sequência de aminoácidos do Epitopo I reconhecido por primatas identificada acima, diferente. Podem ser utilizados vários MAP diferentes para obter qualquer combinação pretendida de sequências dos Epitopos I, II, III ou IV. De um modo preferido, estas construções de MAP estão associadas com outras sequências estimulantes de células T ou como composições farmacêuticas, administradas em conjunto com agentes estimulantes de células T, tal como adjuvantes conhecidos.

### 3. Espaçadores

Em qualquer das composições acima, *e. g.*, como construções de péptido/polipéptido-veículo ou MAP, cada imunogénio peptídico/polipeptídico ou cada sequência de aminoácidos no imunogénio, pode ser, opcionalmente, separado por uma sequência de aminoácidos opcional designada como "espaçador". Os espaçadores são sequências com entre 1, a cerca de, 4

aminoácidos que são interpostas entre duas sequências, para permitir a ligação entre estas, sem afectar de um modo adverso a estrutura tridimensional do imunogénio. Os espaçadores podem, também, conter locais de quebra de endonucleases de restrição, para permitir a separação das sequências, quando pretendido. São conhecidos espaçadores ou adaptadores adequados e podem ser facilmente concebidos e seleccionados por um especialista na técnica. Os espaçadores preferidos são sequências contendo os aminoácidos Gly e/ou Ser.

*F. Composições de Ácido Nucleico da Invenção, incluindo um Gene Sintético ou Produzido Recombinantemente*

Outras formas de realização desta invenção incluem sequências de ácido nucleico que codificam as composições de péptidos/polipéptidos do Epitopo I reconhecido por primatas acima descritas, incluindo os imunogénios peptídicos/polipeptídicos das composições descritas acima e incluindo os péptidos e polipéptidos fundidos com proteínas veículo. As sequências de ácido nucleico podem, também, incluir sequências codificando as proteínas veículo.

Deste modo, uma forma de realização preferida da invenção é um "gene sintético" que codifica sequencialmente para, pelo menos, os dois péptidos/polipéptidos imunogénicos do Epitopo I reconhecidos por primatas requeridos. Refira-se que embora o gene seja designado como "sintético", este pode ser concebido por síntese química ou por meios recombinantes, como pretendido. De um modo preferido, o gene sintético codifica sete ou a totalidade das oito sequências de aminoácidos do Epitopo I reconhecido por primatas, especificamente identificadas

[SEQ ID N<sup>os</sup>: 17-24]. O gene sintético pode, também, codificar qualquer selecção de um imunogénio do Epitopo II ou III, contanto que o péptido do Epitopo II ou III esteja fundido com o terminal C da sequência do Epitopo I reconhecido por primatas e não adicionalmente modificado, no seu próprio terminal C. Este gene sintético pode codificar várias cópias das duas sequências de aminoácidos do Epitopo I requeridas ou cópias de vários imunogénios ou sequências de aminoácidos diferentes adicionais ou várias cópias de vários imunogénios ou sequências de aminoácidos diferentes. O gene sintético pode codificar as sequências de aminoácidos seleccionadas numa grelha de leitura aberta com, ou fundida com, uma sequência de ácidos nucleicos codificando uma proteína veículo. Uma característica adicional do gene sintético pode consistir neste codificar um espaçador entre cada sequência codificando um imunogénio e/ou entre a sequência codificando um imunogénio e a sequência codificando a proteína veículo.

O gene sintético da presente invenção pode, também, fazer parte de uma molécula sintética ou recombinante. A molécula sintética pode ser uma construção de ácidos nucleicos, tal como um vector ou plasmídeo que contém o gene sintético codificando a proteína, péptido, polipéptido, proteína de fusão ou péptido de fusão, sob o controlo operativo de sequências de ácido nucleico codificando elementos reguladores, tais como promotores, sinais de terminação e semelhantes. Essas moléculas sintéticas podem ser utilizadas para produzir as composições de imunogénio polipeptídico/peptídico de modo recombinante. O gene sintético ou a molécula sintética podem ser preparados pela utilização de métodos de síntese química ou, de um modo preferido, por técnicas recombinantes. Por exemplo, o gene ou a molécula

sintéticos podem conter determinada preferência de códons para as espécies da célula hospedeira indicada.

O gene ou a molécula sintéticos, de um modo preferido, sob a forma de ADN, podem ser utilizados de vários modos. Por exemplo, estas sequências de ácido nucleico sintéticas podem ser utilizadas para expressar *in vitro* os péptidos/polipéptidos da invenção, numa cultura celular de hospedeiro. Os imunogénios expressos, após purificação adequada, podem então ser incorporados num reagente farmacêutico ou vacina. Alternativamente, o gene sintético ou a molécula sintética desta invenção podem ser administrados directamente num mamífero, de um modo preferido, um humano, sob a forma do denominado "ADN nu", de forma expressar o imunogénio proteico/peptídico *in vivo* num doente. Ver, e. g., J. Cohen, *Science*, **259**: 1691-1692 (19 de Março de 1993) ; E. Fynan *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 11478-11482 (Dez. 1993); e J. A. Wolff *et al.*, *Biotechniques*, **11**: 474-485(1991. A molécula sintética, e. g., um vector ou plasmídeo, pode ser utilizada na injeção directa no hospedeiro mamífero. Isto resulta na expressão da proteína pelas células hospedeiras e na subsequente apresentação ao sistema imunitário, para induzir a formação de anticorpos *in vivo*.

#### *G. Microrganismos Que Expressam o Gene Sintético*

Ainda num outro aspecto, da presente invenção, os genes ou as moléculas sintéticos desta invenção podem ser incorporados num microrganismo não-patogénico. O microrganismo resultante, quando administrado a um hospedeiro mamífero, expressa e multiplica *in vivo* as composições expressas desta invenção, de forma a induzir a formação de anticorpos específicos. Por



exemplo, os vírus recombinantes não-patogénicos ou as bactérias comensais que contêm as composições ou genes sintéticos desta invenção e que são úteis para a administração a um doente mamífero, podem ser preparados por utilização de metodologia convencional e podem ser seleccionados de entre microrganismos não-patogénicos conhecidos.

Entre as bactérias comensais que podem ser úteis para a distribuição exógena da molécula sintética ao doente e/ou para transportar o gene sintético para o interior do doente, *in vivo*, incluem, sem limitação, várias estirpes de *Streptococcus*, e. g., *S. gordonii* ou *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces* e *Saccharomyces*.

Os vírus não-patogénicos adequados que podem ser modificados para transportar o gene sintético para o interior das células do hospedeiro incluem poxvírus, tais como vaccinia, adenovírus, vírus adeno-associados, vírus da varíola do canário, retrovírus e semelhantes. São normalmente utilizados vários vírus não-patogénicos na terapia génica humana e como veículos de outros agentes de vacina e são conhecidos e seleccionáveis por um especialista na técnica.

#### *H. Preparação ou Produção de Composições da Invenção*

As composições da invenção e os polipéptidos/péptidos individuais contendo os imunogénios do Epitopo I reconhecido por primatas desta invenção e, opcionalmente, um ou mais de Epitopo II, III ou IV, genes sintéticos e moléculas sintéticas da invenção, podem ser preparadas de um modo convencional, por recurso a técnicas de síntese química conhecidas, tais como descritas por Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**: 2149-2154

(1963). Alternativamente, as composições desta invenção podem ser preparadas por técnicas de ADN recombinante conhecidas, por clonagem e expressão de um fragmento de ADN contendo uma sequência codificando um péptido/polipéptido contendo, pelo menos, as duas sequências do Epitopo I reconhecido por primatas requeridas, com outros imunogénios opcionais e proteínas veículo opcionais, dentro de um microrganismo ou célula hospedeira. As sequências codificantes para imunogénios do Epitopo I e opcionais, podem ser preparadas sinteticamente [W. P. C. Stemmer *et al.*, *Gene*, **164**: 49 (1995)] ou podem ser derivadas de ARN viral, através de técnicas conhecidas ou de plasmídeos contendo ADNc disponíveis.

Podem ser utilizadas combinações destas técnicas. Por exemplo, pode ser utilizada a montagem de imunogénios sequenciais por técnicas de biologia molecular convencionais para a produção do gene sintético e pode ser utilizada mutagénese dirigida para um local, para proporcionar sequências de imunogénio pretendidas. O produto do gene sintético é, então, produzido de modo recombinante. Todas estas manipulações podem ser realizadas por metodologia convencional.

Os sistemas para clonagem e expressão das composições de péptidos/polipéptidos desta invenção, utilizando os genes ou moléculas sintéticos, incluem a utilização de vários microrganismos e células que são bem conhecidos na tecnologia recombinante. Estes incluem, por exemplo, várias estirpes de *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces* e *Saccharomyces*, assim como células de mamíferos, leveduras e insectos. Para essa finalidade, são conhecidos vectores adequados e encontram-se disponíveis a partir de laboratórios privados e públicos e colecções e a partir de vendedores comerciais. Presentemente, os

hospedeiros mais preferidos são células de mamífero, tais como células de ovário de Hamster chinês (CHO) ou células COS-1. Estes hospedeiros podem ser utilizados em ligação com vectores poxvirais, tais como vaccinia ou varíola porcina. A selecção de outras células hospedeiras e métodos adequados, para transformação, cultura, amplificação, rastreio e produção e purificação do produto pode ser realizada por um especialista na técnica, a partir de técnicas conhecidas. Ver, e. g., Gething e Sambrook, *Nature*, **293**: 620-625 (1981), entre outros. Outros sistemas preferidos incluem o sistema de expressão e de vectores de baculovírus.

Quando produzidas por meios recombinantes convencionais, as composições desta invenção, i. e., os polipéptidos/péptidos contendo as cópias indicadas de imunogénios do Epitopo I reconhecido por primatas e imunogénios opcionais, podem ser isoladas, quer a partir dos conteúdos celulares, por técnicas de lise convencionais ou a partir do meio celular, por métodos convencionais, tal como cromatografia. Ver, e. g., Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, 2<sup>a</sup> Edi., Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1989). Os plasmídeos e vectores virais adequados, utilizados para a produção dos componentes peptídicos/polipéptidos, como vacinas de ADN, são bem conhecidos dos especialistas na técnica e não constituem uma limitação da presente invenção. Ver, Sambrook et al., citado acima e as referências acima, para produção da proteína. Ver, também, o Pedido de Patente Internacional PCT WO94/01139, publicado a 20 de Janeiro de 1994. Resumidamente, o ADN codificando o péptido/polipéptido seleccionado, é inserido num vector ou plasmídeo que contém outras sequências flanqueadoras opcionais, um promotor, uma sequência líder de ARNm, um local de iniciação e outras sequências reguladoras capazes de controlar a

multiplicação e a expressão dessa sequência *in vivo* ou *in vitro*. Estes vectores permitem a infecção das células do doente e a expressão *in vivo* da sequência génica sintética ou a sua expressão *in vitro* sob a forma de proteína/péptido ou de proteína/péptido de fusão.

A composição resultante pode ser formulada numa composição de Epitopo I reconhecido por primatas, com qualquer número de imunogénios opcionais e pode ser sujeita a rastreio para a eficácia, através de ensaios *in vivo*. Esses ensaios utilizam a imunização de um animal, e. g., um símio, com a composição e a avaliação dos títulos de anticorpo contra as proteínas Tat do HIV-1 ou contra péptidos detectores sintéticos correspondentes à sequências de variantes da Tat (como apresentado nos exemplos abaixo).

#### *I. Composições de Anticorpo da Invenção*

Uma composição de anticorpo ou composição de ligação do ligando desta invenção abrange anticorpos que se ligam, especificamente, a um Epitopo I da fórmula -Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-[SEQ ID N°: 9], em que Y<sub>7</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Arg, Lys, Ser e Asn; em que X<sub>9</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Glu e Asp; e em que Z<sub>12</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Lys e Asn. De um modo preferido, essa composição de anticorpo inclui, pelo menos, dois ou mais anticorpos ou ligandos diferentes, os quais se ligam, especificamente, a, pelo menos, duas sequências do Epitopo I requeridas, como aqui definido. São produzidos anticorpos (ou outros ligandos de ligação) contra as duas sequências requeridas R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID N°: 17]; e R1-Asp-

Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID N°: 18] do Epitopo 1. Deste modo, os anticorpos da composição ligam-se a uma proteína Tat do HIV, presente em várias variantes de proteínas Tat do HIV-1. São produzidos anticorpos ou ligandos adicionais contra outras sequências que estão incluídas na fórmula do Epitopo I acima.

Numa forma de realização, um anticorpo isolado dirigido, que se liga ao péptido ou polipéptido do Epitopo I da invenção, como descrito acima, constitui, também, um aspecto desta invenção. Essas composições de anticorpo policlonais são, tipicamente, produzidas por imunização de um mamífero, de um modo preferido, um primata, com uma composição peptídica/polipeptídica, contendo os dois imunogénios do Epitopo I requeridos, assim como uma variedade de outros imunogénios do Epitopo I reconhecido por primatas e imunogénios opcionais, como descrito acima. É particularmente desejável como imunogénio o imunogénio do Epitopo I reconhecido por primatas heptavalente (*i. e.*, sem a variante rara) ou um imunogénio octavalente, tais como o gene sintético ou a proteína de fusão descrita no Exemplo 3 abaixo, e/ou um imunogénio do Epitopo II univalente (*i. e.*, um único péptido do Epitopo II, opcionalmente ligado a um veículo). Para além de serem produzidos em primatas, esses anticorpos podem ser, também, produzidos em animais transgênicos, incluindo os denominados murganhos transgênicos "humanizados". No entanto, um hospedeiro desejável para produzir anticorpos policlonais contra uma composição desta invenção inclui humanos. O título desses anticorpos policlonais produzidos num mamífero exposto a composições do Epitopo I pode ser monitorizado por técnicas padrão, tal como com um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima. Se pretendido, as moléculas de anticorpo podem ser isoladas a partir do mamífero, *e. g.*, a partir do sangue completo, plasma

ou soro e adicionalmente purificadas a partir do plasma ou soro do mamífero imunizado por técnicas convencionais. As técnicas de recolha convencionais podem incluir plasmaférese, cromatografia de proteína A, entre outras. Essas composições de anticorpo policlonal podem ser, em si, utilizadas como composições farmacêuticas desta invenção.

Alternativamente, as células produtoras de anticorpo podem ser obtidas a partir de mamíferos e utilizadas para preparar outras formas de anticorpos e ligandos, e. g., anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, ligandos produzidos por rastreio de apresentações por fagos, fragmentos de anticorpo e suas misturas e anticorpos sintéticos, anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e anticorpos totalmente humanos. As técnicas preparativas para a produção destes tipos de ligandos são conhecidas e os próprios ligandos podem ser produzidos, utilizando as sequências de aminoácidos do Epitopo I reconhecido por primatas e imunogénios opcionais, divulgados. Ver, e. g., Kohler e Milstein (1975) *Nature*, **256**: 495497; Kozbor et al, (1983) *Immunol. Today*, **4**: 72; Cole et al, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96; Harlow et al., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **86**: 10029-10032 (1989); Hodgson et al., *Bio/Technology*. 9: 421(1991) Pedido PCT Internacional PCT/GB91/01554, Publicação N°. W092/04381 e Pedido PCT Internacional PCT/GB93/00725, Publicação N°. W093/20210].

Por exemplo, numa outra forma de realização, um anticorpo monoclonal liga-se, especificamente, à sequência do Epitopo I mínima definida por -Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>- [SEQ ID N°: 9]

de uma proteína Tat do HIV, compreendendo qualquer imunogénio maior definido pela fórmula do Epitopo I, com os aminoácidos variáveis e os grupos R como definidos acima. Como uma forma de realização, um anticorpo monoclonal liga-se especificamente à sequência de aminoácidos -Asp-Pro-Asn-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Asn- [SEQ ID N°: 26], em que X<sub>9</sub> é Glu ou Asp. São, ainda, parte desta invenção, outros anticorpos monoclonais que se ligam especificamente às sequências do Epitopo I mínimas, definidas pela fórmula acima.

Podem ser desenvolvidos outros anticorpos anti-Tat, para o rastreio de uma biblioteca combinatória de imunoglobulinas recombinante (e. g., apresentações de anticorpo por fagos) com epitopos da Tat do HIV-1 reconhecidos por primatas desta invenção, para isolar membros da biblioteca de imunoglobulinas que se ligam à Tat do HIV-1 [W. D. Huse et al., *Science*, **246**: 1275-1281 (1988)]. Encontram-se comercialmente disponíveis kits para produzir e rastrear bibliotecas de apresentação por fagos, e. g., Recombinant Phage Antibody System de Pharmacia, N°. de Catálogo 27-9400-01; Phage Display kits de Strategene, etc. Ver, e. g., Patente US N°. 5223409, Publicação Internacional N°. WO92/09690, WO90/02809, etc. Os anticorpos quiméricos podem ser desenvolvidos de um modo semelhante, utilizando técnicas conhecidas [Morrison et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**: 6851; Takeda et al., *Nature*, **313**: 452 (1984), entre outros]. Os anticorpos quiméricos são moléculas nas quais porções diferentes derivam de espécies diferentes de animais. Podem ser, também, preparados anticorpos de cadeia simples por métodos convencionais [ver, e. g., Patentes US N°. 4946778 e 4704692], utilizando as porções variáveis dos anticorpos policlonais ou monoclonais, produzidos de acordo com esta invenção. Podem ser, também, utilizados fragmentos de anticorpo,

tais como os fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub> e Fv e suas bibliotecas, em vários aspectos desta invenção.

Estas composições de anticorpo/ligando ligam-se desejavelmente à maioria das variantes conhecidas da proteína Tat do HIV-1 (e. g., a mais de 95% e, de um modo preferido, a mais de 99% das variantes conhecidas da proteína Tat) e impedem as proteínas Tat de suportarem a multiplicação adicional do HIV-1. Essas composições podem incluir uma mistura de vários anticorpos diferentes que se ligam às sequências do epítipo da proteína Tat do HIV-1 de várias estirpes do HIV-1. Deste modo, estes anticorpos são úteis em métodos e formulações farmacêuticos descritos abaixo.

#### *J. Composições Farmacêuticas da Invenção*

Como um outro aspecto desta invenção, uma composição farmacêutica útil para induzir anticorpos que reagem com a maioria (e. g., mais de 95%, de um modo preferido, mais de 99%) da proteínas Tat do HIV-1 conhecidas e para prejudicar a multiplicação do HIV-1, pode compreender, como seus agentes activos, pelo menos, os dois péptidos ou polipéptidos do Epítipo I reconhecido por primatas, requeridos, desta invenção e, de um modo preferido, péptidos do Epítipo I adicionais. Várias composições desejáveis incluem os seguintes componentes acima descritos:

(a) um imunogénio peptídico/polipeptídico que contém, pelo menos, as duas sequências de aminoácidos do Epítipo I reconhecido por primatas requeridas e, de um modo mais preferido, pelo menos, sete. [SEQ ID N°s: 17-24];



(b) um imunogénio peptídico/polipeptídico de (a) que contém, adicionalmente, qualquer uma das sequências de aminoácido do Epitopo II, III ou IV, de um modo preferido, um imunogénio do Epitopo II univalente;

(c) um gene sintético ou produzido de modo recombinante, codificando as duas sequências do Epitopo I reconhecido por primatas, requeridas e, de um modo preferido, sete das sequências do Epitopo I [SEQ ID N°: 17-24] e sequências opcionais como descrito acima;

(f) uma molécula sintética contendo o gene sintético de (c);

(g) um vírus recombinante contendo o gene ou molécula sintéticos descritos acima; e

(h) um comensal bacteriano contendo o gene ou molécula sintéticos descritos acima.

O(s) componente(s) activo(s) seleccionado(s) está(ão) presente(s) num veículo farmacologicamente aceitável e a composição pode conter ingredientes adicionais. As formulações farmacêuticas contendo as composições desta invenção podem conter outros agentes activos, tais como agentes estimulantes de células T para os MAP, adjuvantes e citocinas imunoestimulantes, tais como IL-12 e outras citocinas bem conhecidas, para as composições de proteína/péptido. Todas estas composições farmacêuticas podem funcionar para baixar os níveis virais de um mamífero.

Como composições farmacêuticas, as composições compreendendo sequências peptídicas ou de ácido nucleico do Epitopo I reconhecido por primatas e as sequências de imunogénio opcionais são misturadas com um veículo farmacêuticamente aceitável adequado para a administração a mamíferos, para a profilaxia ou tratamento de infecções virais. As proteínas/péptidos podem ser combinadas numa única preparação farmacêutica, para a administração. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados, para utilização numa composição proteica imunogénica da invenção, são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Esses veículos incluem, por exemplo, soro fisiológico, soro fisiológico tamponado, um adjuvante seleccionado, tais como suspensões aquosas de hidróxido de alumínio e magnésio, lipossomas, emulsões de óleo em água e outros. Os adjuvantes adequados podem ser, também, utilizados nas composições contendo proteína desta invenção. Os veículos adequados para a administração directa de ADN, ácido nucleico plasmídico ou de vector recombinante incluem, sem limitação, soro fisiológico ou sacarose, protamina, polibreno, polilisina, policatiões, proteínas,  $\text{CaPO}_4$  ou espermidina. Ver e. g., o pedido PCT WO94/01139 e as referências citadas acima. As composições de péptido/polipéptido e os genes ou as moléculas sintéticos são capazes de promover uma resposta imunitária *in vivo* capaz de interditar várias (e. g., mais de cerca de 95, a cerca de 99%) variantes extracelulares conhecidas da proteína Tat do HIV-1 e, deste modo, baixar os níveis virais, num mamífero hospedeiro imunizado, e. g., um humano.

Ainda uma outra composição farmacêutica, útil para prejudicar a multiplicação do HIV-1 compreende uma composição de anticorpo contendo um ou mais dos anticorpos descritos detalhadamente acima. Numa composição farmacêutica, os

anticorpos podem ser transportados numa solução de soro fisiológico ou em outro veículo adequado. As composições de anticorpo são capazes de proporcionar uma interdição da Tat, imediata, fornecida exogenamente.

A presente invenção não é limitada pela selecção dos adjuvantes, veículos ou outros ingredientes, convencionais, fisiologicamente aceitáveis, úteis em preparações farmacêuticas dos tipos descritos acima. A preparação destas composições farmacêuticamente aceitáveis, a partir dos componentes acima descritos, tendo pH, isotonicidade, estabilidade e outras características convencionais adequadas, encontra-se dentro da especialidade da técnica.

#### *K. Método da invenção - Impedimento da Multiplicação do HIV-1*

De acordo com a presente invenção, um método para reduzir os níveis virais do HIV-1 envolve a exposição de um humano às composições farmacêuticas indutoras de anticorpos contra a Tat, descritas acima, induzindo activamente anticorpos que reagem com várias proteínas Tat do HIV-1 (e. g., mais de 95%, de um modo preferido, mais de 99% das conhecidas) e impedindo a multiplicação do vírus *in vivo*. Este método é adequado para um indivíduo infectado com HIV-1 o com um sistema imunitário competente ou para a imunização activa de um indivíduo não infectado. O método induz anticorpos que reagem com proteínas Tat do HIV-1, reduzem a multiplicação viral durante uma infecção aguda inicial com HIV-1 e minimizam a viremia crónica que leva à SIDA. Este método baixa, também, a multiplicação viral crónica em indivíduos infectados, minimizando, novamente, a progressão

para a SIDA. A utilização destes métodos pode controlar a infecção crónica com HIV-1, proporcionando um novo mecanismo de tratamento não sujeito ao desenvolvimento de resistência. Os anticorpos contra a Tat inibem a replicação das quase-espécies do HIV-1, independentemente da Tat que eles estão a produzir, uma vez que a proteína Tat extracelular a não está associada com a parte replicante do vírus. Deste modo, não existe qualquer mecanismo óbvio pelo qual os anticorpos contra a Tat possam produzir pressão selectiva para as variantes de fuga da Tat, não-reactivas.

De acordo com este método, as composições farmacêuticas, de um modo preferido, contêm as composições de péptidos/polipéptidos, os genes ou as moléculas sintéticos, o vírus recombinante ou a bactéria recombinante comensal. De um modo preferido, as composições contêm um gene sintético ou proteína de fusão heptavalente (sem a variante rara do Epitopo I) ou o gene sintético ou proteína de fusão octavalente do Exemplo 3 e, opcionalmente, um péptido do Epitopo II univalente. Cada um destes componentes activos da composição farmacêutica, induz, activamente, no humano exposto, a formação de anticorpos anti-Tat que bloqueiam a transferência da Tat, de células infectadas para outras células infectadas ou não infectadas. Esta acção reduz a multiplicidade da infecção e bloqueia a explosão da expansão viral do HIV-1 e, deste modo, baixa os níveis virais. Em doentes já infectados, este método de redução dos níveis virais pode reduzir a viremia crónica e a progressão para SIDA. Em humanos não infectados, esta administração das composições da invenção pode reduzir a infecção aguda e, deste modo, minimizar a viremia crónica que leva à progressão para SIDA.

Ainda um outro aspecto da invenção, consiste num método para reduzir os níveis virais do HIV-1, por administração de uma composição farmacêutica contendo as composições de anticorpo descritas acima, a um humano incapaz de estabelecer uma resposta imunitária eficaz ou rápida contra a infecção com HIV-1. O método pode envolver a administração crónica da composição. Entre esses doentes, adequados para o tratamento com este método encontram-se os doentes infectados com HIV-1 que estão imunocomprometidos pela doença e incapazes de estabelecer uma resposta imunitária forte. Em etapas tardias da infecção com HIV, é menor a probabilidade de produzir títulos eficazes de anticorpos, devido ao enfraquecimento imunitário associado com a doença. Entre esses doentes encontram-se, também, mulheres grávidas infectadas com HIV-1, recém-nascidos de mães infectadas e doentes não imunizados com exposição putativa (e. g., um humano que foi inadvertidamente "picado" com uma agulha utilizada por um humano infectado com HIV-1).

Para esses doentes, o método da invenção utiliza, de um modo preferido, como composição farmacêutica, uma composição de anticorpo da invenção. A composição de anticorpo inclui uma composição de anticorpo policlonal preparada em outros mamíferos, de um modo preferido, humanos normais ou, alternativamente, as outras formas do anticorpo descrito acima, e. g., monoclonal, etc. Estas composições de anticorpo são administradas como imunoterapia passiva para inibir a multiplicação viral e baixar a carga viral. Os anticorpos exógenos que reagem com várias proteínas Tat do HIV-1 conhecidas proporcionam uma interdição imediata, no doente, da transferência da Tat, de células viralmente infectadas para outras células infectadas ou não infectadas. De acordo com este

método, o doente pode ser cronicamente tratado com a composição de anticorpo durante um regime de tratamento longo.

Em cada um dos métodos acima descritos, as composições da presente invenção são administradas por uma via adequada, e. g., pelas vias subcutânea, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, nasal ou inalação. A via de administração presentemente preferida é a intramuscular, para composições de imunização (indução activa) e intravenosa (i.v.), subcutânea (s.c.) ou intramuscular (i.m), para as composições de anticorpo (terapia passiva). De um modo preferido, é administrado um vector viral recombinante ou de ADN nu, intramuscularmente; no entanto, podem ser distribuídas oralmente outros determinados vectores virais recombinantes e/ou bactérias comensais vivas.

A quantidade de sequências de proteína, péptido ou ácido nucleico da presente invenção, em cada dose de vacina, é seleccionada tendo em consideração a idade, peso, sexo, condição física geral do doente e semelhantes. A quantidade do componente activo requerido para induzir uma resposta imunitária, de um modo preferido, uma resposta protectora ou produzir um efeito exógeno no doente, sem efeitos secundários adversos significativos, varia, dependendo da composição farmacêutica utilizada e da presença opcional de um adjuvante (para as composições contendo proteína).

Geralmente, para as composições contendo composição de proteína/péptido, proteína de fusão, MAP ou proteína ligada ou anticorpo, cada dose irá compreender entre cerca de 50 µg, a cerca de, 20 mg de imunogénios peptídicos/polipeptídicos por mL de uma solução estéril. Uma dosagem mais preferida pode consistir em, cerca de, 500 µg do imunogénio. Podem ser, também,

contempladas outras gamas de dosagem por um especialista na técnica. As doses iniciais podem ser, opcionalmente, seguidas por reforços repetidos, quando pretendido.

As composições de anticorpo da presente invenção podem ser utilizadas em tratamentos crónicos de indivíduos em risco de infecção aguda devido a infecção com agulhas ou materna. Uma frequência de dosagem para essas infecções "agudas" pode variar, de dosagens diárias, a uma ou duas vezes por semana, i.v., s.c. ou i.m., para uma duração de, cerca de, 6 semanas. As composições de anticorpo da presente invenção podem ser, também, utilizadas em tratamentos crónicos de doentes infectados ou doentes com HIV avançado. Em doentes infectados, a frequência da administração crónica pode variar de dosagens diárias a uma ou duas vezes por mês i.v., s.c. ou i.m. e pode depender da meia-vida do imunogénio (e. g., cerca de 7-21 dias). No entanto, é previsto que a duração do tratamento crónico desses doentes infectados seja um período indefinido, mas prolongado.

Alternativamente, as composições desta invenção podem ser concebidas para a administração directa de genes sintéticos ou das moléculas desta invenção como "ADN nu". Tal como para as composições imunogénicas de proteína, as quantidades de componentes nas composições de ADN e de vector e o modo de administração, e. g., injeção ou intranasal, podem ser seleccionados e ajustados por um especialista na técnica. De um modo geral, cada dose irá compreender entre, cerca de 50 µg, a cerca de 1 mg do ADN codificante do imunogénio por mL de uma solução estéril.

Para vírus recombinantes contendo os genes ou moléculas sintéticos, as doses podem variar de cerca de 20, a cerca de 50 mL de solução de soro fisiológico, contendo concentrações de cerca de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^{10}$  pfu/mL de vírus recombinante da presente invenção. Uma dosagem humana preferida consiste em, cerca de, 20 mL de solução de soro fisiológico nas concentrações acima. No entanto, é entendido que um especialista na técnica pode alterar essas dosagens, dependendo da identidade do vírus recombinante e da constituição do imunogénio que este está a distribuir ao hospedeiro.

As quantidades das bactérias comensais contendo o gene ou moléculas sintéticos a serem distribuídos ao doente, irão variar, geralmente, entre cerca de  $10^3$ , a cerca de  $10^{12}$  células/kg. Estas dosagens podem ser alteradas por um especialista na técnica, dependendo da bactéria que é utilizada e da composição particular contendo o Epitopo I e os imunogénios opcionais que são distribuídos pela bactéria viva.

Deste modo, as composições desta invenção são concebidas para retardar ou minimizar a infecção de um mamífero não infectado, e. g., humano, pelo vírus seleccionado. Essas composições têm, deste modo, utilidade como vacinas. Os anticorpos anti-proteína Tat não são reactivos com as proteínas do HIV-1 utilizadas em ensaios de diagnóstico, para detectar a seroconversão após a infecção. Deste modo, os indivíduos tratados com as composições desta invenção não seriam enganados com falsos testes positivos para a infecção com HIV-1 e continuaria a ser possível detectar a seroconversão se os indivíduos tratados ficassem infectados com o HIV-1.



Fornecer a um mamífero as composições desta invenção, quer sob a forma de uma composição contendo proteína/péptido, quer pela administração de uma nova sequência de ácido nucleico codificando o imunogénio, proporciona uma estratégia radicalmente diferente para a vacinação para a SIDA, uma vez que esta permite o abaixamento dos níveis virais, pela interdição biológica, de um modo desejado, de mais de cerca de 95% e, de um modo preferido, de mais de cerca de 99% das variantes conhecidas da proteína Tat do HIV-1, fazendo baixar a multiplicação do HIV-1.

A utilização de composições contendo o imunogénio Tat, apresenta uma vantagem particularmente desejável, em contraste com outros tratamentos e métodos profilácticos, utilizados contra esses vírus. Uma vez que a interdição extracelular da proteína Tat inibe a multiplicação da totalidade das quase-espécies ou estirpes do HIV, indiscriminadamente, esta não cria uma pressão selectiva sobre o próprio vírus parental, para a selecção de variantes mutantes do vírus. Deste modo, o bloqueio da incorporação da proteína Tat pelas células do doente, não apenas reduz o nível da viremia, como o faz de uma forma que impede a selecção de "variantes de fuga".

Adicionalmente, a invenção compreende um método de tratar activamente indivíduos assintomáticos infectados com HIV-1, com viremia, uma vez que, durante o decurso da doença, a proteína Tat extracelular contribui, provavelmente, para a infecção persistente e anomalias imunitárias que estão presentes nesta etapa da infecção com o HIV-1. A interdição da proteína Tat extracelular por anticorpos induzidos pela imunização de acordo com esta invenção, pode reduzir a viremia com um controlo

imunitário mais eficaz e resultar no atraso ou na prevenção da progressão para a SIDA.

O mecanismo da presente invenção como descrito acima é útil para prejudicar o decurso da infecção viral e produzir resultados clínicos desejáveis. Mais especificamente, as composições desta invenção são capazes de reduzir a viremia em doentes já infectados com o vírus, bloqueando a incorporação adicional da proteína Tat por células não infectadas. É previsto que as composições da presente invenção, utilizadas isoladas ou em conjunto com outros regimes terapêuticos para doentes infectados com HIV, auxiliem na redução da viremia e na prevenção da decadência clínica.

Para essas utilizações terapêuticas, as formulações e os modos de administração são substancialmente idênticos aos descritos especificamente acima e podem ser administrados ao mesmo tempo ou simultaneamente com outras terapias convencionais para a infecção viral específica. Para a utilização terapêutica ou utilização profiláctica, podem ser desejáveis dosagens repetidas das composições de imunização, tais como um reforço anual ou um reforço em outros intervalos.

#### *L. Kits de Diagnóstico desta Invenção*

Os péptidos e os polipéptidos descritos acima podem ser, também, utilizados como reagentes de um kit útil para a medição e detecção de títulos e especificidade dos anticorpos induzidos pela vacinação com as composições descritas acima. O kit da invenção pode incluir, pelo menos, os dois péptidos do Epitopo I requeridos, identificados acima e, de um modo preferido, dois ou

mais dos imunogénios do Epitopo I reconhecidos por primatas e opcionais. Numa forma de realização, cada péptido tem no seu terminal N a proteína biotina e um espaçador, e. g., -Ser-Gly-Ser-Gly- [SEQ ID N°: 27]. Alternativamente, o péptido pode ter no seu terminal C um espaçador, e. g., -Gly-Ser-Gly-Ser [SEQ ID N°: 39] e a proteína biocitina. Estas formas de realização permitem aos péptidos serem ligados a um suporte sólido revestido com avidina, e. g., uma placa ou esferas. Podem ser, também, utilizados outros agentes de ligação conhecidos dos especialistas na técnica do ensaio de diagnóstico, para os mesmos objectivos. No kit, são, também, fornecidos reagentes marcados que detectam a ligação do anticorpo aos péptidos do Epitopo imobilizados, tais como uma imunoglobulina de cabra anti-humana ou semelhante. A marcação do reagente pode ser seleccionada de muitas marcações de diagnóstico conhecidas, tais como compostos radioactivos, compostos fluorescentes e proteínas, enzimas colorimétricas, etc. Deste modo, o kit contém, também, diversos reagentes e aparelhos para ler as marcações, e. g., determinados substratos que interagem com uma marcação enzimática, para produzir um sinal colorido, etc., aparelhos para recolher amostras de sangue, assim como frascos adequados e outros componentes do ensaio de diagnóstico. Um especialista na técnica pode, também, seleccionar facilmente outros componentes de diagnóstico convencionais para este kit.

Esses kits e reagentes podem ser utilizados num método para detectar os títulos e os padrões de reactividade de anticorpos em indivíduos vacinados com as composições desta invenção. Um método para determinar a presença e ou o título de anticorpos induzidos pela imunização com um imunogénio Tat, inclui os passos de fazer contactar uma amostra biológica de um indivíduo imunizado, e. g., um fluido corporal, de um modo preferido,

sangue, soro ou plasma, mas, também, possivelmente, urina, saliva e outros fluidos ou tecidos, com uma ou mais das sequências de ligação do Epitopo I reconhecido por primatas e imunogénios opcionais, de um modo preferido, immobilizadas num suporte sólido, tal como uma placa ou esferas. O Epitopo I reconhecido por primatas e as sequências de ligação opcionais utilizadas neste método podem consistir nas regiões de ligação do epitopo mínimo não modificado.

Logo que a amostra biológica é exposta aos péptidos immobilizados durante um tempo suficiente, o suporte é lavado para eliminar qualquer material da amostra biológica que não esteja ligado aos péptidos. Esses passos de lavagem são convencionais em ensaios de diagnóstico e são realizados com soro fisiológico. Se os anticorpos contra os imunogénios dos Epitopos I e opcionais ou uma sua combinação, foram induzidos no indivíduo pelo tratamento acima descrito, os péptidos immobilizados ligaram-se ao anticorpo da amostra biológica. Depois disso, é adicionado um reagente marcado ao material no suporte, para detectar a ligação entre os péptidos no suporte sólido e o anticorpo na referida amostra biológica. De um modo preferido, esse reagente é uma imunoglobulina anti-humana, tal como uma imunoglobulina de cabra anti-humana. A marcação é seleccionada de entre uma ampla gama de marcações de diagnóstico utilizadas convencionalmente, como discutido acima. Numa forma de realização, a marcação pode ser uma enzima colorimétrica, a qual, após contacto com um substrato, produz um sinal colorido detectável. A presença e/ou a intensidade da cor proporcionam indícios da indução do anticorpo no indivíduo tratado. Este ensaio pode ser utilizado para determinar a eficácia da imunização, assim como para monitorizar o estado imunitário de um doente.

A selecção de passos de ensaio particulares, assim como dos vários sistemas de marcação detectáveis, encontra-se bem dentro da especialidade da técnica. Essa selecção é de rotina e não limita a presente invenção.

#### *M. Vantagens da Invenção*

Uma das vantagens das composições desta invenção consiste no pequeno número de imunogénios requeridos para a inclusão numa composição desta invenção para inter-reagir com mais de 95 a mais de 99% das variantes conhecidas da proteína Tat do HIV-1 do subtipo B comum. Como ilustrado nos exemplos abaixo, a composição imunogénica de Epitopo I reconhecido por primatas, contendo as duas sequências de aminoácidos do Epitopo I reconhecido por primatas, requeridas, assim como seis sequências adicionais do Epitopo I, inter-reagem com 95% das proteínas Tat do HIV-1 do subtipo B comum, assim como com a totalidade das 56 sequências da proteína Tat dos subtipos do HIV-1 não-B, menos frequentes. Deste modo, pode ser utilizada uma composição única, de um modo útil, na protecção contra ou no tratamento de infecção causada pela grande maioria das estirpes do HIV-1 que podem ser encontradas.

Para além disso, tendo sido identificados os epitopos precisos da Tat contra os quais é pretendida a ligação (*i. e.*, AAS-12 da SEQ ID N°: 15), podem ser facilmente identificados e incluídos nas composições, novos imunogénios peptídicos da Tat, desejáveis, a partir de estirpes do HIV-1 de ocorrência recente ou estirpes recentemente descobertas, utilizando os métodos aqui descritos. Esta flexibilidade permite às composições desta

invenção serem profilaticamente úteis contra qualquer nova estirpe ou estirpes do HIV-1 identificadas no futuro. Tendo em perspectiva os presentes ensinamentos, é esperado que um especialista na técnica seja facilmente capaz de incorporar novas combinações de imunogénios da Tat (e as construções de ácido nucleico que as codificam) nas composições.

Por exemplo, a utilização de técnicas convencionais, tais como PCR e séries de oligonucleótidos de elevada densidade [M. J. Kozal *et al.*, *Nature Med.*, **2**: 753 (1996)] permite que um especialista na técnica obtenha as sequências de aminoácidos de uma grande série de proteínas Tat do HIV-1, representando variantes de isolados clínicos de estirpes e subtipos do HIV-1. A utilização dessas técnicas permite a determinação de outras variantes do subtipo B do HIV-1 assim como de outros subtipos em países subdesenvolvidos, que não foram tão intensivamente estudados até à data. A determinação de novas sequências da Tat irá permitir a rápida inclusão dos péptidos correspondentes, como imunogénios em composições desta invenção, permitindo a indução de uma resposta de anticorpo contra outras proteínas Tat do HIV-1 raras.

Os estudos de inter-reactividade com anticorpos desenvolvidos contra péptidos sintéticos, correspondentes a cada variante da Tat, podem ser utilizados para eliminar a necessidade de imunização com variantes da Tat, nas quais as alterações da sequência são imunologicamente silenciosas, pelo facto destes péptidos estarem fortemente ligados por anticorpos à sequência de consenso ou a outras variantes. Os exemplos seguintes ilustram métodos preferidos para preparar as composições da invenção e para utilizar estas composições para induzir anticorpos contra as proteínas Tat do vírus, num

hospedeiro imunizado. Estes exemplos são apenas ilustrativos e não limitam o âmbito da invenção, o qual é definido pelas reivindicações.

EXEMPLO 1 - ESTUDOS IMUNOLÓGICOS DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS MÍNIMAS DA PROTEÍNA TAT, NECESSÁRIAS PARA A LIGAÇÃO A UM ANTICORPO CONTRA O EPITOPO I RECONHECIDO PELOS PRIMATAS, EM VARIAÇÕES DA SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA TAT DO HIV-1 E INTER-REACTIVIDADES IMUNOLÓGICAS DE ANTI-SOROS COM ESTAS SEQUÊNCIAS

*A. Péptido Sintético e Conjugados*

Os péptidos sintéticos foram sintetizados por síntese em fase sólida em suportes de polietileno derivatizado [R. M. Valerio *et al.*, *Int. J. Peptide Res.*, **44**: 158-165 (1994)]. Os péptidos imunizantes foram sintetizados, sendo incorporada uma Cys no terminal amino, para facilitar a ligação a uma proteína veículo e com um terminal C amidado. Os péptidos detectores foram sintetizados com uma sequência biotina-Ser-Gly-Ser-Gly [SEQ ID N°: 27] no terminal amino e uma função de ácido livre no terminal C, para utilização em ensaios de ELISA, para a detecção de reactividade e inter-actividade. Os péptidos imunizantes, conjugados covalentemente com a proteína veículo do toxóide da difteria (DT), através da cadeia secundária do cisteínico, com uma proporção péptido-veículo de 5-8 [A. C. J. Lee *et al.*, *Molec. Immunol.*, **17**: 749 (1980)], foram purificados por cromatografia líquida de elevada pressão (HPLC), até uma pureza superior a 95% por HPLC analítico e espectrometria de massa, sendo utilizados péptidos detectores numa pureza superior a 50%.

## B. Imunizações

Os conjugados de péptido foram retomados em água purificada e emulsionados 1:1 com o adjuvante de Freund completo (CFA) ou com o adjuvante de Freund incompleto (IFA) [ANTIBODIES-A LABORATORY MANUAL, Eds. E. Harlow e P. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1998)]. O volume total por primata foi de 1 mL e este continha 100 µg do péptido ligado ao DT.

Os macacos rhesus que participaram num estudo de desafio viral foram imunizados com o antigénio em IFA/CFA, como se segue. Foram utilizados vários primatas para o péptido imunizante, com a injeção intramuscular (IM), inicial, com conjugado em CFA e um reforço IM subsequente às 2 semanas, com conjugado em IFA. Foi realizada uma pré-recolha de sangue antes da primeira injeção e foram realizadas maiores recolhas de sangue, 3 e 5 semanas após a injeção de reforço.

## C. Títulos ELISA

Os ensaios ELISA foram realizados como descrito por H.M. Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3998 (1983). O título de anticorpo foi o inverso da diluição de soro que resultou numa absorvência de 1,0 unidades de DO acima do fundo. Para cada resposta, foi calculado título médio geométrico (GMT) para 2-3 soros ou estavam apenas disponíveis soros únicos para algumas imunizações de macacos.

Os resultados de ELISA para este ensaio em coelhos vs. macacos são apresentados, respectivamente, nas Figs. 1A e 1B. Os resultados de ELISA demonstraram que os anticorpos de primata



contra o imunogénio, incorporando o Epitopo I, estavam a reagir com a sequência -Asp-Pro-Arg<sub>7</sub>-Leu-Glu<sub>9</sub>-Pro-Trp-Lys<sub>12</sub>- [AA5-12 da SEQ ID N°: 15]. Como discutido abaixo, as posições 7, 9 e 12 representam variantes comuns deste péptido do Epitopo I reconhecido por primatas.

#### *D. Análise da diversidade de sequências de aminoácido dentro dos epitopos*

As sequências do primeiro exão da Tat do HIV 1 foram obtidas da base de dados GenBank e Los Alamos Human Retroviruses and AIDS [*HUMAN RETROVIRUSES and AIDS* 1996, publicado pelo Theoretical Biology and Biophysics Group of the Los Alamos National Laboratory, NM e as sequências adicionais foram gentilmente obtidas do GenBank por Esther Guzman do Los Alamos National Laboratory]. As sequências incompletas e as sequências com codões de terminação ou eliminações de bases originando um deslocamento da grelha de leitura foram eliminadas, assim como as sequências com repetições obviamente idênticas do mesmo isolamento. As variações de aminoácidos nas posições dentro dos epitopos foram registadas e colocadas em tabelas.

#### *E. Inter-Reactividades Antigénicas Entre Variantes*

Os anti-soros contra a sequência de consenso do epitopo foram titulados por ELISA, contra a sequência de consenso e contra sequências com variantes de aminoácido comuns, para determinar os efeitos dos polimorfismos de aminoácido sobre antigenicidade.

*F. Variações em sequências*

As sequências de consenso do Epitopo I reconhecido por primatas foram avaliadas para frequência máxima e reconhecimento por anticorpos de primata. Foram avaliadas a conservação antigénica e de sequência nas proteínas Tat do HIV-I de 294 das proteínas Tat do HIV-1 de 294 vírus do grupo B (I) e de 56 vírus do grupo não-B (II), para os epitopos e os resultados foram colocados nas Tabelas II a VI, abaixo.

A fila superior das Tabelas II e III indica a sequência de consenso para a frequência máxima. As filas intermédias contêm a incidência percentual de aminoácidos encontrados em mais de 5% das sequências em cada posição, se forem vários. A fila inferior de cada tabela corresponde à incidência total, incluindo aminoácidos que ocorrem em mais de 5% das sequências, se forem vários. Todas estas selecções na Tabela II e todas as selecções na Tabela III, excepto as entradas sob o aminoácido 4, criam epitopos antigenicamente distintos (inter-reactividade <25%).

Tabela II

| Epitopo I - 294 grupos B |             |                        |                        |                        |                        |                         |                         |                         |
|--------------------------|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Val<sub>4</sub></b>   | <b>Asps</b> | <b>Pro<sub>6</sub></b> | <b>Arg<sub>7</sub></b> | <b>Leu<sub>8</sub></b> | <b>Glu<sub>9</sub></b> | <b>Pro<sub>10</sub></b> | <b>Trp<sub>11</sub></b> | <b>Lys<sub>12</sub></b> |
|                          |             |                        | Arg (73)               |                        |                        |                         |                         | Lys (96)                |
|                          |             |                        | Lys (12)               |                        |                        |                         |                         | Asn (2)                 |
|                          |             |                        | Ser (11)               |                        |                        |                         |                         |                         |
|                          |             |                        | Asn (4)                |                        |                        |                         |                         |                         |
| 100%                     | 98%         | 100%                   | 100%                   | 100%                   | 100%                   | 100%                    | 100%                    | 100%                    |

Tabela III

| Epitopo I - 56 Grupos não-B |                  |                  |                  |                  |                  |                   |                   |                   |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Val <sub>4</sub>            | Asp <sub>5</sub> | Pro <sub>6</sub> | Asn <sub>7</sub> | Leu <sub>8</sub> | Glu <sub>9</sub> | Pro <sub>10</sub> | Trp <sub>11</sub> | Asn <sub>12</sub> |
| Val (89)                    |                  |                  | Asn (79)         |                  | Glu (86)         |                   |                   | Asn (87)          |
| Ile (11)                    |                  |                  | Lys (14)         |                  | Asp (14)         |                   |                   | Lys (13)          |
|                             |                  |                  | Ser (5)          |                  |                  |                   |                   |                   |
| 100%                        | 100%             | 100%             | 98%              | 96%              | 100%             | 98%               | 100%              | 100%              |

Como apresentado nas Tabelas II e III, o Epitopo I reconhecido por primatas tem um polimorfismo antigênico potencial de 16 vezes, mas existe um antígeno principal para os grupos B e existe outro antígeno principal para os grupos não-B. Cinco outras variantes correspondem a mais de 95% das variantes da Tat conhecidas. Ver as Tabelas IV e V; as sequências indicadas com um asterisco estão representadas tanto nos grupos B como não-B.

Tabela VI - Grupos B (294 sequências)

| Sequência do epitopo de primata | SEQ ID N <sup>os</sup>                  | Incidência | Incidência Percentual |
|---------------------------------|---|------------|-----------------------|
| ValAspProArgLeuGluProTrpLys     | AA4-12 da SEQ ID N <sup>o</sup> : 15    | 220        | 75                    |
| ValAspProLysLeuGluProTrpLys*    | AA185-193 da SEQ ID N <sup>o</sup> : 12 | 35         | 12                    |
| ValAspProSerLeuGluProTrpLys     | AA120-127 da SEQ ID N <sup>o</sup> : 12 | 20         | 7                     |

(continuação)

| <b>Sequência do epitopo de primata</b> | <b>SEQ ID N°S</b>        | <b>Incidência</b> | <b>Incidência Percentual</b> |
|--|--------------------------|-------------------|------------------------------|
| ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*           | AA55-63 da SEQ ID N°: 12 | 7                 | 2                            |
|  |                          | Total: 282        | Total: 96                    |
| ValAspProArgLeuGluProTrpAsn            | 28                       | 1                 | <1                           |

Tabela V - Grupos não-B (56 sequências)

| <b>Sequência do epitopo de primata</b> | <b>SEQ ID N°S</b>          | <b>Incidência</b> | <b>Incidência Percentual</b> |
|--|----------------------------|-------------------|------------------------------|
| ValAspProAsnLeuGluProTrpAsn            | AA227-235 da SEQ ID N°: 13 | 36                | 64                           |
| ValAspProLysLeuGluProTrpAsn            | AA344-352 da SEQ ID N°: 13 | 8                 | 14                           |
| ValAspProAsnLeuAspProTrpAsn            | 29                         | 6                 | 11                           |
| ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*           | AA55-63 da SEQ ID N°: 13   | 3                 | 5                            |
| ValAspProLysLeuGluProTrpLys*           | AA185-193 da SEQ ID N°: 12 | 1                 | 2                            |
|  |                            | Total: 53         | Total: 95                    |
| ValAspProSerLeuGluProTrpAsn            | AA279-287 da SEQ ID N°: 13 | 1                 | 2                            |
| ValAspProSerLeuAspProTrpAsn            | 30                         | 1                 | 2                            |
| ValAspProAsnLeuAspProTrpLys            | 31                         | 1                 | 2                            |

A Tabela VI mostra a baixa inter-reactividade antigénica das variantes da posição 7 do Epitopo I, a distinção antigénica das variantes da posição 9 e a extrema ausência de

inter-reactividade de anti-soros contra GluProValAspProAsn<sub>7</sub>LeuGlu<sub>9</sub>ProTrpAsn<sub>12</sub> [AA225-235 da SEQ ID N°: 13], com variantes contendo GluProValAspProArg<sub>7</sub>LeuGlu<sub>9</sub>ProTrpLys<sub>12</sub> [AA 2-12 de SEQ ID N°: 15], em ambas as posições 7 e 12. Esta mostra, também, a distinção antigénica das variantes Glu<sub>9</sub> e Asp<sub>9</sub>.

Tabela VI - Reactividade por ELISA de anti-soros de macaco contra Imunogénios do Epitopo I sobre péptidos Detectores com Variações nas posições de aminoácido 7, 9 e 12 da Tat

| Sequência do imunogénio do epitopo   | Título da sequência do epitopo do péptido detector (% de título do mesmo péptido)  |   |  |  |
|--|--|---|--|--|
| GluProVal<br>AspProAsn <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro<br>TrpLys <sub>12</sub><br>[AA53-63 da SEQ ID N°: 12]   | GluProVal<br>AspProAsn <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro<br>TrpLys <sub>12</sub><br>[AA53-63 da SEQ ID N°: 12]<br>119000 (100)   | GluProVal<br>AspProArg <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub><br>[AA2-12 da SEQ ID N°: 15]<br>25000 (21)  | GluProVal<br>AspProLys <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro<br>TrpLys <sub>12</sub><br>[AA183-193 da SEQ ID N°: 12]<br>24000 (20) | GluProVal<br>AspProSer <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro<br>TrpLys <sub>12</sub><br>[AA105-115 da SEQ ID N°: 12]<br>24000 (20) |
| GluProVal<br>AspProAsn <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro<br>TrpAsn <sub>12</sub><br>[AA225-235 da SEQ ID N°: 13] | GluProVal<br>AspProAsn <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro<br>TrpAsn <sub>12</sub><br>[AA225-235 da SEQ ID N°: 13]<br>157000 (100) | GluProVal<br>AspProAsn <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub><br>[AA53-63 da SEQ ID N°: 12]<br>23000 (15) | GluProVal<br>AspProArg <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro<br>TrpLys <sub>12</sub><br>[AA2-12 da SEQ ID N°: 15]<br>2000 (1)      |  |
| GluProVal<br>AspProAsn<br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro<br>TrpLys <sub>12</sub><br>[AA53-63 da SEQ ID N°: 12]                | GluProVal<br>AspProAsn <sub>7</sub><br>LeuGlu <sub>9</sub> Pro<br>TrpLys <sub>12</sub><br>[AA53-63 da SEQ ID N°: 12]<br>163000 (100)   | GluProVal<br>AspProAsn <sub>7</sub><br>LeuAsp <sub>9</sub> Pro<br>TrpLys <sub>12</sub><br>[SEQ ID N°: 32]<br>6000 (4)           |  |  |

EXEMPLO 2 - ESTUDOS IMUNOLÓGICOS DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS MÍNIMAS DA PROTEÍNA TAT, NECESSÁRIAS PARA LIGAÇÃO A ANTICORPO CONTRA O EPITOPO II RECONHECIDO PELOS PRIMATAS NA PROTEÍNA TAT DO HIV-1. VARIAÇÕES DE SEQUÊNCIA. E INTER-REACTIVIDADES IMUNOLÓGICAS DE ANTI-SOROS CONTRA ESTAS SEQUÊNCIAS (Comparativo)

Foi determinada a incidência da variação da sequência de aminoácido, para as 294 sequências do grupo B e 56 do grupo não-B, da Tat do HIV-1, dentro dos limites do Epitopo II da ligação de anticorpo em macacos, utilizando os mesmos procedimentos delineados no Exemplo 1. Os resultados são apresentados nas Tabelas VII e VIII. As filas superiores das tabelas contêm a sequência de consenso. As filas intermédias contêm a incidência percentual de aminoácidos encontrados em mais de 5% das sequências, em cada posição, se forem vários. A fila inferior mostra a incidência total, incluindo aminoácidos ocorrendo em mais de 5% das sequências, se forem vários. As variantes de aminoácido na posição 42 da Tat eram antigenicamente inter-reactivas.

Tabela VII

| Epitopo II - 294 grupos B |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Lys<sub>41</sub></b>   | <b>Gly<sub>42</sub></b> | <b>Leu<sub>43</sub></b> | <b>Gly<sub>44</sub></b> | <b>Ile<sub>45</sub></b> | <b>Ser<sub>46</sub></b> | <b>Tyr<sub>47</sub></b> | <b>Gly<sub>48</sub></b> | <b>Arg<sub>49</sub></b> | <b>Lys<sub>50</sub></b> |
|                           | Gly (72)                |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |
|                           | Ala (28)                |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |
| 100%                      | 100%                    | 99%                     | 99%                     | 100%                    | 98%                     | 99%                     | 100%                    | 99%                     | 100%                    |

Tabela VIII

| Epitopo II - 56 Grupos não-B |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Lys<sub>41</sub></b>      | <b>Gly<sub>42</sub></b> | <b>Leu<sub>43</sub></b> | <b>Gly<sub>44</sub></b> | <b>Ile<sub>45</sub></b> | <b>Ser<sub>46</sub></b> | <b>Tyr<sub>47</sub></b> | <b>Gly<sub>48</sub></b> | <b>Arg<sub>49</sub></b> | <b>Lys<sub>50</sub></b> |
| 100%                         | 100%                    | 100%                    | 99%                     | 100%                    | 95%                     | 100%                    | 100%                    | 98%                     | 100%                    |

Como divulgado nas Tabelas VII e VIII, o Epitopo II apresenta conservação antigénica quase completa.

Foi medida a reactividade por ELISA dos anti-soros de macaco com o imunogénio do Epitopo II em péptidos detectores com TatGly<sub>42</sub> ou Ala<sub>42</sub> (variante), dentro das sequências detectoras, que está descrita na Tabela IX abaixo. Ver as Figs. 2A e 2B para, respectivamente, uma comparação gráfica dos resultados em coelhos vs. macacos.

Tabela IX

| Sequência do epitopo imunogénico                             | Título da sequência do péptido Detector (% do título no mesmo péptido)       |  |
|--|--|--|
| LysGlyLeuGlyIleSerTyrGlyArgLys<br>[AA41-50 da SEQ ID N°: 15] | LysGlyLeuGlyIleSerTyrGlyArgLys<br>[AA41-50 da SEQ ID N°: 15]<br>25000 (100%) | LysAlaLeuGlyIleSerTyrGlyArgLys<br>[SEQ ID N°: 33]<br>19000 (76%) |

### EXEMPLO 3 DESENVOLVIMENTO DE TRATAMENTO COM ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO PARA INFECÇÕES ASSINTOMÁTICAS COM HIV-1

São imunizados murganhos de anticorpos humanizados, comercialmente disponíveis, com uma quantidade adequada do imunogénio do Epitopo II: Cys-Gly-Ser-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-

Tyr-Gly-Arg-Lys-amida [SEQ ID N°: 34] ligado à proteína veículo do toxóide de difteria. Os hibridomas são sujeitos a rastreio sobre biotina-Ser-Gly-Ser-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-OH [SEQ ID N°: 35] em placas revestidas com estreptavidina e é seleccionado um anticorpo monoclonal IgG com afinidade de ligação subnanomolar e sem ligação a receptores complementares. A especificidade é confirmada sobre a proteína Tat do HIV-1 recombinante.

Uma vez que o anticorpo monoclonal é dirigido contra um antígeno não próprio, é previsível um ensaio pré-clínico convencional de produção, purificação e segurança. Os anticorpos monoclonais humanos têm uma meia-vida de 20 dias no homem vs. a meia-vida de 18 horas do OKT3, um anticorpo monoclonal de murganho que é extensamente consumido em CD3 internas. Doses diárias de 5 mg de OKT3 mantêm níveis de declínio de cerca de 1 micrograma/mL no homem. Deste modo, é previsível que uma dose bissemanal de 5 mg de anticorpo monoclonal anti-Tat seja suficiente para manter níveis de declínio semelhantes, um excesso molar cinquenta vezes superior, em relação aos níveis circulantes máximos previstos de até 1 ng/mL para a proteína Tat do HIV-1, em indivíduos infectados.

O controlo das cargas virais do plasma é, presentemente, um critério aceite da eficácia do tratamento do HIV-1. A eficácia de um anticorpo monoclonal anti-Tat pode ser rapidamente determinada em indivíduos assintomáticos infectados com HIV-1, inicialmente com um período de tempo de quatro semanas de tratamento. Este protocolo é útil em doentes não tratados, em doentes que, por várias razões, não tiveram sucesso em protocolos de HAART ou em doentes controlados por terapia HAART, com a remoção desta terapia durante 4 semanas (aumento rápido



das cargas virais se a HAART for interrompida). Uma redução de 2 a 3 log das cargas virais do plasma, até abaixo do LOD (50 cópias de ARN viral/mL) suportam a monoterapia com o anticorpo monoclonal, a qual é avaliada ao longo de um maior período de tempo. A redução superior a um log (90%), mas não abaixo do LOD, sugere a utilização do anticorpo monoclonal como um componente em terapia.

#### EXEMPLO 4 - DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA UNIVERSAL PARA IMPEDIR A PROGRESSÃO DA SIDA EM INDIVÍDUOS

##### *A. Construção de um Gene Sintético*

A Fig. 3A ilustra um gene sintético codificando quatro cópias de cada um dos quatro polimorfismos do Epitopo I, detectados para a resposta de anticorpo do coelho, mais quatro cópias do Epitopo II, expresso em *E. coli* como uma proteína de fusão linear com a DnaK (HSP70) de *E. coli*. Esta proteína expressa continha todos os epitopos antigénicos quando testada por ELISA, com anti-soros de coelho específicos para o epitopo. No entanto, quando utilizado para imunizar coelhos ou macacos, todas as variantes do Epitopo I eram imunogénicas, mas não as do Epitopo II. Deste modo, o Epitopo II é melhor utilizado como um péptido sintético conjugado ligado a uma proteína veículo adequada.

A Fig. 3B ilustra um novo gene sintético octavalente construído para incorporar oito polimorfismos do Epitopo I reconhecido por primatas na grelha de leitura correcta, baseados no polimorfismo dentro dos limites do Epitopo I reconhecidos em primatas:

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID N°: 17]

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID N°: 19]

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID N°: 22]

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID N°: 20]

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID N°: 24]

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID N°: 21]

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID N°: 18] e

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID N°: 23]

As sequências do Epitopo I são separadas por espaçadores dipeptídicos contendo resíduos de Gly e/ou Ser. O gene é montado como descrito em W.P.C. Stemmer *et al.*, *Gene*, **164**: 49 (1995). Resumidamente, são sintetizadas sobreposições de oligonucleótidos 60-meros (oligos) da cadeia superior e oligos da cadeia inferior com 20 nucleótidos (nt), juntamente com dois 50-meros na extremidade. Os 60-meros são incubados em conjunto, sob condições de hibridação e é utilizada a reacção em cadeia da polimerase (PCR) para preencher a sequência e amplificá-la. A extremidade com 50-meros é, então, adicionada e a montagem é concluída por PCR, com o isolamento da totalidade do gene em gel de agarose. O gene é sequenciado e confirmado que tem a sequência correcta dentro dos epitopos efectivos. Pode ser construído um gene heptavalente semelhante, eliminando a

variante rara R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2  
[SEQ ID N°: 24].

### *B. Expressão da Proteína de Fusão*

Este gene descrito acima é, então, excisado com enzimas de restrição e inserido num vector de expressão adequado, contendo a sequência para o toxóide da difteria (HSP70), na grelha de leitura correcta. São transfectadas *E. coli* e são isoladas as colónias expressando a proteína. As colónias isoladas são cultivadas e é induzida a expressão. É identificada a proteína proveniente de colónias expressando a proteína de fusão. A proteína resultante é purificada utilizando métodos convencionais.

A Fig. 3C ilustra um imunogénio do Epitopo II monovalente, opcionalmente preparado como um conjugado do péptido sintético com uma proteína veículo tal como o toxóide da difteria, utilizando técnicas semelhantes.

### *C Ensaios para Avaliar a Expressão dos Epitopos, Correctamente na Proteína de Fusão e a Eficácia na Indução de Anticorpos Anti-Tat*

São construídas quatro variantes de Epitopos I, em que Y<sub>7</sub> é Arg, Asn, Lys ou Ser e X<sub>9</sub> é Glu e Z<sub>12</sub> é Lys e ambas as variantes do Epitopo II, num gene sintético e são expressas como uma proteína de fusão, como descrito nos parágrafos A e B, acima. Para determinar se cada epitopo é expresso na proteína de fusão, sob uma forma que pode ser reconhecida por anti-soros de

primata, são testados por ELISA, anti-soros de primata, produzidos contra péptidos sintéticos correspondentes às sequências do Epitopo I, utilizando metodologia convencional. As placas são inicialmente directamente revestidas com a proteína de fusão e, seguidamente, expostas a 100 µg/mL de solução de anti-soros (e. g., anti-soros de coelho) que são conhecidos por serem reactivos com os Epitopos I e II. As sequências das variantes de epitopo são expressas numa conformação reconhecível por anticorpos contra os péptidos sintéticos correspondentes, como demonstrado por um título superior a 32000 para cada epitopo.

Para avaliar a imunogenicidade do imunogénio multivalente, os macacos foram imunizados com a proteína de fusão em IFA. Os anti-soros de macaco foram, então, avaliados para os péptidos sintéticos dos Epitopos I e II. Os títulos significativos desenvolvidos contra as variantes do Epitopo I, *i. e.*, título de 28000 para o Epitopo I, quando Y<sub>7</sub> é Arg e Z<sub>12</sub> é Lys; título de 16000 para o Epitopo I quando Y<sub>7</sub> é Asn e Z<sub>12</sub> é Lys; título de 37000 para o Epitopo I, quando Y<sub>7</sub> é Lys e Z<sub>12</sub> é Lys; e título de 4000 para o Epitopo I, quando Y<sub>7</sub> é Ser e Z<sub>12</sub> é Lys. O título para o Epitopo II foi de 700, indicando que este epitopo é melhor apresentado para a imunização sob a forma de um péptido sintético ligado a um veículo.

#### EXEMPLO 5. MÉTODO E KITS PARA DETECTAR TÍTULOS E ESPECIFICIDADES DE ANTICORPOS INDUZIDOS POR VACINAÇÃO

Para seguir o título e as especificidades de anticorpos induzidos após a imunização com as vacinas desta invenção, pode ser utilizado um método de ensaio. Numa forma de realização

desse ensaio, são utilizados péptidos contendo sequências do Epitopo I reconhecido por primatas, descritas no Exemplo 1 (dependendo da composição da vacina de imunização), para desenvolver kits de medição dos títulos e dos padrões de reactividade dos anticorpos, em indivíduos vacinados.

Estes péptidos são sintetizados com Biotina-Ser-Gly-Ser-Gly- [SEQID N°. 36] no terminal N. Cada péptido é revestido em placas separadas revestidas com avidina, com uma sequência -Ser-Gly-Ser-Gly- [SEQ ID N°: 27] servindo como um espaçador, para assegurar que a sequência peptídica relevante é exterior à bolsa de ligação à biotina da avidina. As placas são, então, incubadas com diluições do soro de teste, lavadas e a ligação do anticorpo é determinada com reagente contra a imunoglobulina humana, *e. g.*, imunoglobulina de cabra anti-humana, directamente marcada com enzima. É utilizado um reagente para reagir com a enzima e produzir um sinal colorimétrico (inserções do kit R&D).

Na descrição identificada acima, estão incluídas numerosas modificações e variações da presente invenção e é esperado que sejam óbvias para um especialista na técnica. É considerado que estas modificações e alterações às composições e processos da presente invenção estejam abrangidas no âmbito das reivindicações incluídas em anexo.

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Thymon L.L.C.

Goldstein, Gideon

<120> Métodos e Composições para Prejudicar a Multiplicação do HIV-1

<130> GGP3APCT

<150> US 09/561366

<151> 2000-04-28

<160> 39

<170> PatentIn versão 3.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 1

**Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg**  
**1 5**

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 2

**Gly Arg Gly Asp Ser Pro**  
**1 5**

<210> 3

<211> 6



<400> 4

**Val Asp Pro Xaa Leu Glu Pro**  
**1 5**

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Lys está, opcionalmente, modificado com um alquilo ou alcenoílo inferior

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa pode ser Gly ou Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Lys está, opcionalmente, amidado

<400> 5

**Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys**  
**1 5 10**

<210> 6

<211> 7



<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Arg está, opcionalmente, modificado com um alquilo ou alcanoílo inferior

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa pode ser Ala, Pro, Ser ou Gln

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa pode ser Pro ou His

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa pode ser Gln ou Pro

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa pode ser Asp, Asn, Gly ou Ser

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(7)..(7)

<223>Ser pode estar, opcionalmente, amidado

<400> 6

**Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ser**  
**1 5**

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Ser está, opcionalmente, modificado com um alquilo ou alcanóilo inferior

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa pode ser Asn ou Thr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa pode ser Ala ou Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223> Pro está, opcionalmente, amidado

<400> 7

**Ser Gln Xaa His Gln Xaa Ser Leu Ser Lys Gln Pro**  
**1 5 10**

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD RES

<222> (1)..(1)

<223> Asp está, opcionalmente, modificado com um alquilo ou alcanoílo inferior

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa pode ser Arg, Lys, Ser ou Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa pode ser Glu ou Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa pode ser Lys ou Asn e pode estar, opcionalmente, amidado

<400> 8

**Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa**  
**1 5**

<210>9

<211>8

<212>PRT

<213>Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa pode ser Arg, Lys, Ser ou Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa pode ser Glu ou Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa pode ser Lys ou Asn

<400> 9

**Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa**  
**1 5**

<210> 10



<400> 12

Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val  
1 5 10 15

Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg  
20 25 30

Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro  
35 40 45

Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly  
50 55 60

Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro  
65 70 75 80

Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro  
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu  
100 105 110

Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys  
115 120 125

Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu  
130 135 140

Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp  
145 150 155 160

Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu  
165 170 175

Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp  
180 185 190

Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser  
195 200 205

Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu  
210 215 220

Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser  
225 230 235 240

Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg  
245 250 255

Lys Ser Gly Ser  
260

<210> 13  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Glu está ligado a DnaK (HSP70)

<400> 13

```

Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val
1 5 10 15
Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg
20 25 30
Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro
35 40 45
Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly
50 55 60
Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro
65 70 75 80
Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
85 90 95
Asn Leu Glu Pro Trp Lys Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
100 105 110
Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu
115 120 125
Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys
130 135 140
Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu
145 150 155 160

```

Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp  
 165 170 175

Pro Asn Leu Ala Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu  
 180 185 190

Ala Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Ala Pro Trp  
 195 200 205

Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Ala Pro Trp Asn Gly Ser  
 210 215 220

Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val  
 225 230 235 240

Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn  
 245 250 255

Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro  
 260 265 270

Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly  
 275 280 285

Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro  
 290 295 300

Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro  
 305 310 315 320

Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu  
 325 330 335

Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn  
 340 345 350

Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu  
 355 360 365

Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser  
 370 375 380

<210> 14

<211> 13

<212> PRT









<223> Asn está, opcionalmente, amidado

<400> 18

**Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn**  
**1 5**

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Asp está, opcionalmente, modificado com um alquilo ou alcanóilo inferior

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys está, opcionalmente, amidado

<400> 19

**Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys**  
**1 5**

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Asp está, opcionalmente, modificado com um alquilo ou alcanóilo inferior

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys está, opcionalmente, amidado

<400> 20

**Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys**  
**1 5**

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Asp está, opcionalmente, modificado com um alquilo ou alcanóilo inferior

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys está, opcionalmente, amidado

<400> 21

**Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys**  
**1 5**



<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Asn está, opcionalmente, amidado

<400> 23

**Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Asn**  
**1 5**

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Asp está, opcionalmente, modificado com um alquilo ou alcanoílo inferior

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Asn está, opcionalmente, amidado

<400> 24

**Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn**  
**1 5**

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Lys pode estar, opcionalmente, modificado com um  
alquilo ou alcanóilo inferior

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa pode ser Gly ou Ala

<400> 25

**Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Gly Ser Gly Ser**  
**1 5 10**

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa pode ser Glu ou Asp

<400> 26

**Asp Pro Asn Leu Xaa Pro Trp Asn**  
**1 5**

<210> 27



<211> 4

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 27

**Ser Gly Ser Gly**  
**1**

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 28

**Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Asn**  
**1 5**

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 29

**Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Asn**  
**1 5**

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 30

**Val Asp Pro Ser Leu Asp Pro Trp Asn**  
**1 5**

<210> 31  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 31

**Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Lys**  
**1 5**

<210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 32

**Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Lys**  
**1 5 10**

<210> 33  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 33

**Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys**  
**1 5 10**

<210> 34  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1



<400> 36

**Ser Gly Ser Gly**  
**1**

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa pode ser Arg, Lys, Ser ou Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa pode ser Glu ou Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> Xaa pode ser Lys ou Asn e pode estar, opcionalmente, amidado

<400> 37

**Val Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa**  
**1 5**

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa pode ser Glu ou Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa pode ser Arg, Lys, Ser ou Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa pode ser Glu ou Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa pode ser Lys ou Asn e pode estar, opcionalmente, amidado

<400> 38

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Xaa</b> | <b>Pro</b> | <b>Val</b> | <b>Asp</b> | <b>Pro</b> | <b>Xaa</b> | <b>Leu</b> | <b>Xaa</b> | <b>Pro</b> | <b>Trp</b> | <b>Xaa</b> |
| <b>1</b>   |            |            |            | <b>5</b>   |            |            |            |            | <b>10</b>  |            |

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

<400> 39

**Gly Ser Gly Ser**  
**1**

Lisboa, 19 de Fevereiro de 2007

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo, pelo menos, duas variantes de um péptido ou polipéptido da fórmula

RI-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 SEQ ID N°: 8,

em que Y<sub>7</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Asn, Arg, Lys e Ser;

em que X<sub>9</sub> é Glu ou a Asp;

em que Z<sub>12</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Lys e Asn;

em que R1 é seleccionado do grupo consistindo em hidrogénio, um alquilo inferior, um alcanóilo inferior e uma sequência com entre 1, a cerca de, 5 aminoácidos, opcionalmente, substituída com um alquilo inferior ou alcanóilo inferior; e

em que R2 é seleccionado do grupo consistindo num hidroxilo livre, numa amida e numa sequência com um ou até cerca de 5 aminoácidos adicionais, opcionalmente, substituída com uma amida; e

em que em, pelo menos, uma das referidas variantes Y<sub>7</sub> é Asn e Z<sub>12</sub> é Asn e na outra Y<sub>7</sub> é Arg e Z<sub>12</sub> é Lys.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que para qualquer variante, R1 é Val.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que para qualquer variante, R1 é X<sub>2</sub>-Pro-Val, em que X<sub>2</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Glu e Asp.
4. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que para qualquer variante, R2 é -His-Pro-Gly-Ser, em que o referido terminal carboxilo está, opcionalmente, substituído com uma amida.
5. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que, pelo menos, uma variante referida é

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu Pro-Trp-Lys-R2 SEQ ID N°: 17,

e a outra variante referida é

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 SEQ ID N°: 18 e compreendendo uma ou mais sequências adicionais seleccionadas do grupo consistindo em:

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 SEQ ID N°: 19

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 SEQ ID N°: 22

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 SEQ ID N°: 20

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pm-Trp-Asn-R2 SEQ ID N°: 24

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2 SEQ ID N°: 23 e

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 SEQ ID N°: 21,



em que R1 é seleccionado do grupo consistindo em hidrogénio, um alquilo inferior, um alcanóilo inferior e uma sequência com entre 1, a cerca de, 5 aminoácidos, opcionalmente substituída com um alquilo inferior ou alcanóilo inferior; e

em que R2 é seleccionado do grupo consistindo num hidroxilo livre, numa amida e numa sequência com um ou até cerca de 5 aminoácidos adicionais, opcionalmente, substituída com uma amida.

6. Composição de acordo com a reivindicação 5, compreendendo, adicionalmente, pelo menos, sete das referidas sequências de aminoácidos.
7. Composição de acordo com a reivindicação 1, compreendendo, adicionalmente, pelo menos, um péptido ou polipéptido da fórmula

R3-Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R4 SEQ ID N°: 5,

em que X<sub>42</sub> é seleccionado do grupo consistindo em Gly ou Ala;

em que R3 é seleccionado do grupo consistindo em hidrogénio, um alquilo inferior, um alcanóilo inferior e uma sequência com entre 1, a cerca de, 5 aminoácidos, opcionalmente, substituída com um alquilo inferior ou alcanóilo inferior;

em que R4 é seleccionado do grupo consistindo num hidroxilo livre, numa amida e numa sequência com um ou até cerca de 5

aminoácidos adicionais, excluindo os aminoácidos básicos -Lys-Arg-Arg-, opcionalmente, substituída com uma amida.

8. Composição de acordo a reivindicação 1, obténível por vias sintéticas.
9. Composição de acordo a reivindicação 1, obténível por vias recombinantes.
10. Composição de acordo a reivindicação 1, em que um ou mais dos referidos péptidos são expressos como um péptido sintético ligado a uma proteína veículo.
11. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que um ou mais dos referidos péptidos são expressos como péptido antigénico múltiplo, opcionalmente, ligado a uma proteína veículo.
12. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que um ou mais dos péptidos seleccionados são expressos dentro de uma proteína produzida recombinantemente, opcionalmente, fundida com uma proteína veículo, na grelha de leitura correcta.
13. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 10 a 12, em que a referida proteína veículo é seleccionada do grupo consistindo numa proteína DnaK de *E. coli*, numa proteína GST, numa proteína de choque térmico micobacteriana 70, num toxóide da difteria, num toxóide do tétano, numa galactocinase, numa ubiquitina, num factor  $\alpha$  de conjugação, numa  $\beta$ -galactosidase e numa proteína de influenza NS-1.

14. Composição farmacêutica compreendendo uma composição de qualquer das reivindicações 1 a 13, um veículo farmacêuticamente aceitável e um adjuvante opcional.
15. Utilização de uma composição de qualquer das reivindicações 1 a 15, na preparação de um medicamento para tratar o HIV-1 num mamífero.
16. Método *in vitro* para determinar a presença e ou o título de anticorpos induzidos pela imunização contra um imunogénio da Tat, compreendendo:
  - (A) fazer contactar uma amostra biológica de um indivíduo imunizado, com uma composição de péptido ou polipéptido de qualquer das reivindicações 1 a 13, ligada a um suporte sólido;
  - (B) lavagem do referido suporte para eliminar qualquer material da referida amostra biológica que não esteja ligado às referidas sequências;
  - (C) fazer contactar o referido suporte com um reagente associado a uma marcação detectável, em que o referido reagente detecta a ligação entre as referidas sequências no referido suporte sólido e o anticorpo na referida amostra biológica e em que a referida marcação produz um sinal detectável.
17. Composição de anticorpo compreendendo anticorpos dirigidos contra os péptidos ou polipéptidos que formam as composições da reivindicação 1, compreendendo, a referida

composição, pelo menos, um primeiro anticorpo que se liga, especificamente, ao epitopo R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 SEQ ID N°: 8, em que Y<sub>7</sub> é Asn, Z<sub>12</sub> é Asn e X<sub>9</sub> é Glu ou Asp e um segundo anticorpo que se liga, especificamente, ao referido epitopo, no qual Y<sub>7</sub> é Arg e Z<sub>12</sub> é Lys.

18. Composição de anticorpo de acordo com a reivindicação 17, compreendendo uma mistura de mais de dois dos referidos anticorpos, em que os referidos anticorpos se ligam a sequências do epitopo da proteínas Tat do HIV-1, de várias estirpes do HIV-1.
19. Composição de anticorpo de acordo com a reivindicação 17 e 18, em que o referido anticorpo é seleccionado do grupo consistindo num anticorpo policlonal isolado, num anticorpo monoclonal, num anticorpo quimérico, num anticorpo humanizado, num anticorpo humano, num anticorpo produzido por rastreio de apresentação por fagos, um anticorpo de cadeia simples, um fragmento de anticorpo e suas misturas.
20. Composição de anticorpo de acordo com a reivindicação 17, compreendendo um anticorpo que se liga, especificamente, à sequência de aminoácidos Asp-Pro-Asn-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Asn da SEQ ID N°: 26, em que o referido X<sub>9</sub> é Glu ou Asp.
21. Composição de anticorpo de acordo com a reivindicação 17, compreendendo um anticorpo que se liga, especificamente, à sequência de epitopo R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 SEQ ID N°: 17 e um anticorpo que se liga, especificamente, à sequência de epitopo R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 SEQ ID N°: 18.

22. Composição de anticorpo de acordo com a reivindicação 17, compreendendo um anticorpo contra uma proteína Tat-1 do HIV, que se liga, especificamente, à sequência de aminoácidos -Lys-X<sub>1</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- da SEQ ID N<sup>o</sup>: 10, em que o referido aminoácido X<sub>1</sub> é Gly ou Ala.
23. Composição farmacêutica compreendendo uma composição de anticorpo de qualquer das reivindicações 17-22 e um veículo farmacologicamente aceitável.
24. Utilização de uma composição de anticorpo de qualquer das reivindicações 17 a 22, na preparação de um medicamento para tratar o HIV-1 pela redução dos níveis virais do HIV-1 num humano.
25. Gene sintético compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando, pelo menos, duas variantes de um péptido ou polipéptido, como definido na reivindicação 1.
26. Molécula sintética compreendendo o gene sintético da reivindicação 25, operativamente ligado a sequências de ácido nucleico reguladoras, que dirigem e controlam a expressão do produto do referido gene sintético, numa célula hospedeira.
27. Célula hospedeira de mamífero contendo um gene sintético da reivindicação 25.
28. Composição farmacêutica compreendendo um gene sintético da reivindicação 25 e um veículo farmacologicamente aceitável.

Lisboa, 19 de Fevereiro de 2007

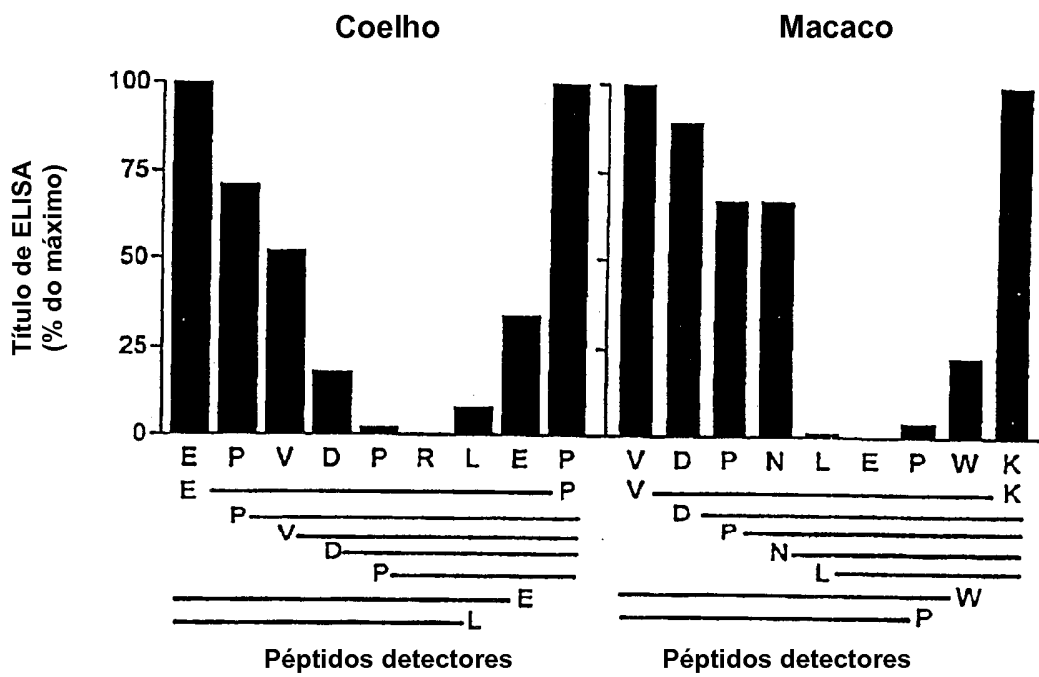


Fig 1A

Fig 1B

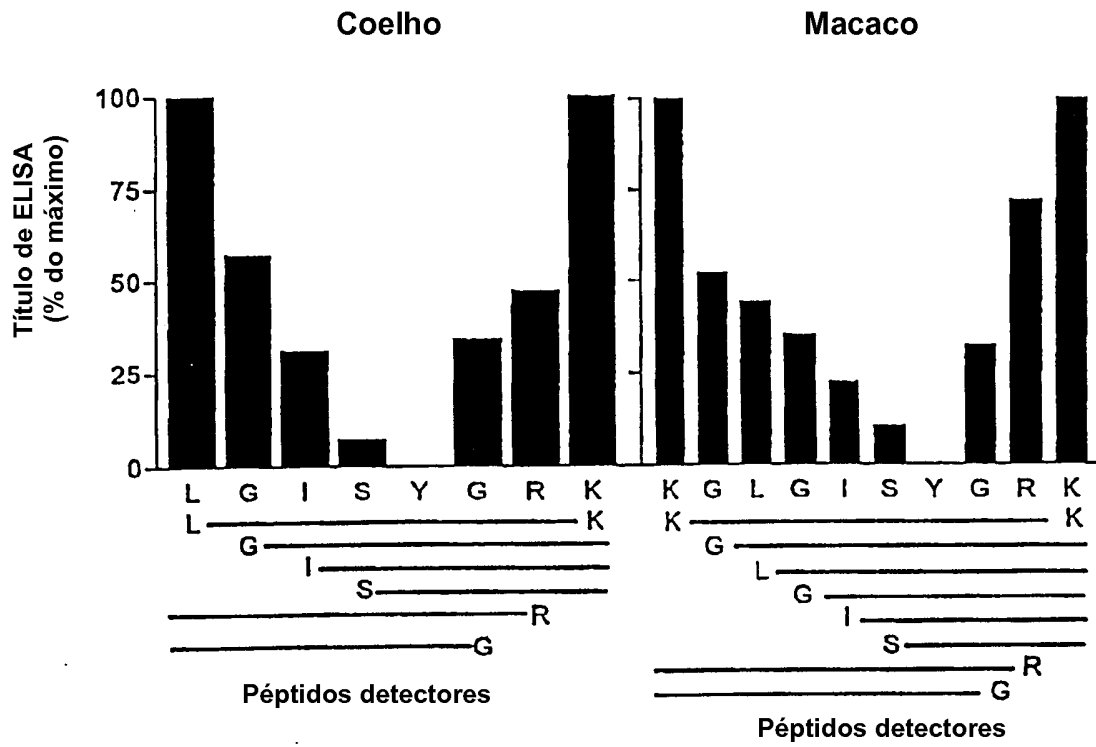


Fig 2A

Fig 2B

**FIG. 3A [SEQ ID N°: 12]**

DnaK (HSP70)- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Arg -Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub>- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Ser-Gly-Ser)<sub>4</sub>

**FIG. 3B [SEQ ID N°: 13]**

DnaK (HSP70) - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Arg -Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub>- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Asn -Leu-Ala-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>4</sub>- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>4</sub>

**Fig. 3C [SEQ ID N°: 14]**

Toxóide da difteria conjugado com -Cys-Gly-Ser-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-amida