

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 88.425

NOME: Biogen Inc., norte-americana, com sede em
14 Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts
02142, Estados Unidos da América,

EPIGRAFE: "Processo para a preparação de proteínas
T4 solúveis"

INVENTORES: Richard A. Fisher,
Walter Gilbert,
Wicki L. Sato,
Richard A. Flavell,
John M Maraganore,
Theresa R. Liu,

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

U.S.A., em 4.09.1987, sob o Nº 094,322
7.01.1988, sob o Nº 141,649

4

BIOGEN INC.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS
T4 SOLÚVEIS"

DESCRIÇÃO

Campo Técnico da Invenção

A presente invenção refere-se a sequências de DNA, moléculas de DNA recombinante e processos para a produção de proteínas T4 solúveis. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a sequências de DNA que são caracterizadas pelo facto de codificarem, na expressão em um hospedeiro unicelular apropriado, para formas solúveis de T₄, o receptor na superfície de linfócitos T₄⁺ ou seus derivados. De acordo com a presente invenção, as sequências de DNA, moléculas de DNA recombinante e processos desta invenção podem ser utilizados para produzir T₄ solúvel essencialmente isenta de outras proteínas de origem humana. Esta proteína solúvel pode, depois, vantajosamente ser utilizada em composições imunoterapêuticas, profiláticas e de diagnóstico e em métodos da presente invenção.

As composições imunoterapêuticas baseadas em proteínas T₄ solúveis e os métodos da presente invenção são utilizáveis no tratamento de doentes imunodeficientes que sofram de doenças provocadas por agentes infecciosos cujos alvos primários são os linfócitos T₄⁺. De acordo com uma forma de realização preferida, a presente invenção refere-se a composições que contêm proteínas

T₄ solúveis e a métodos que são utilizáveis na prevenção, tratamento ou detecção do síndrome da imunodeficiência adquirida, com plexos relacionados com a SIDA e infecção de HIV.

ESTADO DA TÉCNICA

A classe de células imuno-reguladoras conhecidas como linfócitos de células T pode ser dividida em duas grandes classes funcionais, compreendendo a primeira classe células indutoras ou auxiliares - que regulam a proliferação de células T, a libertação de linfocina e as interações de células auxiliares para libertação de Ig e compreendendo, a segunda classe células supressoras ou citotóxicas - que participam na eliminação regulada de células T e supressão de resposta imune. Em geral, estas duas classes de linfócitos distinguem-se pela expressão de uma das duas glicoproteínas de superfície: T₄ (peso molecular 55000 - 62000 daltons) que é expresso em células indutoras ou auxiliares, provavelmente como uma proteína monomérica ou T₈ (peso molecular 32000 daltons) que é expressa em células supressoras ou citotóxicas T como uma proteína dimérica.

As estruturas primárias de T₄ e T₈ foram deduzidas a partir das respectivas sequências de cDNA [P. J. Maddon et al., "The isolation and Nucleotid Sequence of a cDNA Encoding the T Cell Surface Protein T₄: A New Member of the Immunoglobulin Gene Family", Cell, 42, págs. 93-104 (1985); D. R. Littman et al., "The Isolation and Sequence of The Gene Encoding T₈: A Molecule defining functional Classes of T Lymphocytes", Cell, 40, págs.237-46 (1985)]. Ambas as sequências de proteínas citadas definem moléculu

las com domínios esperados para antígenos de superfície, incluindo domínios de transmembranas e intracitoplásmicos na extremidade carboxílica da proteína. Além disso, ambas as proteínas contêm uma região terminal amino que apresenta uma impressionante homologia para imunoglobulina e regiões variáveis receptoras de células T e que podiam funcionar durante o reconhecimento de células alvo [Maddon et al., supra].

Em indivíduos imunocompetentes, os linfócitos T_4 interatuam com outros tipos de células especializadas do sistema imune para conferir imunidade ou proteger contra infecção [E. L. Reinherz e S. F. Schlossman, "The Differentiation Function of Human T-cells", Cell, 19, págs. 821-27 (1980)]. Mais especificamente, os linfócitos T_4 estimulam a produção de factores de crescimento que são críticos para um sistema imune funcional. Por exemplo, actuam para estimular células B, os descendentes de células de ascendência hemopoiética, que promovem a produção de anticorpos defensivos. Também activam macrófagos ("células assassinas") para atacar células hospedeiras infectadas ou células hospedeiras anormais, sob outro aspecto, e induzem monócitos ("células necróforas") para cercar e destruir micróbios invasores.

Verificou-se que o alvo primário ou receptor de certos agentes infecciosos é a proteína de superfície T_4 . Estes agentes incluem, por exemplo, vírus e retrovírus. Quando os linfócitos T_4 são expostos a tais agentes, tornam-se não funcionais. Como consequência, o sistema de defesa imune complexo do hospedeiro é destruído e o hospedeiro torna-se susceptível a uma vasta gama de infecções oportunistas.

Essa imunossupressão foi observada em doentes que sofrem

L

do síndrome da imunodeficiência adquirida ("SIDA"). A SIDA é uma doença caracterizada pela imunossupressão aguda ou total e susceptibilidade actual do hospedeiro a uma vasta gama de infecções e doenças oportunistas. Nalguns casos, a infecção da SIDA é acompanhada por perturbações do sistema nervoso central. A manifestação total clínica da SIDA é normalmente precedida pelo complexo relacionado com a SIDA ("ARC"), um síndrome que é acompanhado por sintomas, tais como, linfadenopatia generalizada persistente, febre e perda de peso. O vírus da imunodeficiência humana ("HIV") retrovírus é considerado como o agente etiológico responsável pela infecção da SIDA e o seu precursor, "ARC" M. G. Sarngadharan et al., "Detection, Isolation and continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS", Science, 224, págs. 497-508 (1984).

Entre 85 e 100% do teste da população AIDS/ARCS seropositiva para HIV G. N. Shaw et al., "Molecular Characterization of Human T-Cell Leukemia (Lymphotropic) Virus Type III in the Acquired Immune Deficiency Syndrome", Science, 226, págs. 1165-70 (1984). O número de adultos, nos Estados Unidos, infectados com HIV tem

* Neste pedido de patente de invenção, utilizar-se-á a expressão vírus da imunodeficiência humana ("HIV"), que é a designação genérica adoptada pelo subcomité de retrovírus humano de International Committee on Taxonomy of Viruses, para identificar os isolados independentes a partir dos doentes da SIDA, incluindo os vírus linfotrópicos de células T humanas, do tipo III, ("HTLV-III"), vírus associados à linfadenopatia ("LAV"), vírus da imunodeficiência humana, do tipo 1, ("HIV-1") e retrovírus associados à SIDA ("ARV").

vido estimado entre 1 e 2,5 milhões D. Barnes, "Strategies for an AIDS Vaccine", Science, 233, págs. 1149-53 (1986); M. Rees, "The Sombre View of AIDS", Nature, 326, págs. 343-45 (1987) . Estas estimativas incluem 64900 indivíduos que não pertencem a um grupo identificado de risco para a SIDA S.L. Sivak and G.P. Wornser, "How Common is HTLV-III Infection in de United States?", New Eng. J. Med., 313, págs. 1352 (1985) . A taxa anual aparente de diagnóstico para as pessoas infectadas com o vírus HIV está compreendida entre 1 e 2% - uma taxa que pode aumentar significativamente nos próximos anos.

O genoma do retrovírus, tal como HIV, contém três regiões que codificam as proteínas estruturais. A região gag codifica proteínas do núcleo do virião. A região pol codifica o DNA polimerase dependente do virião RNA (transcriptase inversa).

A Região env codifica a glicoproteína principal que se encontra no revestimento da membrana do vírus e na membrana citoplásmica das células infectadas. A capacidade do vírus para se ligar aos receptores das células alvo e para provocar a fusão das membranas de células está relacionada com duas propriedades do HIV controladas pelo gene env. Estas propriedades são aceites para se estabelecer uma regra fundamental na patogênese do vírus.

As proteínas env de HIV resultam de um polipeptido precursor que, na forma madura, é cindida em uma proteína da membrana exterior glicosilada pesada de cerca de 481 aminoácidos - gp 120 - e uma proteína de transmembrana mais pequena, com cerca de 345 aminoácidos, que pode ser glicosilada - gp 41 L. Ratner et al., "Complete Nucleotide Sequence of de AIDS Virus, HTLV-III", Nature,

313, págs. 277-84 (1985). A variedade de hospedeiros do vírus HIV está associada com células que produzem a glicoproteína T_4 de superfície. Essas células incluem linfócitos T_4 e células do cérebro P. J. Maddon et al., "The T_4 Gene Encodes the AIDS Virus Receptor and is Expressed in the Immune System and the Brain", Cell, 47, págs. 333-48 (1986). Após a infecção de um hospedeiro pelo vírus HIV, os linfócitos T_4 tornam-se não funcionais. A progressão dos síndromas SIDA/ARCS pode ser correlacionada com a depleção dos linfócitos T_4^+ que revelam a glicoproteína da superfície de T_4 . Esta depleção de células T_4 , com subsequente compromisso imunológico pode ser atribuída a ambos os ciclos recorrentes de infecção e crescimento lítico a partir da propagação do vírus aumento mediado pelas células. Além disso, as observações clínicas sugerem que o vírus HIV é directamente responsável pelas perturbações do sistema nervoso central verificadas em muitos doentes com SIDA.

O tropismo do vírus HIV para células T_4^+ é aceite como sendo atribuído ao papel desempenhado pela glicoproteína da superfície das células T_4 como o receptor do vírus ligado à membrana. Porque as células T_4 se comportam como o receptor do vírus HIV, a sua sequência extracelular tem provavelmente uma acção directa na ligação ao HIV. Mais especificamente, admite-se que o revestimento de HIV se liga selectivamente ao(s) epítotope(s) de T_4 , utilizando esta interacção para iniciar a entrada na célula hospedeira A.G. Dalgelish et al., "The CD_4 (T_4) Antigen is an Essential Component of the receptor for the AIDS Retrovirus", Nature, 312, págs. 763-67 (1984); D. Klatsmann et al., "T. - Lymphocyte T_4 Molecule Behaves as the Receptor for Human Retrovirus LAV", Nature, 312, págs. 767-68 (1984). Por consequência, acre-



dita-se que a expressão celular de T_4 seja suficiente para ligação de HIV, com a proteína de T_4 servindo como um receptor para o vírus de HIV.

O tropismo de T_4 do vírus de HIV foi demonstrado in vitro. Quando o vírus de HIV isolado dos doentes com SIDA é cultivado em conjunto com linfócitos auxiliares T pré-seleccionados para a superfície de T_4 , os linfócitos são infectados de modo eficiente, provocam efeitos citopáticos incluindo formação de "Synaytia" multinuclear e são mortos por crescimento lítico D. Klatzmann et al., "Selective Tropisme of Lynphadenopathy Associated Virus (LAV) for Helper - Inducer T Lynphocytes", Science, 225, págs. 59-63 (1984); F. Wong-Staal and R.C. Gallo, "Human T-Lynphotropic Retroviruses", Nature, 317, págs. 395-403 (1985) . Foi demonstrado que uma versão de CDNA clonado de células T_4 humanas, quando expressas na superfície de células transfectadas a partir de estirpes de células não-T, incluindo células de murina e fibroblastoides, dota essas células com a capacidade de ligar HIV P.J. Maddon et al., "The T_4 Gene Enclodes the AIDS Virus Receptor and is Expressed in the Immune System and the Brain", Cell, 47, págs. 333-48 (1986) .

Durante o curso da infecção de HIV, o hospedeiro desenvolve uma resposta imune humoral e uma resposta imune celular para o vírus. Estas respostas incluem o aparecimento de anticorpos que ligam a um número de produtos virais e que exibem efeito neutralizante ou funções citotóxicas celulares dependentes de anticorpos M. Guroff-Robert et al., "HTLV-III - Neutralizing Antibodies in Patients With AIDS and AIDS-Related Complex", Nature, 316, págs. 72-74 (1985); D.D.F. Barin et al., "Virus Virus Envelope Protein

of HTLV-III Represents Major Target Antigen for Antibodies in AIDS Patients", Science, 228, págs.1094-96 (1985); A.H. Rook et al., "Sera from HTLV-III/LAV Antibody Positive Individuals Mediate Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity Against HTLV-III/LAV Infected T Cells", J. Immunol., 138, págs. 1064-68 (1987) . Os Epítopes do revestimento de HIV foram identificados como determinantes importantes para extrair uma resposta neutralizante de anticorpo. E os determinantes na actividade ("ADCC") de citotoxicidade celular dependente de anticorpo incluem env de HIV e, possivelmente, epítopes gag.

Não se dispendo de tratamentos eficazes para a SIDA, tem-se concentrado muitos esforços na prevenção da doença. Essas medidas preventivas incluem a pesquisa de anticorpos de HIV em todos os dadores de sangue, órgãos e sêmen e a educação de grupos de risco elevado para a SIDA, em relação à transmissão da doença.

Tratamentos experimentais ou clínicos prévios da SIDA e das condições ARCS têm incluído a administração de drogas antivirais, tais como HPA-23, fosfonoformato, suramina, ribavirina, azidotimidina ("AZT") e dideoxicitidina, que interferem aparentemente com a replicação do vírus através de inibição de transcriptase inversa. Embora cada uma destes fármacos exhiba actividade contra HIV in vitro, apenas AZT demonstrou benefícios potenciais em experiências clínicas. Contudo, a administração de AZT em quantidades eficazes tem sido acompanhada por efeitos secundários indesejáveis e debilitantes, tais como depressão da medula óssea. É óbvio, por consequência, que a toxicidade hematológica seja um factor principal de limitação na utilização prolongada da AZT. Outros métodos propostos para o tratamento da SIDA foram realça-



dos no desenvolvimento de agentes que possuem actividade contra as fases no ciclo replicativo viral com excepção da transcrição inversa. Esses métodos incluem a administração de interferões ou a aplicação da tecnologia do hibridoma. A maior parte destas estratégias de tratamento são supostas requererem a co-administração de imunomoduladores, tais como a interleuquina-2.

Hoje, torna-se necessário o desenvolvimento de agentes e métodos imunoterapêuticos para o tratamento da SIDA, ARCS, infecção de HIV e outras imunodeficiências provocadas pela depleção ou anormalidades dos linfócitos T.

Descrição da Invenção

A presente invenção soluciona os problemas referidos antes, proporcionando, em grandes quantidades, células T_4 solúveis e seus derivados solúveis que actuam como receptores para agentes infecciosos cujo alvo primário é a proteína de superfície T_4 de linfócitos T_4^+ . Vantajosamente, esta invenção proporciona também células T_4 solúveis essencialmente livres de outras proteínas de origem humana e sob uma forma que não é contaminada por vírus, tais como os vírus HIV ou da hepatite B.

Como se verá na descrição que se segue, as sequências de DNA e as moléculas de DNA recombinante desta invenção são capazes de dirigir, em um hospedeiro apropriado, a produção de células T_4 solúveis ou de derivados correspondentes. Os polipeptidos da presente invenção são eficazes quer quando produzidos no hospedeiro quer após subsequente derivação ou modificação, em uma variedade de composições imunoterapêuticas e métodos para tratamento de do-



entes imunodeficientes que sofrem de doenças provocadas por agentes infecciosos cujos alvos primários são os linfócitos T_4^+ . De acordo com várias formas de realização desta invenção, tais composições e métodos relacionam-se com um receptor solúvel para HIV, proteínas de células T_4 solúveis e polipeptidos e anticorpos correspondentes. As proteínas de células T_4 solúveis e os polipeptidos desta invenção incluem formas monovalentes, bem como polivalentes.

As composições e métodos desta invenção relativos a proteínas T_4 solúveis, polipeptidos ou peptidos e anticorpos correspondentes, são particularmente eficazes para a prevenção, tratamento ou detecção das infecções SIDA e ARC relacionadas com HIV. Mais especificamente, as composições e métodos desta invenção relativos a células T_4 solúveis utilizam polipeptidos semelhantes a células T_4 solúveis - polipeptidos que interferem vantajosamente com a interacção T_4 /HIV por bloqueamento ou mecanismos de ligação competitivos que inibem a infecção de HIV de células que expressam a proteína de superfície de células T_4 . Estes polipeptidos semelhantes a células T_4 solúveis inibem a adesão entre linfócitos T_4^+ e agentes infecciosos os quais atingem linfócitos T_4^+ e inibem a interacção entre linfócitos T_4^+ e antígenos que apresentam células e alvos de linfócitos T_4^+ mediadores de morte. Actuando como receptores de vírus solúveis, as composições da presente invenção podem ser utilizadas como agentes terapêuticos antivirais para inibir a ligação HIV a células T_4^+ e a formação de "syncytium" induzida de modo viral ao nível da ligação do receptor.

A presente invenção consegue estes objectivos proporcionando sequências de DNA que codificam na expressão, em um hospe-



deiro unicelular apropriado proteínas T_4 solúveis* e derivados so lúveis correspondentes.

A presente invenção também proporciona moléculas de DNA recombinante que contêm essas sequências de DNA e hospedeiros uni celulares transformados por elas. Esses hospedeiros permitem a produção de grandes quantidades de novas proteínas T_4 solúveis, polipeptidos, peptidos e derivados desta invenção para utilização numa larga variedade de métodos e composições terapêuticos, profii láticos e de diagnóstico.

As sequências de DNA da presente invenção são seleccionadas do grupo que consiste em:

(a) inserções de DNA de p199-7, pBG377, pBG380, pBG381, p203-5, pBG391, pBG392, pBG393, pBG394, pBG395, pBG396, pBG397, p211-11, p214-10 e p215-7;

(b) As sequências de DNA que hibridizam uma ou mais das inserções de DNA referidas antes e que codificam na expressão para um polipeptido semelhante a células T_4 solúveis; e

* Neste pedido de patente de invenção, as designações "proteína solúvel T_4 ", "célula T_4 solúvel" e "polipeptidos semelhantes a células T_4 solúveis" incluem todas as proteínas, proteinas T_4 solúveis naturais ou recombinantes ou derivados solúveis correspondentes e são caracterizados pela actividade imunoterapêutica (anti-retroviral) ou imunogênica de proteínas T_4 solúveis. Incluem compostos semelhantes a células T_4 solúveis de uma variedade de origens tais como proteínas T_4 solúveis derivadas de fôntes naturais, proteínas T_4 solúveis recombinantes e proteínas T_4 solúveis sintéticas ou semi-sintéticas.

(c) sequências de DNA que codificam na expressão para um polipeptido semelhante a células T₄ solúveis codificadas na expressão por uma qualquer das inserções e sequências de DNA referidas antes.

De acordo com uma forma de realização alternativa, a presente invenção descreve, também, uma sequência de DNA que compreende a inserção de DNA de p170-2, inserção que codifica na expressão para um polipeptido semelhante a T₄. E, esta invenção também descreve moléculas de DNA recopbinantes e processos para a produção de proteínas T₄ que utilizam essa sequência de DNA.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma auto-radiografia que representa a purificação da proteína T₄ a partir de células 4937 mediante cromatografia de imunoafinidade.

A Figura 2 representa a auto-radiografia e os dados da mancha de Western que demonstram que a proteína T₄ natural solubilizada, purificada por imunoafinidade se liga à proteína de revestimento de HIV.

A Figura 3 representa a sequência nucleotídica e a sequência de aminoácidos derivada de CDNA T₄ obtida a partir do clone 203-4 de PBL. Nesta figura, os aminoácidos são representados por códigos simples como se seguem:

| | | | |
|---------|---------|---------|---------|
| Phe : F | Leu : L | Ile : I | Met : M |
| Val : V | Ser : S | Pro : P | Thr : T |
| Ala : A | Tyr : Y | His : H | Gln : Q |

Asn : N Lys : K Asp : D Glu : E
Cys : C Trp : W Arg : R Gly : G

* = posição na qual está presente um códão de paragem.

Na Figura 3 o início da translação da proteína T₄ (AA₋₂₃) está localizado na metionina nos nucleótidos 201-203 e o terminal N maduro está localizado na lisina (AA₃) nos nucleótidos 276-278.

A Figura 4 é uma representação esquemática da construção dos clones pBG312. T₄ de cDNA (também chamados p171-1 e p170-2).

A Figura 5 é uma representação esquemática da construção do plasmídeo pEC100.

A Figura 6 representa comparações de aminoácidos nas posições 3,64 e 231 de vários clones de cDNA de T₄.

As Figuras 7A e 7B representam a estrutura do domínio da proteína T₄, purificada e de mutantes T₄ solúveis recombinantes.

As Figuras 8A-8D são representações esquemáticas de construções de vários plasmídeos intermédios e outros plasmídeos utilizados para exprimir T₄ solúvel recombinante ("rs T₄") de acordo com a presente invenção.

A Figura 9A é uma representação esquemática da construção do plasmídeo p199-7.

As Figuras 9B e 9C são representações esquemáticas da construção do plasmídeo p203-5.



A Figura 10 representa os ligantes dos oligonucleótidos sintéticos utilizados em várias construções de acordo com a presente invenção.

A Figura 11 descreve a sequência de nucleótidos do plasmídeo total definido por p199-7 (P₂ mutet. rs T₄) e a sua inserção rs T₄. 2 e a sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de rs T₄. Isto inclui a fita ("cassete") ClaI-ClaI que define a sequência codificante de rs T₄.2 perfeita Met.

A Figura 12 representa uma análise da mancha de proteína de uma indução da expressão de rs T₄.2 a partir de SG936/p199-7.

A Figura 13 é uma representação esquemática da construção do plasmídeo pBG368.

As Figuras 14A-14C são representações esquemáticas de construções de vários plasmídeos de acordo com a presente invenção.

A Figura 15 representa a sequência de nucleótidos do plasmídeo pBG391.

A Figura 16 representa a sequência de nucleótidos do plasmídeo pBG392. Nesta figura, o início da translação da proteína T₄ (AA₋₂₃) está localizado na metionina nos nucleótidos 1207-1209 e o terminal N maduro está localizado na lisina (AA₃) no nucleótido 1281-84.

A figura 17 é uma representação esquemática de construções de vários plasmídeos de acordo com a presente invenção.

A Figura 18 descreve os ligantes dos oligonucleótidos sintéticos utilizados em várias construções de acordo com a presente invenção.



A Figura 19 representa a sequência de nucleótidos do plasmídeo pBG394.

A Figura 20 representa a sequência de nucleótidos do plasmídeo pBG396.

A Figura 21 representa a sequência de nucleótidos do plasmídeo pBG393.

A Figura 22 representa a sequência de nucleótidos do plasmídeo pBG395.

A Figura 23 representa um gel tingido de Coomassie de $rsT_4.2$ purificado a partir do meio condicionado de BG380G da linha de células CHO transfectada por pBG380 do plasmídeo p196-10.

A Figura 24 é uma representação esquemática da construção do plasmídeo p196-10.

A Figura 25 é uma representação esquemática da construção do plasmídeo pBG394.

A Figura 26 é uma representação esquemática da construção do plasmídeo p211-11.

A Figura 27 é uma representação esquemática da construção do plasmídeo p215-7.

A Figura 28 é uma representação esquemática da construção do plasmídeo p218-8.

A Figura 29A representa um gel tingido de Coomassie de $rsT_4.113.1$ purificado a partir do meio condicionado de E. coli transfectado de pBG211-11.

A Figura 29B é uma auto-radiografia que mostra uma análise da mancha de Western de $rsT_4.113.1$ expressa em E. coli.

A Figura 30, painéis (a)-(c), representa a purificação do $rs.T_4.113.1$ a partir de transformantes de E. coli.

A Figura 31, painéis (a)-(c), representa a redobagem de $rs.T_4.113.1$ purificado.

A Figura 32 é uma auto-radiografia que mostra a imunoprecipitação de linhas de células CHO marcadas metabolicamente com ^{35}S que produzem T_4 solúvel recombinante.

A Figura 33 mostra uma análise da imuno-mancha de linhas de células COS7 que produzem T_4 solúvel recombinante.

Na Figura 34 representam-se graficamente os resultados de um ensaio de competição entre $rsT_4.113.1$ e $rsT_4.3$ para se ligarem a OKT_4A ou OKT_4 .

Nas Figuras 35-37 representam-se graficamente os resultados dos ensaios de competição entre $rsT_4.111$ e $rsT_4.3$ para se ligarem, respectivamente a OKT_4A , Leu-3A e OKT_4 .

Na Figura 38 representa-se graficamente um ensaio ELISA para $rsT_4.113.1$ a partir de transformantes de E. coli.

Na Figura 39 representam-se graficamente os resultados de um rádio-imunoensaio de p24 utilizando T_4 solúvel recombinante de acordo com a presente invenção.

Nas Figuras 40 e 41 apresentam-se os resultados dos ensaios de inibição de "syneytia", utilizando proteínas T_4 solúveis recombinantes de acordo com a presente invenção.

A Figura 42 é uma representação esquemática da construção do plasmídeo pBiv. 1.

A Figura 43 representa a proteína T_4 solúvel recombinante bivalente produzida por pBiv. 1.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Isolou-se as sequências de DNA de acordo com a presente invenção a partir de duas bibliotecas: uma Biblioteca de cDNA de 7gt derivada da linha de células tumorais T REX e uma biblioteca de cDNA de 1gt 10 derivada dos linfócitos do sangue periférico. Porém, podia-se também ter utilizado bibliotecas preparadas a partir de outras células que expressam T_4 . Estas incluem, por exemplo, H₉ e U937. Pode-se também utilizar um banco genômico humano para isolar vários fragmentos do gene T_4 .

Para sondar estas bibliotecas, utilizou-se uma série de sondas de DNA de oligonucleótidos anti-sensação sintetizadas quimicamente baseadas na sequência de proteínas T_4 descritas em Maddon et al.. (1985), supra.

Para a sondagem, hibridizou-se as sondas de oligonucleótidos com as bibliotecas de cDNA de acordo com a presente invenção utilizando um ensaio de sondagem de hibridação de placas. Seleccionaram-se clones que se hibridizam com várias sondas de acordo com a presente invenção e após isolamento e subclonação das inserções de cDNA dos clones seleccionados nos plasmídeos, determinou-se as suas sequências de nucleótidos e comparou-se as sequências de aminoácidos deduzidas dessas sequências de nucleótidos para as sequências de aminoácidos referidas em Maddon et al. (1985),



supra. Como um resultado destas comparações, determinou-se que todos os clones seleccionados se caracterizavam por inserções de cDNA que codificam para sequências de aminoácidos de T₄ humano.

Representa-se na Figura 3 a sequência de nucleótidos de cDNA de T₄ de comprimento total obtida a partir do clone depositado do p170-2 e a sequência de aminoácidos deduzida a partir dela. Essa sequência de cDNA foi submetida subsequentemente a mutagênese dirigida ao local in vitro e a substituição do fragmento de restrição de forma a que a sua sequência de cDNA fosse idêntica à descrita por Maddon et al.

Após a modificação da sequência de cDNA de T₄ de forma a ficar idêntica a de Maddon et al., cortaram-se amostras em vários locais para remover as regiões de codificação dos domínios intra citoplasmático e de transmembrana. As sequências de cDNA restantes codificaram uma T₄ solúvel que reteve a região extracelular considerada responsável pela ligação com HIV.

Construíu-se depois vários clones caracterizados por essas inserções de cDNA que codificam para T₄ solúvel humano. Essas sequências de cDNA podem ser utilizadas numa grande variedade de processos de acordo com a presente invenção. Mais em particular, essas sequências ou as suas porções ou cópias sintéticas ou semi-sintéticas podem ser utilizadas como sondas de DNA para sondar outros cDNA humanos ou de animais ou bibliotecas genômicas para seleccionar por hibridação outras sequências de DNA que estão relacionados com T₄ solúvel. Tipicamente, as condições de hibridação convencionais, por exemplo, cerca de 20^o a 27^o C abaixo de T_m são utilizadas nessas seleções. Porém, podem ser necessárias condi-



ções menos severas quando a biblioteca é sondada com uma sonda proveniente de espécies diferentes das espécies a partir das quais a biblioteca deriva, por exemplo, a sondagens de uma biblioteca de ratinhos com uma sonda humana.

Essas inserções de cDNA, respectivas porções ou cópias sintéticas ou semi-sintéticas podem também de ser utilizadas como materiais iniciais para preparar várias mutações. Essas mutações podem ser degeneradas, isto é, a mutação não altera a sequência de aminoácidos codificada pelo codão mutado, ou não degenerada, isto é a mutação altera a sequência de aminoácidos codificada pelo codão mutado. Ambos os tipos de mutações podem ser vantajosos na produção ou utilização de T₄ solúvel de acordo com a presente invenção. Por exemplo, estas mutações podem permitir maiores níveis de produção ou purificação mais fácil de T₄ solúvel ou maior actividade de T₄.

Por todas estas razões, as sequências de DNA de acordo com a presente invenção são seleccionadas de entre o grupo que consiste em:

(a) inserções de DNA de p199-7, pBG377, pBG380, pBG381, p203-5, pBG391, pBG392, pBG393, pBG394, pBG395, pBG396, pBG397, p211-11, p214-10 e p215-7;

(b) As sequências de DNA que se hibridizam com uma ou mais das inserções referidas antes e que codificam na expressão para um polipéptido semelhante a T₄ solúvel; e

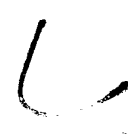
(c) As sequências de DNA que codificam na expressão para um polipeptido semelhante a T₄ solúvel codificado na expressão

L

por qualquer uma das inserções e sequências de DNA referidas antes.

De preferência as sequências de DNA desta invenção codificam para um polipeptido escolhido de entre o grupo que consiste em um polipeptido da fórmula $AA_{-23} - AA_{362}$ da Figura 3, um polipeptido da fórmula AA_1-362 da Figura 3, um polipeptido da fórmula $Met - AA_1-362$ da Figura 3, um polipeptido da fórmula AA_1-374 da Figura 3, um polipeptido da fórmula $Met-AA_1-374$ da Figura 3, um polipeptido da fórmula AA_1-377 da Figura 3, um polipeptido da fórmula $Met-AA_1-377$ da Figura 3, um polipeptido da fórmula $AA_{-23} - AA_{374}$ da Figura 3, um polipeptido da fórmula $AA_{-23} - AA_{377}$ da Figura 3 ou as porções correspondentes.

As sequências de DNA de acordo com a presente invenção codificam, também, de preferência, para um polipeptido escolhido do grupo que consiste em um polipeptido da fórmula $AA_{-23} - AA_{182}$ da Figura 16, um polipeptido da fórmula $AA_1 - A_{182}$ da Figura 16, um polipeptido da fórmula $Met-AA_1-182$ da Figura 16, um polipeptido da fórmula $AA_{-23} - AA_{182}$ da Figura 16 seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido da fórmula $AA_1 - AA_{182}$ da Figura 16 seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido da fórmula $Met-AA_1-182$ da Figura 16 seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido da fórmula $AA_{-23}-AA_{113}$ da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA_1-AA_{113} da Figura 16, um polipeptido da fórmula $Met-AA_1-113$ da Figura 16, um polipeptido da fórmula $AA_{-23}-AA_{111}$ da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA_1-AA_{111} da Figura 16, um



polipeptido da fórmula Met-AA₁₋₁₁₁ da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA_{-23-AA131} da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA_{1-AA131} da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA_{-23-AA145} da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA_{1-AA145} da Figura 16, um polipeptido da fórmula Met-AA₁₋₁₄₅ da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA_{-23-AA166} da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA_{1-AA166} da Figura 16, um polipeptido da fórmula Met-AA₁₋₁₆₆ da Figura 16, ou porções correspondentes.

Adicionalmente, as seqüências de DNA desta invenção codificam para um polipeptido escolhido do grupo que consiste em um polipeptido da fórmula AA_{-23-AA362} de proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula AA₁₋₃₆₂ da proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula Met-AA₁₋₃₆₂ de proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula AA₁₋₃₇₄ da proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula Met-AA₁₋₃₇₄ da proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula AA₁₋₃₇₇ de proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula Met-AA₁₋₃₇₇ de proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula Met-AA₁₋₃₇₇ de proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula AA_{-23-AA374} de proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula AA_{-23-AA377} de proteína T₄ madura ou as porções correspondentes.

As seqüências de DNA de acordo com a presente invenção também codificam para um polipeptido escolhido do grupo que consiste em um polipeptido da fórmula AA_{-23-AA182} de proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula AA_{1-AA182} de proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula Met-AA₁₋₁₈₂ de proteína T₄ madura, um polipeptido da fórmula AA_{-23-AA182} de proteína T₄ madura seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido da fórmula AA_{1-AA182} de proteína T₄ ma-

dura seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido da fórmula $\text{Met-AA}_1\text{-}_{182}$ de proteína T_4 madura seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_{-23}\text{-AA}_{113}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_1\text{-AA}_{113}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{Met-AA}_1\text{-}_{113}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_{-23}\text{-AA}_{111}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_1\text{-AA}_{111}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{Met-AA}_1\text{-}_{111}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_{-23}\text{-AA}_{131}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_1\text{-AA}_{131}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{Met-AA}_1\text{-}_{131}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_{-23}\text{-AA}_{145}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_1\text{-AA}_{145}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{Met-AA}_1\text{-}_{145}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_{-23}\text{-AA}_{166}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_1\text{-AA}_{166}$ de proteína T_4 madura, um polipeptido da fórmula $\text{Met-AA}_1\text{-}_{166}$ de proteína T_4 madura ou as porções correspondentes.

O aminoácido de amino-terminal de proteína T_4 madura isolado a partir de células T começa na lisina, o terceiro aminoácido da sequência descrita na Figura 16. Por consequência, as proteínas T_4 solúveis também incluem polipeptidos da fórmula $\text{AA}_3\text{-AA}_{377}$ da Figura 16 ou as porções correspondentes. Esses polipeptidos incluem polipeptidos escolhidos do grupo que consiste em um polipeptido da fórmula AA_3 a AA_{362} da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA_3 a AA_{374} da Figura 16, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_3\text{-AA}_{182}$ da Figura 16, um polipeptido da fórmula $\text{AA}_3\text{-AA}_{113}$ da Fi

gura 16, um polipeptido da fórmula AA₃-AA₁₃₁ da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA₃-AA₁₄₅ da Figura 16, um polipeptido da fórmula AA₃-AA₁₆₆ da Figura 16 e um polipeptido da fórmula AA₃-AA₁₁₁ da Figura 16. As proteínas solúveis T₄ também incluem os polipeptidos citados antes precedidos por um grupo metionina N-terminal.

As construções da proteína T₄ solúvel de acordo com a presente invenção também podem ser produzidas truncando a sequência da proteína T₄ de comprimento total nas várias posições para remover as regiões que codificam para a transmembrana e os domínios intracitoplásmicos, enquanto a retenção da região extracelular se considera responsável pela ligação com HIV. Mais em particular, os polipeptidos T₄ solúveis podem ser produzidos por técnicas convencionais de mutagênese dirigida por oligonucleótidos; a digestão de restrição seguida por inserção de ligantes; ou atacando a parte dorsal da proteína T₄ de comprimento total com enzimas.

Alternativamente, os polipeptidos a T₄ solúveis podem ser sintetizados quimicamente por técnicas de síntese de peptídeos convencionais, tais como a síntese em fase sólida R.B. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis. I. the Synthesis of a Tetrapeptide", J. Am. Chem. Soc., 83, págs. 2149-54 (1963) .

As sequências de DNA de acordo com a presente invenção codificam para as proteínas solúveis e os derivados que se consideram ligados aos antígenos do Complexo de Histocompatibilidade Principal e glicoproteínas do revestimento de certos retrovírus tais como HIV. De preferência, inibem também, a formação de "syncytium"

que se considera ser o modo de propagação do vírus HIV intracelular. E podem inibir a interação entre os linfócitos T_4^+ e as células que apresentam antígenos e alvos de células T_4^+ mediadoras da morte. De preferência, ainda podem inibir a adesão entre linfócitos T_4^+ e agentes infecciosos tais como os vírus HIV cujos alvos principais são os linfócitos T_4^+ .

As sequências de DNA desta invenção são também utilizáveis para a produção de T_4 solúvel ou dos seus derivados codificados na expressão por elas nos hospedeiros unicelulares transformados por essas sequências de DNA. Como é bem conhecido na técnica, para a expressão das sequências de DNA desta invenção, a sequência de DNA deveria ser operativamente ligada a uma sequência de controlo de expressão em um vector de expressão apropriado e utilizada nesse vector de expressão para transformar um hospedeiro unicelular apropriado.

Essa ligação operativa de uma sequência de DNA de acordo com a presente invenção a uma sequência de controlo de expressão inclui, evidentemente, o fornecimento de um sinal de início da translação no quadro de leitura correcto a montante da sequência de DNA. Se a sequência de DNA particular desta invenção a ser expressa não começa por uma metionina, o sinal de início resultará em um aminoácido adicional - metionina - estando localizado na posição N-terminal do produto. Embora esse produto que contém metionilo possa ser utilizado directamente nas composições e métodos da presente invenção, é normalmente mais desejável remover a metionina antes da utilização. Na técnica, existem métodos apropriados para remover essas metioninas N-terminais dos polipeptidos expressos com elas. Por exemplo, certos hospedeiros e condições



de fermentação permitem remover substancialmente todas as metioninas de N-terminais in-vivo. Outros hospedeiros necessitam de remoção in vitro da metionina N-terminal. Porém, esses métodos in vivo e in vitro são bem conhecidos pelos especialistas na matéria.

Pode-se utilizar uma larga variedade de associações do vector de expressão/hospedeiro na expressão das sequências de DNA desta invenção. São vectores de expressão utilizáveis, por exemplo, os fragmentos de sequências de DNA cromossomais, não cromossomais e sintéticas tais como vários derivados conhecidos de SV40 e plasmídeos bacterianos conhecidos, por exemplo, plasmídeos de E. coli incluindo col E1, pCR1, pBR322, pMB9 e seus derivados, plasmídeos de uma larga gama de hospedeiros, por exemplo, RP4; DNAs de fagos, por exemplo os numerosos derivados do fago λ , por exemplo, NM989 e outros fagos de DNA, por exemplo, M13 e fagos de DNA de fibra simples filamentosos, plasmídeos de leveduras tais como o plasmídeo 2μ ou respectivos derivados e vectores derivados de associações de plasmídeos e DNAs de fagos tais como plasmídeos que foram modificados para utilizar DNA de fago ou outras sequências de controlo de expressão. Para expressão de células animais prefe-re-se utilizar o plasmídeo pBG368, um derivado de pBG312 LG. Cate et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells", Cell 45, págs. 685-98 (1986) que contém o promotor posterior principal de adenovirus 2. Além disso, qualquer uma da larga gama de sequências de controlo de expressão - sequências que controlam a expressão de uma sequência de DNA quando operativamente ligadas a ela pode ser utilizada nestes vectores para ex

pressar a sequência de DNA da presente invenção. Essas sequências de controlo de expressão utilizáveis, incluem, por exemplo, os promotores anteriores e posteriores de SV40 ou o adenovirus, o sistema lac, o sistema trp, o sistema TAC ou TRC, as regiões promotoras e operadoras principais do fago λ , as regiões de controlo de proteína de revestimento fd, o promotor para a 3-fosfogliceratoquinase ou outras enzimas glicolíticas, os promotores de fosfatase ácida, por exemplo Pho₅, os promotores dos factores que cobrem a levedura α , o promotor do poliedrão do sistema de baculovirus e outras sequências conhecidas para controlar a expressão de genes das células procariotas ou eucariotas ou os seus vírus e as várias associações respectivas. Para a expressão da célula animal, preferimos utilizar uma sequência de controlo de expressão derivada do promotor posterior principal de adenovirus 2.

Uma grande variedade de células hospedeiras unicelulares são também utilizáveis na expressão de sequências de DNA desta invenção. Estes hospedeiros podem incluir hospedeiros eucariotas e procariotas bem conhecidos tais como estirpes de E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, fungos tais como leveduras e células animais tais como CHD e células de ratinho, células de macaco verde Africano, tais como COS 0, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, e BMT 10, células de insectos e células humanas e células de plantas em cultura de tecidos. Para expressão de células animais, prefe-re-se células CHO e células COS 7.

Deve-se entender, certamente que nem todos os vectores e sequências de controlo de expressão funcionarão igualmente bem para exprimir as sequências de DNA da presente invenção. Nem todos



os hospedeiros funcionam também igualmente bem com o mesmo sistema de expressão. Porém, um especialista na matéria pode fazer uma selecção entre estes vectores, sequências de controlo de expressão, e hospedeiros sem experimentação excessiva e sem se afastar do âmbito da invenção. Por exemplo, ao escolher um vector, deve tomar-se em consideração o hospedeiro porque o vector deverá replicar nele. O número de cópias do vector, a capacidade para controlar esse número de cópias e a expressão de quaisquer outras proteínas codificadas pelo vector, tal como marcadores antibióticos devem ser também considerados.

Ao escolher uma sequência de controlo de expressão deve-se também considerar uma variedade de factores. Estes incluem, por exemplo, a força relativa do sistema, a sua controlabilidade e a sua compatibilidade com a sequência de DNA de acordo com a presente invenção, particularmente quanto às estruturas secundárias potenciais. Os hospedeiros unicelulares devem ser escolhidos em função da sua compatibilidade com o vector seleccionado, a toxicidade do produto codificado na expressão pelas sequências de DNA da presente invenção, as suas características de secreção, a sua capacidade para dobrar proteínas correctamente, as suas condições de fermentação e a facilidade de purificação dos produtos codificados na expressão pelas sequências de DNA desta invenção.

Entre estes parâmetros, um especialista na matéria pode seleccionar várias associações de vectores/sistemas de controlo de expressão/hospedeiros que vão expressar as sequências de DNA desta invenção na fermentação ou na cultura animal em larga escala, por exemplo células CHO ou células COS 7.

Os polipeptidos produzidos na expressão de sequências de DNA da presente invenção podem ser isolados a partir da fermentação ou culturas de células animais e purificados utilizando qualquer um dos métodos convencionais. Um especialista na matéria pode seleccionar as técnicas de isolamento e purificação mais apropriadas sem se afastar do âmbito desta invenção.

Os polipeptidos produzidos na expressão de sequências de DNA desta invenção estão essencialmente isentos de outras proteínas de origem humana. Deste modo, são diferentes das proteínas T₄ purificadas a partir dos linfócitos humanos.

Os polipeptidos de acordo com a presente invenção são eficazes em composições e métodos imunoterapêuticos. Por exemplo, os polipeptidos desta invenção são activos na inibição da infecção por agentes cujos alvos principais são linfócitos T₄⁺ por interferência com as suas interações com esses linfócitos-alvos. De preferência, os polipeptidos desta invenção podem ser utilizados para saturar os locais dos receptores de T₄ dos agentes infecciosos alvejados com T₄. Deste modo, exercem actividade antiviral por ligação competitiva com locais dos receptores de T₄ das superfícies das células. Este efeito é de extrema utilidade em doenças, tais como SIDA, ARC e infecção de HIV. Por consequência, os polipeptidos e os métodos desta invenção podem ser utilizados para tratar seres humanos que possuem SIDA, ARC,, infecção de HIV ou anticorpos para HIV. Além disso, estes polipeptidos e métodos podem ser utilizados para o tratamento de doenças semelhantes à SIDA provocadas por retrovirus, tais como virus de imunodeficiência simiesca em mamíferos incluindo seres humanos.

De acordo com uma forma de realização desta invenção, pode-se utilizar anticorpos para proteínas T₄ solúveis e polipeptidos no tratamento, prevenção ou diagnóstico da SIDA, ARC e infecção de HIV.

Os polipeptidos desta invenção podem também ser utilizados em associação com outros agentes terapêuticos utilizados no tratamento da SIDA, ARC e infecção de HIV. Por exemplo, os polipeptidos T₄ solúveis podem ser utilizados em associação com agentes anti-retrovirais que bloqueiam a transcriptase inversa, tais como AZT, HPA-23, fosfonoformato, suramina, ribavirina e didesoxicitidina. Adicionalmente, estes polipeptidos podem ser utilizados com agentes anti-virais tais como interferões, incluindo interferão alfa, interferão beta e interferão gama ou inibidores de glucosidase tais como castanospermina. Estas terapias de combinação utilizam vantajosamente dosagens mais baixas desses agentes evitando, desse modo, uma possível toxicidade.

Os polipeptidos de acordo com a presente invenção podem também ser utilizados em técnicas de plasmaferese ou em sacos de sangue para remoção selectiva de contaminantes virais do sangue. De acordo com esta forma de realização da invenção, os polipeptidos T₄ solúveis podem ser acoplados a um suporte sólido, compreendendo, por exemplo, gotas de vidro ou de plástico ou um filtro que é incorporado em uma unidade de plasmaferese.

Adicionalmente, as composições desta invenção podem ser utilizadas como imunossuppressores eficazes na prevenção ou tratamento da doença do enxerto versus hospedeiro, doenças auto-imunes e rejeição de aloenxertos.

As composições desta invenção compreendem tipicamente uma quantidade eficaz imunoterapêutica de um polipeptido de acordo com a presente invenção e um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Os métodos terapêuticos desta invenção compreendem a fase de tratamento dos doentes com essas composições de um modo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

As composições da presente invenção para utilização nestas terapias podem encontrar-se sob variadas formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem sólidas, semi-sólidas e líquidas, tais como comprimidos, pílulas, pós, soluções líquidas ou suspensões, lipossomas, supositórios, soluções injectáveis e de infusão. A forma preferida depende do modo de administração pretendido e da aplicação terapêutica. As composições incluem também, de preferência, veículos e adjuvantes aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico que são conhecidos dos especialistas na matéria.

De um modo geral, as composições farmacêuticas da presente invenção podem ser formuladas e administradas utilizando métodos e composições semelhantes aos utilizados para outros polipeptidos importantes sob o ponto de vista farmacêutico (por exemplo, interferão alfa). Deste modo, os polipeptidos podem ser armazenados na forma liofilizada, reconstituídos com água esterilizada imediatamente antes da administração e administrados pelas vias usuais de administração tais como as vias parentérica, subcutânea, intravenosa, intramuscular ou intralesão. Pode-se utilizar uma dosagem eficaz na gama compreendida entre 0,5 e 5,0 mg/kg de peso do corpo/dia, reconhecendo-se que também podem ser eficazes doses mais



elevadas ou mais baixas.

A presente invenção diz também respeito a receptores solúveis e à utilização em diagnóstico ou a agentes de tratamento virais que atingem ou se ligam a esses receptores. Esses receptores solúveis podem ser utilizados como iscas para absorver agentes virais e para deter o aumento da infecção viral. Alternativamente os agentes assassinos dos vírus podem ser ligados a receptores de proteínas solúveis, proporcionando um modo directo de libertação desses agentes para o vírus.

Mais em particular, os polipeptidos de acordo com a presente invenção são utilizáveis em composições e métodos de diagnóstico para detectar ou controlar o curso da infecção de HIV. Vantajosamente, estes polipeptidos são utilizáveis em variantes de diagnóstico do vírus HIV, independentemente da origem do agente HIV infeccioso.

Por exemplo, as proteínas T_4 solúveis e os polipeptidos de acordo com a presente invenção que possuem uma alta afinidade para HIV, podem ser utilizadas vantajosamente para aumentar a sensibilidade de sistemas de ensaio de HIV agora baseados em anticorpos monoclonais ou policlonais. Mais especificamente, as proteínas T_4 solúveis e os polipeptidos podem ser utilizados para pre-tratar o plasma do teste para concentrar qualquer HIV presente, mesmo em pequenas quantidades, de forma a que seja mais facilmente reconhecido pelo anticorpo. As proteínas T_4 solúveis e os polipeptidos podem também ser utilizados para purificar a proteína gp 120 de revestimento de HIV.

Como alternativa, as proteínas solúveis T_4 e os polipeptídeos da presente invenção podem ser utilizados para substituir os anti-anticorpos de HIV actualmente utilizados em vários ensaios. Estas proteínas T_4 solúveis e os polipeptídeos são referidos em relação aos anti-anticorpos de HIV por duas razões. Em primeiro lugar a T_4 solúvel exibe uma afinidade para HIV de aproximadamente 10^{-9} , um nível que excede os valores de 10^{-7} a 10^{-8} de anticorpos contra HIV. E, embora os anti-anticorpos de HIV sejam mais susceptíveis de serem específicos para os diferentes HIV isolados, as variações de estirpes não deverão afectar um ensaio baseado na proteína T_4 solúvel visto que todos os isolados de HIV devem ser capazes de interaccionar com o receptor T_4 como um pré-requisito para a infecção.

Por exemplo, uma proteína T_4 solúvel ou um polipeptídeo pode ser ligado a um indicador tal como um enzima e utilizado num ensaio ELISA. Aqui o T_4 solúvel actua vantajosamente como uma medida de HIV tanto em uma amostra de teste como em qualquer proteína na gp120 de revestimento isento de HIV.

As formas polivalentes de proteínas T_4 solúveis ou polipeptídeos podem também ser produzidas, por exemplo, por ligação química ou técnicas de fusão genéticas aumentando ainda mais a avidéz de T_4 solúvel para HIV.

Relativamente à presente invenção, para que possa ser melhor compreendida, descrevem-se os exemplos seguintes. Estes exemplos são apenas para ilustração e não devem ser interpretados de modo nenhum como uma limitação ao âmbito da invenção.



EXEMPLOS

Purificação de Proteína T₄ solubilizada natural

Purificou-se T₄ natural a partir da linha de células U937 promonocítica T₄ derivada de um linfoma histocítico até uma pureza aproximada de 50%, mediante cromatografia de imunoafinidade do modo a seguir descrito.

Cultivaram-se células U937 [uma oferta do Dr. Scott Hammer, New England Deaconess Hospital] a 10⁶ células/ml em RPMI 1640, Fcs a 10%, colheram-se e lavaram-se em 1X PBS. Submeteu-se a lise o aglomerado de células em Tris-HCl 20 mM (pH=7,7), NP-40 a 0,5% (um detergente não iônico), NaDOC a 0,2%, EGTA 0,2 mM, PMSF 0,2 mM e 5 µg/ml de BPTI a 4x10⁷ células /ml. Devido a esta purificação ser realizada na presença de um detergente não iônico, a proteína T₄, que está normalmente ligada à membrana através do seu domínio de transmembrana hidrófobo, foi isolada como uma proteína solubilizada. Torceu-se o lisado num rotor GS3 durante 10 m a 10000 rpm e armazenou-se o sobrenadante a -70⁰C.

Subsequentemente, pré-absorveu-se o extracto de células clarificado com Sepharose de IgG de ratinho e a seguir com Sepharose de proteína A e passou-se depois o fluxo através de uma coluna de imunoafinidade compreendendo um anti-anticorpo monoclonal de T₄ imobilizado na Thy na posição 19, sobre Affigel-10 [uma oferta do Dr. Ellis Reinherz, Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts]. Lavou-se extensivamente a coluna e eluiu-se o material ligado com glicina-HCl 50 mM (pH = 2,5), NaCl 0,15 M,



NP-40 a 0,5%, 5 μ g/ml de BPTI e EGTA 0,2 mM.

Separou-se então alíquotas de 10 μ l de cada fracção eluída sobre SDG-PAGE a 10% sob condições de redução, com as bandas a serem visualizadas por coloração de prata. Como se mostra na Figura 1, foi visível uma banda de 55 Kd manchada de prata. Realizaram-se, a seguir, dois ensaios na proteína 55Kd e sequenciou-se a extremidade amino da proteína para confirmar a sua identificação como T₄ solubilizada natural.

Sequenciação de Proteína T₄ solubilizada natural

Determinou-se a sequência de aminoácidos da extremidade da proteína T₄ natural solubilizada, que se isolou a partir de um extracto detergente de células U937 por cromatografia de imunoafinidade como se descreveu antes.

As técnicas para determinação de sequências de aminoácidos de várias proteínas e de péptidos seus derivados são bem conhecidas na técnica. Escolheu-se a degradação automatizada de Edman para determinar a extremidade amino da nossa T₄ natural solubilizada. Mais especificamente, purificou-se sobre gel e electroeluiu-se aproximadamente 5 μ g de T₄ natural solubilizada e depois submeteu-se a uma degradação de Edman automatizada utilizando um sequenciador em fase gasosa (Applied Biosystems 470A). Identificou-se depois os aminoácidos PTH produzidos em cada ciclo da química de Edman por cromatografia em fase líquida alta de pressão, em série com o sequenciador, em um analisador de aminoácidos-PTH (Applied Biosystems 120A). A análise directa da proteína

proporcionou informação acerca da sequência da extremidade amino que, quando comparada com a sequência de aminoácidos deduzida da sequência de cDNA da T₄ humana [Maddon et al. (1985), supra] permitiu identificar a proteína purificada como T₄ humana.

Radioimunoensaio do T₄ solubilizado original

Para comprovar que o processo de purificação utilizado permitiu um enriquecimento em T₄, testámos fracções da fase de eluição de imunoafinidade em um radioimunoensaio de "sanduiche" específico para T₄ baseado no ensaio ELISA de P. E. Rao et al. in Cellular Immunology, 80, págs. 310-19 (1983). Revestiu-se cada recipiente de uma tira de Removawell (Dynatech Labs, Alexandria, Virgínia) com 50 µl de anticorpos OK T₄ a 10 µl/ml (ATCC#CRL8002) ou MOPC195 (um controlo de ligação "background") em tampão de bicarbonato de sódio 0,05M (pH=9,4) a 4°C durante a noite. Lavaram-se os recipientes e depois encheram-se com FCS a 1% em PBS para saturar a capacidade de ligação à proteína do plástico. Após remoção de uma solução FCS a 1%, adicionaram-se amostras de teste, em alíquotas de 50 µl, aos recipientes.

Incubou-se depois as amostras durante 4 horas à temperatura ambiente. Subsequentemente, removeram-se as amostras e lavaram-se os recipientes quatro vezes com Twenn-20 a 0,05% em PBS. Adicionou-se depois anticorpos marcados na T₄ da posição 19 com ¹²⁵I (50000 - 100000 rpm por recipiente) e incubaram-se os recipientes a 4°C durante a noite. Lavaram-se depois os recipientes quatro vezes e separou-se cada um deles para detecção ¹²⁵I ligado em um detector de raios gama de Beckman.



Como se mostra na Figura 1, em que se representaram os valores depois de subtracção do valor correspondente ao "fundo" ("background"), a fracção do pico da proteína T_4 natural solubilizada detectada por radioimunoensaio coincidiu com a eluição da proteína de 55 Kd vista por coloração de prata.

Ensaio de mancha de Western para T_4

Embora muitos anticorpos tenham sido desenvolvidos para detecção do antigene T_4 , nenhum deles é útil para análise da mancha da proteína (informação pessoal do Dr. Ellis Reinherz). Com vista a desenvolver anticorpos úteis para detectar a mancha de Western de T_4 solúvel para seguir a purificação de T_4 e T_4 solúvel recombinante, cultivou-se anti-antisoro T_4 policlonal, hiperimune em coelhos, contra três oligopeptidos T_4 sintéticos. Estes oligopeptidos estão representados na Figura 3 como se segue:

| <u>Oligopeptido</u> | <u>Coordenadas dos aminoácidos</u> |
|---------------------|------------------------------------|
| JB-1 | 44-63 |
| JB-2 | 133-156 |
| JB-3 | 325-343 |

Sintetizaram-se previamente estes peptidos utilizando técnicas de síntese de DNA de fosfoamida convencionais. Veja-se, por exemplo Tetrahedron Letters, 22, págs. 1859-62 (1981). Sintetizaram-se os peptidos em um sintetizador de DNA da Applied Biosystem 380A e purificaram-se mediante electroforese de gel.

(i) Acoplamento de peptidos T₄ a BTG

Acoplou-se cada um dos peptidos à tiroglobulina ("BTG") bovina da proteína do veículo [Sigma, St. Louis, Missouri] de acordo com uma modificação dos procedimentos descritos em J. Rothbard et al. J. Exp. Med. 160, págs. 208-21 (1984) e R. C. Kennedy et al., "Antiserum to a Synthetic Peptide Recognizes the HTLV.III Envelope Glycoproteína", Science, 231, págs. 1556-59 (1986).

Mais especificamente, misturaram-se 10 mg de BTG diluído em 1 ml de PBS com 1,3 mg de éster m-maleimido-benzoil-N-hidroxi-succinimídico (MBS) em 0,5 ml de dimetilformamida ("DMF"). Misturou-se bem a mistura reaccional e fez-se reagir durante cerca de 1 hora a 25⁰C. Subsequentemente, carregou-se a mistura para uma coluna de filtração de gel G25 Sephadex (Pharmacia, Sweden) que tinha sido pre-equilibrada com PBS 0,1M (pH=6,0). Colheram-se depois trinta fracções de eluição de alíquotas de 2 ml e leu-se a absorvância de cada fracção a 280 nm ("A₂₈₀"). Reuniram-se a seguir as fracções dos três picos (15, 16 e 17) para criar o veículo activado.

Dissolveram-se 10 mg de NaBH₄ em 2,5 ml de solução de borato de sódio 0,1M para produzir uma solução de boro-hidreto de sódio. Subsequentemente, diluíram-se, aproximadamente, 8 mg de cada um dos peptidos T₄ sintéticos, JB-1, JB-2 e JB-3 com 1 ml de tampão de borato 0,1M e a seguir misturou-se cada solução com 200 µl da solução de boro-hidreto de sódio incubando a mistura em gelo durante cinco minutos. Aqueceu-se depois cada solução de

peptido a 25°C, levou-se cada solução a pH 1 com HCl 1N (de que resultou a formação de espuma) e a seguir lavou-se cada solução a um pH 7 com NaOH 1N (após a formação de espuma ter parado).

Acoplou-se, depois, cada peptido a BTG mediante adição de 1,2 ml da solução de peptido a 6 ml da solução de veículo activado. Deixou-se a reacção de acoplamento processar-se durante a noite incubando a mistura reaccional à temperatura ambiente.

(ii) Inoculação de Animais de teste

Dissolveu-se cada um dos peptidos acoplados a BTG preparados como se descreveu antes em adjuvante completo esterilizado de Freund até uma concentração final de 1 µg/ml de peptido acoplado em PBS. Subsequentemente, inoculou-se cada um dos três coelhos (Nova Zelândia, branco), injectando cada coelho por via intramuscular com 500 µg de um dos peptidos acoplados. Inoculou-se um quarto coelho (Nova Zelândia, branco), do mesmo modo, com uma mistura dos três peptidos acoplados. Todos os coelhos foram previamente sangrados, antes do crescimento ("boosting") para se estabelecer uma linha de base média para cada resposta a ser medida. Os coelhos foram desenvolvidos durante 6 semanas com 500 µg de peptido acoplado em adjuvante de Freund incompleto.

Recolheu-se o soro a partir de cada coelho, mensalmente, durante 4 meses após a imunização. O soro foi a seguir testado para titular o antipeptido.

(iii) ELISA com soro de antipeptidos contra placas
revestidas por peptidos

Neste ensaio, verificou-se o antisoro desenvolvido em um animal por cada um dos peptidos JB-1, JB-2 e JB-3 liga-se a esses peptidos. Por consequência, esses peptidos são imunogênicos e originam uma resposta nos animais de ensaio.

Para realizar o ensaio, revestimos placas de microtitulação Immulon-2 (Dynatech Labs, Alexandria, Virginia) com 50 μ l por cavidade de 50 μ g/ml de peptido não ligado em PBS e incubaram-se as placas durante a noite a 4°C. As placas revestidas com peptido 46R* que serviram como controles foram tratados de modo idêntico. Lavaram-se depois os pratos 4 vezes com PBS-Tween (0,5%) e 4 vezes com água. As placas foram secas por batimento leve sobre toalhas de papel. Após a secagem das placas adicionaram-se 200 μ l de uma solução de BCS/PBS a 5% a cada cavidade e incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente.

Testamos a seguir as amostras de soro dos coelhos em placas pré-revestidas preparadas como se descreveu antes. Testamos a resposta do anticorpo ao peptido imunogênico para uma diluição

* O Peptido 46 corresponde a aminoácidos ("AA") 728-751 do gene env do genoma de HIV. A numeração do aminoácido corresponde ao descrito para o gene env L. Ratner et al., "Complete Nucleotide Sequence of the AIDS Virus, HTLV-III", Nature, 313, págs. 277-284 (1985). O peptido 46 tem a sequência:

LIPRGPDRPEGIEEEGGDRDR.



inicial de 1:100 seguida de uma sêrie de 10 diluições em FCS/BPS a 5%.

Após duas horas de incubação à temperatura ambiente, lavaram-se as placas e secaram-se por absorção como se descreveu antes. Adicionaram-se a seguir 50 µl de uma diluição de 1:1500 de peroxidase de rãbano ("HRP")-anti IgG de coelho conjugado em ca-bra [Cooper Biomedical, Malvern, Pennsylvania] em FCS/PBS a 5% para cada cavidade e incubaram-se as placas à temperatura ambien-te durante 1 hora. Lavaram-se as placas com PBS-Tween a 0,5% e adicionaram-se depois 50 µl de TMB 0,42 mM. Interromperam-se as reacções enzimáticas com 50 µl de H₂SO₄ 2M e analisaram-se as pla-cas por espectrometria a 450 nm utilizando um leitor de placas de microtitulação [Dynatech Labs, Alexandria, Virginia].

Observou-se que o anti-soro contra cada um dos pēptidos JB-1, JB-2 e JB-3 se ligou ao correspondente peptido. Observou-se também que o anti-soro contra uma mistura de peptidos JB-1, JB-2 e JB-3 se liga aos peptidos JB-1 e JB-3 nas condições descritas antes. As titulações de cada um dos quatro anti-soros testados contra os peptidos na fase sōlida de ELISA são apresentadas a se-guir onde "ND" representa valores não determinados:

| <u>Peptido</u> | <u>Titulação aproximada contra:</u> | | |
|--------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| | <u>JB-1</u> | <u>JB-2</u> | <u>JB-3</u> |
| JB-1 | 1/50,000 | 0 | ND |
| JB-2 | 0 | 1/50,000 | ND |
| JB-3 | 0 | 0 | 1/10,000 |
| JB-1 + JB-2 + JB-3 | 1/4,000 | ND | 1/7,000 |

As fracções Ig provenientes de dois dos três soros anti-peptidos desenvolvidos contra peptidos individuais, anti-JB-1 e anti-JB-2 reconheceram a banda do antigene T_4 de 55Kd de T_4 solubilizado natural em uma análise da mancha de Western de proteína eluída a partir de uma coluna de afinidade de anticorpo monoclonal (anti- T_4) da Thy na posição 19 descrita antes. Como no caso do radioimunoensaio de T_4 solubilizada natural, a detecção da proteína de 55Kd coincide com a sua eluição aparente a partir de uma coluna de afinidade. Isto proporciona outra evidência de que o processo de purificação da proteína T_4 da presente invenção proporcionou um enriquecimento em T_4 solubilizado.

Deste modo, estes soros policlonais são úteis na detecção de quantidades em nanogramas de T_4 (ambas as formas, natural e recombinante) por análise de Western.

Ligação de T_4 livre de células ao revestimento de HIV.

Testou-se a seguir T_4 original solubilizada e purificada a partir de células 4937 para a sua capacidade de ligação com a proteína de revestimento de HIV, gp 160/gp 120. Para realizar este ensaio de ligação directo, incubou-se o extracto de células detergentes gp160 a gp120 marcado com ^{35}S derivado de uma linha de células recombinantes 7d2 (uma oferta dos Des Mark Kowalski e William Haseltine, Dana-Farber Cancer Institute) com amostras de T_4 natural solubilizada, cada uma das quais foi pré-incubada com um tipo de anticorpo monoclonal.

Mais especificamente, misturou-se 5 μ l de T_4 solubilizada

4

em um tubo micrôfugo com 5 µg (cerca de 3 µl) de OKT₄ (ATCC #CRL 8002), um anticorpo monoclonal que reconhece um epítotope sobre T₄, o qual não interfere com a ligação de HIV [J. A. Hoxie et al., J. Immunol. 136, pag. 361-363 (1986)] ou com 5 µg de OKT₄A (Ortho Diagnostics # 7142), um anticorpo monoclonal que interfere com ligação de HIV a células positivas de T₄ [J. Steven McDougal et al., J. Immunol., 137, págs. 2937-2944 (1986)]. Alternativamente misturaram-se 50 µl de T₄ solubilizada com 5 µg de gp120 de HTLV III (Dupont # NEN-9284).

Incubaram-se depois as misturas sobre gelo durante 1 hora.

Subsequentemente, adicionaram-se 150 µl de extracto de células gp160 marcado com gp120³. Sou extracto de células de controlo marcado com ³⁵S (pré clarificado com Sepharose de proteína-A) às misturas de T₄ solubilizada anticorpo monoclonal pré-incubadas e agitaram-se os tubos durante a noite a 4°C. Precipitaram-se a seguir complexos imunes de T₄/gp160/gp120 por adição de 30 µl de Sepharose de proteína-A a cada tubo e agitação durante 2 horas a 4°C para permitir que a Sepharose de proteína-A se ligue aos complexos de anticorpos. Subsequentemente, fizeram-se rolar os grãos num micrôfugo de Eppendorf e após lavagens extensivas eluíram-se com 40 µl de tampão de amostra SDS a 65°C durante 10 minutos. Carregou-se a seguir 20 µl do material eluído em um gel SDS-PAGE a 7,5% que se deixou fluir sob condições de redução.

A Figura 2 representa a auto-radiografia e os resultados da mancha de Western das co-immuno-precipitações de T₄/gp160/gp120. Na

Figura 2, as pistas 1-5 foram auto-radiografadas após tratamento com salicilato de sódio a 40% e as pistas 6-7 foram desenvolvidas em uma mancha de Western com anti-soro JB-2 de coelho.

Como se representa na figura 2, a proteína gp160/gp120 foi co-imune, precipitada na presença de T_4 com OKT₄ (pista 5) mas não na presença de T_4 com OKT₄A (pista 4). A pista 3 mostra o controlo positivo para gp160/gp120 utilizando um anticorpo monoclonal gp120 de α HTLV III. Nenhum controlo negativo com extracto de controlo marcado com ³⁵S (pista 1) ou Sepharose de proteína-A isolada (pista 2) mostrou bandas migradoras na posição de gp160/gp120. Com base nas bandas que se desenvolveram na mancha de Western, a quantidade de T_4 precipitada quer com OKT₄ (pista 6) quer com OKT₄A (pista 7) pareceu ser semelhante.

Isto demonstra que a T_4 natural solubilizada purificada que está naturalmente ligada à membrana pode ainda interagir com a glicoproteína de HIV em solução. Por consequência, pensa-se que a T_4 solúvel livre de células é utilizável na prevenção da interacção de ligação entre HIV e o receptor de T_4 de linfócitos de T_4^+ . Competindo com a T_4 da superfície das células para se ligar à proteína gp120 do revestimento de HIV a T_4 solúvel é útil no bloqueio da infecção de HIV.

Síntese de sondas de DNA de oligonucleótidos

Foi descrita a sequência nucleotídica e uma sequência de aminoácidos deduzida para um cDNA que codifica de modo significativo a proteína T_4 humana completa (Maddon et al. (1985), supra). A es-

estrutura primária deduzida da proteína T₄ revela que pode ser dividida em domínios que se apresentam a seguir:

| <u>Estrutura/localização proposta</u> | <u>Coordenadas dos aminoácidos</u> |
|--|------------------------------------|
| Hidrofobo/sinal de secreção | -23 a -1 |
| Homologia para regiões-V/ /extracelular | +1 a +94 |
| Homologia para regiões-J/ /extracelular | +95 a +109 |
| Região glicosilada/ /extracelular | +110 a +374 |
| Hidrofobo/Sequência de transmembrana | +375 a +395 |
| Muito hidrofílico/intracito- plasmico | +396 a +435 |

Com base na sequência parâmetros domínios listados antes, sintetizaram-se quimicamente sondas de DNA de oligonucleótidos anti-sensação utilizando técnicas convencionais e síntese de DNA de fosfoamida. Ver, por exemplo, Tetrahedron Letters, 22, págs. 1859-62 (1981). Sintetizaram-se as sondas num sintetizador de DNA Applied Biosystems 380A e purificaram-se mediante electroforese de gel.

Além disso, sintetizaram-se as sondas de forma a que se-

jam complementares das sequências de DNA que codificam para a sequência de aminoácidos, isto é, as sondas eram anti-sensação, para as tornar capazes de reconhecer e hibridizar as sequências correspondentes em DNA bem como em mRNA. As sequências nucleótidas das 11 regiões seleccionadas da proteína T₄ [correspondendo à numeração de nucleótidos descrita em Maddon et al., (1985) supra] foram as seguintes:

| <u>Oligonucleótido</u> | <u>Coordenadas de nucleótido</u> |
|------------------------|----------------------------------|
| 1 | 145-171 |
| 2 | 742-765 |
| 3 | 1414-1440 |
| 6 | 427-453 |
| 7 | 1303-1329 |
| 8 | 1012-1038 |
| 9 | 97-118 |
| 10 | 10-36 |
| 11 | 1698-1724 |
| 12 | 397-423 |
| 14 | 261-287 |

Antes da utilização das sondas de DNA, de acordo com a presente invenção, para sondagem, marcou-se na extremidade 5' ca da uma das sondas de DNA de cordão simples com ³²P utilizando [γ -³²P]-ATP e quinase polinucleótida de T₄, substancialmente como descreveu A. M. Maxam e W. Gilbert, "A New Method for Sequency DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, págs. 560-564 (1977),

4

Construção de uma biblioteca de cDNA de linfócitos λ gt10 do sangue periférico

Para preparar a biblioteca de cDNA de linfócitos do sangue periférico (PBL) processou-se PBL proveniente de um dador ("round") de leucoforese simples através de um passo de absorção para remover monócitos. Estimularam-se então as células não aderentes com IFN- γ a 1000 U/ml e PHA a 10 μ g/ml durante 24 horas. Isolou-se RNA a partir destas células mediante extracção com fenol [Maniatis et al., Molecular Cloning, pág. 187 (Cold Spring Harbor Laboratory) (1982)] e preparou-se mRNA de poli A⁺ através de um passo ("round") de cromatografia de celulose oligo dT. Precipitou-se o RNA com etanol, secou-se sob vazio e ressuspendeu-se o RNA em 10 μ l de H₂O (0,5 μ g/ μ l). Tratou-se o RNA durante 10 minutos à temperatura ambiente em CH₃HgOH (5mM de concentração final) e β -mercaptoetanol (0,26M). Adicionou-se depois RNA tratado com metil-mercúrio a Tris-HCl 0,1 M (pH=8,3) a 43^oC, Mg 0,01M, DTT 0,01M, complexo de vanadilo 2mM, 5 μ g de oligo dT₁₂₋₁₈, KCl 20 mM, 1 mM em dCTP d GTP, dTTP, 0,5 mM em dATP, 2 μ Ci [α -³²P]dATP e 30 U 1,5 μ l de transcriptase inversa AMV (Seikagaku America) em um volume total de 50 μ l. Incubou-se a mistura durante 3 minutos à temperatura ambiente e depois durante 3 horas a 44^oC, após o que se interrompeu a reacção mediante a adição de 2,5 μ l de EDTA 0,5M.

Extraíu-se a mistura reaccional com um volume igual de fenol: clorofórmio (1:1) e precipitou-se a camada aquosa duas vezes com 0,2 volumes de NH₄ AC 10 M e 2,5 volumes de EtOH e secou-se sob vazio. O rendimento de cDNA foi 1,5 μ g.



Sintetizou-se o segundo cordão de acordo com os métodos de Okayama e Berg [Mol. Cell. Biol., 2, pág. 161 (1982)] e Gubler e Hoffman [Gene, 25, págs. 263-69 (1983)], com a diferença de utilizar o fragmento grande de DNA polimerase I na síntese.

Cortou-se o cordão duplo de cDNA ressuspendendo o DNA em 80 µl de tampão TA (acetato de Tris 0,033 M (pH=7,8); Acetato de K 0,066 M; Acetato de Mg 0,01 M; DTT 0,001 M; 50 µg/ml de BSA) , 5 µg de RNase A, 4 unidades de RNase H, β NAD 50 µM, 8 unidades de ligase E. coli , 0,3125 mM em dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 12 unidades de polimerase T₄ e incubou-se a mistura reaccional durante 90 minutos a 37°C, adicionou-se 1/20 do volume de EDTA 0,5 M e extraíu-se com uma mistura de fenol: clorofórmio. Submeteu-se a cromotgrafia a camada aquosa em uma coluna Sêphadex G150 eluindo-se com Tris-HCl 0,01 M, (pH=7,5), NaCl 0,1 M, EDTA 0,001 M e recolheu-se a fracção do pico pronunciado que continha o cDNA de cordão duplo e precipitou-se com etanol. Rendimento: 0,605 µg de cDNA.

Ligou-se o cDNA de cordão duplo ao ligante 35/36:

5' AATTCGAGCTCGAGCGCGCCGCG 3'

3' GCTCGAGCTCGCGCCGCG 5'

utilizando processos padrão. Seleccionou-se, depois, o tamanho do cDNA para 800 pb e os fragmentos maiores em uma coluna Sepharil S500 e ligou-se ao vector gt10 do bacteriófago lambda digerido com EcoRI (uma oferta de Dr. Ellis Reinherz). Armazenaram-se alíquotas da mistura reaccional de ligação em Gigapak (Strategene)

4

de acordo com o protocolo do fabricante. Utilizou-se o fago armazenado para infectar células BNN102 de E. coli e plaqueram-se as células para ampliação. A Biblioteca resultante continha $1,125 \times 10^6$ recombinantes independentes. Sondou-se também uma biblioteca de cDNA de PBL no vector λ gt10 do bacteriófago lambda (uma oferta de Dr. Ellis Reinherz), que foi sintetizado a partir de mRNA proveniente de uma linha de células tumorais T_4^+ chamada REX que expressa a proteína T_4 em altos níveis [Acuto et al., "The Human T Cell Receptor: Appearance In Ontogeny and Biochemical Relationship of Lambda and Beta Subunits on TL-2 Dependent Clones and T Cell Tumors", Cell, 34, págs. 717-26 (1983)].

Sondagem das Bibliotecas

Utilizou-se, depois, três das quatro sondas anti-sensação de oligonucleótidos, sintéticas marcadas com ^{32}P , sondas 3, 6 e 9, para sondar em paralelo as duas bibliotecas de cDNA de λ gt10 utilizando a técnica de sondagem de hibridação de placas descrita em R. Cate et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells", Cell, 45, págs. 685-98 (1986) com pequenas modificações. Modificou-se o processo de Cate et al. por hibridação sem cloreto de tetrametilamônio para adaptar à utilização de sondas únicas em vez de misturas, para sondar os filtros de placas.

Utilizaram-se as três sondas que tinham sido previamente marcadas na extremidade 5' com $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{-ATP}$ de acordo com o método de A. Maxam e W. Gilbert, Meth Enzymol, 68, págs. 499-80 (1979) para sondar em paralelo a biblioteca de cDNA de PBL e a

4.

biblioteca de cDNA de REX discutida antes.

Da sondagem da biblioteca de PBL isolou-se um clone de cDNA de T₄ solúvel de comprimento total - λ 203-4 (ou λ gt 10. PBL.T₄) -- que contém uma inserção de 3.064Kb que podia ser clivada a partir de um vector λ gt10 com EcoRI.

A partir da sondagem da cultura de células REX isolou-se um clone de cDNA de T₄ incompleto contendo uma inserção de cDNA de 1200 Bp. Caracterizou-se ainda, a seguir, o DNA destes clones por análise da sequenciação de DNA.

Sondou-se também uma biblioteca genômica humana de bacteriófago lambda construída no vector EMBL3 pelo Dr. Mark Pasek (Biogen Inc., Cambridge, Massachusetts) [N. Murray in Lambda 2, eds. R. Hendrix, J. Roberts, F. Stahl, R. Weisberg, págs. 3935-422 (1983)]. A cultura contém fragmentos de DNA criados pela restrição parcial de DNA cromossômico a partir da linha de células linfoblásticas humanas GM1416, 48, XXXX (Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, New Jersey) com San 3a ligado a partes de EMBL3 que tinham sido submetidas a clivagem com BamHI de acordo com os processos descritos em Maniatis et al., (1982), supra. A plaqueação da biblioteca do fago, a lise e a transferência do DNA do fago sobre nitrocelulose realizaram-se como descreveram W. D. Benton e R. W. David, "Screening of Lambda gt Recombinant Clones by Hybridation to Single Plaques in Situ", Science, 196 págs. 180 (1977) e Maniatis et al., (1982). As condições de hibridação foram as descritas por Cate et al., (1986), supra, excepto que se

4

excluiu o cloreto de tetrametilamônio (TMACl) do tampão de lavagem.

Sondaram-se aproximadamente 2 milhões de placas em hibridações paralelas com a sonda 1 e a sonda 3 referidas antes. Um fago designado CM47, que hibridizou com a sonda 3 nas primeiras sondagens foi submetido a análise de sequência de DNA para determinar a existência e a posição de um intrão entre as sequências de codificação para os domínios de transmembrana e extracelulares previstos. Nenhum clon dos fagos contendo sequências de T₄ foram encontrados por sondagem com a sonda 1, provavelmente porque inclui uma sequência interrompida por um intrão [D. R. Litman e S. N. Gettner, Nature, 325, págs. 453-55 (1987); e segundo as observações da Requerente].

A análise da sequência parcial de CM47 indica que um intrão interrompe a sequência correspondente ao codão para valina (aminoácido 363) da sequência primitiva deduzida para T₄ (Figura 3 - na qual os intrões são indicados por uma linha a cheio). Este intrão define um local potencial para introduzir um codão de paragem com vista a expressar uma forma solúvel de T₄. Um outro intrão encontrado entre a sequência de codificação para T₄ interrompe o codão para arginina (aminoácido 295) e encontrou-se um terceiro intrão em CM47 entre os codões para arginina (aminoácido 402) e arginina (aminoácido 403) (Figura 3).

Sequenciação de clones de cDNA

Em seguida, subclonou-se DNA digerido com EcoRI a partir

do clone λ 203-4 no vector de expressão animal pBG312 [R. Cate et al., supra] para facilitar a análise de sequência. Mais especificamente, como se indica na Figura 4, digeriu-se a seguir λ gt10.PBL.T₄ com EcoRI para estirpar o fragmento EcoRI-EcoRI de 3.064Kpb que contém o cDNA de T₄ de comprimento total. Esta sequência de cDNA incluindo a região de codificação total para T₄ solúvel e para T₄ de comprimento total foi depositada em p170-2. Utilizou-se T₄ ligase para ligar o fragmento ao vector de expressão animal pBG312 [supra] que tinha sido previamente cortado com EcoRI para formar pBG312.T₄ e p170-2 (Figura 4). Determinou-se então a sequência de nucleótidos do fragmento EcoRI de pBG312-T₄ utilizando a tecnologia de Maxam. Gilbert [A. M. Maxam e W. Gilbert, " A New Method for sequencing DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, págs. 560-64 (1977)] [ver fig. 3 que representa a sequência de cDNA de PBL em comparação com a descrita por Maddon et al. (1985), supra]. Esta análise mostrou que a cópia de DNA complementar de comprimento total de PBL de 3.064 Kpb de cDNA de T₄ continha a sequência de codificação para T₄, aproximadamente 200 pb de sequência não codificada na extremidade 5' e aproximadamente 1500 pb de sequência não codificada na extremidade 3'.

Cortou-se, depois pBG312.T₄ com Pst I e removeram-se as extremidades salientes, na posição 3', resultantes com Klenow e isolou-se um fragmento de aproximadamente 2,5 Kpb. Inseriu-se então o fragmento no poliligante de pBG312 (que tinha sido previamente restringido no local SmaI) para formar o plasmídeo p170-2, que contém a sequência de cDNA de T₄ de PBL de comprimento total (ver figura 3).

Como se representa na Figura 3, o cDNA de T₄ de PB₂ contém uma sequência nucleotídica quase idêntica à sequência de aproximadamente 1,700 pb descrita por Maddon et al. (1985), *supra*. O cDNA de T₄ de PBL contém, porém, três substituições nucleotídicas que no produto de translação deste cDNA deverá produzir uma proteína que contém três substituições de aminoácidos comparada com a sequência descrita por Maddon et al. Como se mostra na Figura 3, estas diferenças são na posição 3 do aminoácido onde a asparagina de Maddon et al. é substituída por lisina; a posição 64, onde o triptofano de Maddon et al. é substituído por arginina e na posição 231, onde a fenil-alanina de Maddon et al. é substituída por serina.

A asparagina referida na posição 3 de Maddon et al em vez de lisina foi o resultado de um erro de sequenciação (Dr. Richard Axel, comunicação pessoal). O significado das substituições de aminoácido nas posições 64 e 231 que podem representar polimorfismos alélicos [T. C. *Human Immunology*, 9, págs. 89-102 (1982); W. Stohl e H. G. Kunkel, *Scand. J. Immunology.*, 20; págs. 273-78 (1984); N. Amino et al., *Lancet*, 2, pág. 94-95 (1984); e M. Seto et al., *J. Immunol.*, 132, págs. 1071-73 (1984)]; não é conhecido.

A análise da sequência de DNA [Maxam and Gilbert, *supra*] da inserção em pEC100 do clone REX sugere que representa o produto de um erro de união porque a sequência não codificadora na posição 5' parece ter sido ligada com a sequência de codificação começando com o codão GGT para glicina (aminoácido 49) (ver Figura 3 e Figura 5). A sequência de codificação de T₄ em pEC100* des-

de glicina (aminoácido 49) até isoleucina (aminoácido 435) é idêntica à sequência de Maddon et al., (1985) supra.

Em comparação, a análise da sequência de proteínas N-terminal da proteína T₄ natural purificadas a partir de células 4937 apresenta um produto de expressão de T₄ com asparagina como aminoácido 3. Estas diferenças são também representadas na Figura 6 onde também se comparam as posições correspondentes do clone parcial proveniente da biblioteca de λ gt10 da linha de células REX; o clone genômico de uma biblioteca de λ EMBL3; sequências T₄ do ratinho [tourvieille et al., Science, 234, págs. 610 (1986)] e sequências de T₄ de carneiro. [Classon et al., Immunogenetics, 23, págs. 129 (1986)].

Construção de mutantes de T₄ solúvel

Utilizou-se, então, a técnica da mutagênese dirigida ao local in vitro e da substituição do fragmento de restrição para modificar a sequência de codificação de cDNA de T₄ de p170-2 em passos sequenciais idênticos aos descritos por Maddon et al., (1985), supra. Utilizou-se a mutagênese dirigida aos oligonucleótidos para modificar os aminoácidos nas posições 3 e 64. A seguir,

* Construiu-se pEC100 por digestão incompleta do clone de cDNA de T₄ a partir da biblioteca REX com EcoRI, isolando a inserção de cDNA de 1200 pb. Ligou-se, então, ao pUC₁₂ (Boehringer Mannheim, Indianapolis Indiana) que tinha sido previamente cortado com EcoRI para formar pEC100.

L

utilizou-se a substituição do fragmento de restrição com um fragmento que inclui o codão da serina 231 de um cDNA de T₄ parcial isolado de uma linha de células de linfócitos positivos de T₄ [0. Acuto et al., Cell, 34, págs. 717-26 (1983)] em λ gt11 (uma oferta do Dr. Ellis Reinherz), para modificar o aminoácido na posição 231. Truncou-se então a sequência de cDNA de T₄ modificada para remover as regiões de codificação para os domínios intracitoplásmicos e de membrana. Subsequentemente, construíram-se três mutantes diferentes de T₄ solúvel a partir do clone de T₄ de comprimento total PBL T₄ mediante inserção do ligante entre os locais de restrição com vista a aumentar a probabilidade de encontrar empiricamente uma molécula de T₄ segregável estável. A estrutura de cada um destes mutantes está representada na Figura 7A.

A linha A da Figura 7A representa uma análise de hidropatia de T₄ solúvel de comprimento total realizada utilizando um programa de computador chamado Peplot (University of Wisconsin Genetics Computer Group) de acordo com J. Kyte e R. F. Doolittle, J. Mol. Biol., 157, págs. 105-32 (1982). A linha B representa a estrutura do domínio da proteína de comprimento total T₄ [Maddon et al. (1985) Supra] em que "S" representa a sequência de sinal de secreção, "V" representa a sequência da região variável semelhante a imunoglobulina, "J" representa a sequência da região de ligação semelhante a imunoglobulina, "U" representa a única sequência da região extracelular, "TM" representa a sequência de membrana e "C" representa a sequência da região citoplásmica. Na linha B a sequência de aminoácido de membrana e algumas sequências de flaqueamento são representadas a seguir ao domínio TM. A linha C representa a estrutura do domínio de pro-



teína de mutantes T_4 solúveis recombinantes rs T_4 .1 em pBG377, rs T_4 .2 em pBG380 e rs T_4 .3 em pBG381. A linha D' representa a estrutura do domínio de proteína do gene rs T_4 de E. coli (construção de Met-perfeita) (p199-7) que é eliminado para a sequência (5) de sinal N-terminal de T_4 .

Construiu-se o primeiro dos três fragmentos do gene mutante de T_4 solúvel truncando o cDNA de T_4 solúvel de comprimento total nas posições correspondentes a quaisquer limites de intrão/exão ou aos limites dos domínios da proteína definidos pelas previsões da análise de hidropatia. Mais especificamente introduziram-se ligadores sintéticos no local AvaI único que está na extremidade 5' em relação ao limite do domínio extracelular/transmembrana para produzir um codão de parada translacional na estrutura ("in-frame"), construindo deste modo, genes de T_4 da sequência de T_4 de comprimento total que carecem de domínios citoplásmicos e de transmembrana.

Por exemplo, o mutante rs T_4 .1 em pBG377 foi truncado por inserção de um codão de parada a seguir ao aminoácido 362, lisina, que corresponde à posição de um intrão separando os exões de domínio da transmembrana e extracelular. As posições deste intrão e do intrão adjacente que dividem os domínios citoplásmicos e de transmembrana foram determinados pela análise da sequência de DNA de clones de T_4 cromossômicos isolados da biblioteca genômica λ EMBL3 descrita antes. Embora o significado das posições do intrão flanqueando o domínio de transmembrana T_4 não seja conhecido, a determinação da estrutura genética podia proporcionar informação importante para designar mutantes rs T_4 visto que

os exões definem frequentemente domínios funcionais [W. Gilbert, "Why Genes in Pieces?", Nature 271, pág. 501 (1978)].

Construiu-se então, o mutante rsT₄.2 em pBG380 truncando o cDNA de T₄ no limite dos domínios extracelulares e de transmembrana no aminoácido 374 e mutante rsT₄.3 em pBG381 truncando o cDNA de T₄ no aminoácido 377, três aminoácidos na jusante do limite do domínio extracelular/transmembrana e entre o domínio de transmembrana.

Utilizou-se também a técnica da mutagênese dirigida ao local do oligonucleótido de acordo com D. Strauss et al., "Active Site of Triosephosphate Isomerase: In Vitro Mutagenesis and Characterization of an Altered Enzyme", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, págs. 2272-76 (1985), para construir um quarto mutante de T₄ solúvel a partir do clone PBL T₄ de T₄ de comprimento total. A estrutura deste mutante é apresentada na Figura 7A, linha D, que representa a estrutura do domínio de proteína do gene rsT₄ de E. coli (rs.T₄.2 Met-perfeita) construído, depositado em p199-7 e que é eliminado para a sequência de sinal N-terminal (S) de T₄.

Construíram-se também vários outros mutantes de eliminação de T₄ solúvel para determinar qual o fragmento mais pequeno da sequência de T₄ que proporciona uma proteína que se liga ao HIV. Estas construções basearam-se na convicção que apenas a sequência do terminal amino de T₄ é requerida para ligação com HIV. Esta convicção, por sua vez, baseou-se em observações em que o anticorpo monoclonal OKT₄A bloqueia a infecção de células positivas de T₄ por HIV e parece reconhecer um epítoto na porção amino de

L

T_4 [Fuller et al. supra]. Esses fragmentos de T_4 que carecem de glicosilação e que são capazes de se ligarem a HIV e bloquearem a infecção podem ser produzidos em E. coli ou sintetizados quimicamente.

A estrutura de cada um destes mutantes de eliminação, e descrita na Figura 7B. Nesta Figura, a linha A descreve a estrutura de domínio da proteína de T_4 de comprimento total [Maddon et al., (1985), supra; figura 7A]. Na linha B a estrutura de proteína dos mutantes T_4 solúveis recombinantes são descritos como se segue: $rsT_4.7$ em p203-5, $rsT_4.7$ em pBG392, $rsT_4.8$ em pBG393, $rsT_4.9$ em pBG394, $rsT_4.10$ em pBG395, $rsT_4.11$ em pBG397, $rsT_4.12$ em pBG396, $rsT_4.111$ em pBG215-7, $rsT_4.113.1$ em pBG211-11 e $rsT_4.113.2$ em pBG214-10.

Construíram-se derivados de T_4 solúveis p203-5, pBG392, pBG393, pBG394 e pBG396 truncando o gene $rsT_4.2$ após os locais StuI nos aminoácidos 183 e 264 de $rsT_4.2$. Mais especificamente, construiu-se o derivado $rsT_4.7$ em p203-5 e em pBG392 truncando o cDNA de $rsT_4.2$ no aminoácido 182 e construiu-se cada um dos derivados $rsT_4.9$ em pBG394 e $rsT_4.12$ em pBG396 truncando o cDNA de $rsT_4.2$ nos aminoácidos 113 e 166, respectivamente. Pode-se também construir cada um dos derivados $rsT_4.10$ em pBG395 e $rsT_4.11$ em pBG397 truncando o cDNA de $rsT_4.2$ nos aminoácidos 131 e 145, respectivamente.

4

Expressão de T₄ e polipéptidos de T₄ solúveis em células bacterianas

As sequências de cDNA de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas para transformar células hospedeiras eucariotas e procariotas mediante métodos bem conhecidos da técnica para produzir polipéptidos de T₄ solúvel recombinantes em quantidades utilizáveis clínica e comercialmente.

Por exemplo, construiu-se o vector de expressão p199-7 como se representa na Figura 9A.

Precedeu-se a construção descrita na Figura 9A pela construção de vários plasmídeos intermédios como se indica nas Figuras 8A-8D. Estas construções realizaram-se utilizando técnicas recombinantes convencionais. Os ligantes utilizados nessas construções são representados na Figura 10.

Como se mostra nas Figuras 8A e 8B, partindo de p170-2 que contém a sequência de DNA de T₄ de comprimento total, codificando para T₄, caracterizado pelos três aminoácidos diferentes dos de Maddon et al., (1985), supra, produziu-se várias construções que dirigem a expressão de T₄ solúvel. Algumas destas construções são caracterizadas pelo facto de uma ou mais destas diferenças de aminoácidos ter sido alterada para corresponder aos respectivos aminoácidos de Maddon et al. Nesta figura, bem como nas outras figuras, as alterações de aminoácidos são salientadas por um seta.

L

O plasmídeo p192-6 contém a sequência de $rsT_{4,2}$ Met-perfeita derivada mediante mutagênese dirigida ao local do oligonucleótido que removeu toda a sequência de sinal N-terminal de T_4 , como se mostra na Figura 8c. E, para proporcionar um meio conveniente de transferir a sequência de $rsT_{4,2}$ Met-perfeita para os vectores de expressão E. coli, os passos descritos na Figura 8D foram realizados para produzir p195-8, um plasmídeo contendo a sequência $rsT_{4,2}$ Met-perfeita flanqueada pelos locais de restrição ClaI. A fita ClaI-ClaI de p195-8 otimiza a distância entre o local ClaI na posição 5' e o codão Met de iniciação. Na Figura 8D, ST_8 rop^- é um plasmídeo baseado em pAT153 que codifica a resistência à tetraciclina, contendo a mutação rop^- que permite um número de cópias de plasmídeos elevado, um local de ligação ao promotor e ao ribossoma do gene 32 do bacteriófago e a sequência de terminação de transcrição do gene 32.

A clivagem de p195-8 com ClaI produziu o fragmento utilizado para reunir p199-7, uma construção que dirige a expressão de $rsT_{4,2}$ Met-perfeita sob o controlo do promotor P_4 (Figura 9A). Como o primeiro passo para construir um vector a partir do qual a expressão de $rsT_{4,2}$ está sob controlo do promotor PL, construiu-se o vector p197-12 a partir de p1034(p1muGCSF) (Figura 9A).

Cortou-se depois p1034 com EcoRI e BamHI para extirpar a inserção de cDNA, GCSF, e uma porção do ribossoma mu do fago ligando a sequência do local - que subsequentemente se reconstruiu com oligonucleótidos. Os ligantes sintéticos utilizados foram ligantes 57-60 (Fig. 10).

Ligou-se então o ligante sintético a p1034 cortado com EcoRI/BamHI para formar p197-12. Podia-se, em vez disso, substituir estes passos iniciando com qualquer vector de expressão de E. coli apropriado contendo um local ClaI colocado de modo apropriado entre as sequências do promotor e do interruptor ("terminado 4"). Cortou-se p197-12 com ClaI e inseriu-se uma fita de ClaI - ClaI contendo a sequência de cDNA de $rsT_{4,3}$ em pBG381 e o interruptor de transcrição do fago derivado de p1034. A sequência desta fita é representada na Figura 11. O plasmídeo resultante p199-7 contém o gene de $rsT_{4,2}$ "Met-perfeito" nesse vector.

Alternativamente, podia-se derivar a sequência de $rsT_{4,2}$ "Met-perfeita" do plasmídeo pBG380 depositado em relação com este pedido de patente de invenção e entalhar ("gap out") a sequência de sinal para criar p192-6.

Testou-se para a expressão de p199-7 como se segue. SG936, um mutante duplo de E. coli lon htrp [ATCC 39624] [S. Goff e A. Goldberg, "ATP-Dependent Protein Degradation in E. coli", in Maximizing Gene Expression, W. Reznikoff e L. Gold (eds.) (1986)] foi transformado com p199-7 por processos convencionais [Mariatis et al. (1982)] para formar SG936/p199-7, um transformante que contém um plasmídeo com o gene $rsT_{4,2}$ "Met-perfeita" atrás do promotor PL. Os transformantes foram seleccionados em placas de LB-agar contendo 10 mcg/ml de tetraciclina (tet). Após marcação de várias colônias simples para isolamento simples da colônia escolheu-se uma ao acaso para testar a indução da síntese de $rsT_{4,2}$. Apanhou-se uma colônia simples de uma placa tet⁺ de 213-agar em 20 ml de Luria Broth (LB) e 10 mg /ml de tet num frasco de agita

ção de 125 ml e desenvolveu-se durante a noite numa incubadora em agitação por ar (New Brunswick Scientific, New Jersey) a 30°C.

Iniciou-se depois, uma cultura de indução por adição de 0,5 ml da cultura da noite a 50 ml de LB e tet, num frasco de 500 ml, que se desenvolveu a 30°C numa incubadora com agitação por ar. Quando a cultura atingiu um valor de DO (600) de 0,4, transferiu-se para um banho de água à temperatura de 42°C e agitou-se suavemente durante aproximadamente 20 minutos. Após a indução de calor a 42°C, o frasco foi transferido para uma incubadora de ar a 39°C (New Brunswick Scientific, New Jersey) onde foi agitado vigorosamente a 250 rpm. Recolheram-se amostras imediatamente após o choque térmico a 42°C e hora a hora durante 4 horas e, finalmente, após o desenvolvimento durante a noite. As amostras foram medidas durante o desenvolvimento por DO (600) e analisadas seguindo-se SDS-PAGE durante o curso da síntese de proteínas mediante coloração de proteína por azul de Coomassie e por análise da mancha de Western com as sondas de anticorpos de antipeptidos de coelho (descritas antes). Com base no peso molecular relativo e na análise da mancha de proteína, a expressão de rT_{4,2} foi induzida a partir de SG936/p 199-7 seguindo-se a indução de calor a 42°C (Figura 12). Transformou-se p199-7 em um vector de expressão Plmu-tet, um vector de expressão de E. coli, no local Clal único (Ver Figura 11). As sequências de aminoácidos e de nucleótidos de p199-7 estão representadas na Figura 11.

A expressão de T₄ solúvel de p199-7 em E. coli foi medida por análise da mancha de Western dos extractos totais das células seguindo-se SDS-PAGE utilizando anticorpos de antipeptidos

JB-1 ou anti-peptidos JB-2 policlonais de coelho como sondas (Fig. 12).

Construiu-se também o vector de expressão p203-5 como se mostra na Figura 9B a seguir.

Começou-se com p197-7 que tem a mesma sequência que o vector p197-12 de P_L (ver Figura 9A), excepto que existe uma deleção simples de nucleótidos na região não codificadora 5' a seguir ao promotor P_L . Essa deleção que é uma deleção do nucleótido #40-adenina- de p197-12 (ver Figura 11) resultou de uma deleção na região que foi construída a partir de ligantes de 57-60 (ver Figura 10). O p197-7 contém o gene $rsT_4.2$ que compreende 374 aminoácidos. Alternativamente, podia-se também utilizar p197-7 como um plasmídeo de iniciação.

Cortou-se p197-7 com ClaI. Cortou-se também p195-8 (ver Figuras 8D e 9A) com ClaI, para remover a fita ClaI-ClaI, que contém a sequência de cDNA de $rsT_4.2$. Subsequentemente, inseriu-se a fita ClaI-ClaI em p197-7 para produzir p198-2.

Digeriu-se a seguir, p198-2 com StuI para remover 80 aminoácidos (aminoácido 185 até ao aminoácido 264) de sequência de codificação da proteína T_4 madura. Metilação inesperada, porém, evitou o corte no segundo local StuI, de forma que apenas o local StuI no aminoácido 184 foi clivado. A seguir à ligação o DNA do plasmídeo foi transformado em E. coli e examinaram-se vários clones de plasmídeos para a eliminação, utilizando processos padrão. Nenhum destes plasmídeos continha a deleção de StuI es-

L.

perada.

A análise subsequente da sequência de DNA de um destes plasmídeos, chamado p203-5, mostrou que dois resíduos de guanina (ver aminoácidos 183 e 184; nucleótidos 818 e 819 da Figura 3) da sequência de reconhecimento de StuI tinham sido eliminados a seguir à clivagem, devido à digestão de exonuclease provocada pela utilização da enzima StuI contaminada com exonuclease. Esta eliminação de dinucleótido produziu uma mudança da estrutura de translação a seguir ao aminoácido 182 (glutamina) e introduziu-se um codão de paragem a jusante dos seis codões de aminoácidos por meio de um deslocamento da estrutura (Figura 9c). A metilação inesperada do segundo local de StuI simultânea com a deleção deu origem a um novo codão de paragem que produziu um gene codificando uma estrutura encurtada de T_4 solúvel recombinante, chamado $rsT_4.7$. A sequência de $rsT_4.7$ codifica um segmento N-terminal do aminoácido 182 da sequência de T_4 madura seguida de seis aminoácidos na extremidade C-asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina- de sequências de não- T_4 e finalmente de um codão de paragem TAA.

A expressão de T_4 solúvel a partir de p203-5 em E. coli foi medida pela análise da mancha de Western como previamente se descreveu.

Expressão de T_4 solúvel e de polipeptídeos de T_4 em células animais

Inseriram-se genes T_4 solúveis e o gene não modificado que codificam T_4 ligado à membrana em um vector pBG368 de expressão animal

4

Mais especificamente, inseriu-se cada uma das construções dos genes solúveis em pBG368 sob o controlo transcricional do promotor posterior do adenovirus para proporcionar plasmídeos pBG377, pBG380 e pBG381.

Fizeram-se também duas construções baseadas em pBG312, chamadas pBG378 e pBG379 que dirigiram a expressão da proteína recombinante T₄ de comprimento total. pBG378 e pBG379 codificam para a mesma proteína de comprimento total mas em pBG379 removeu-se uma porção de sequência, que não sofreu translação na posição 3'. Subsequentemente para testar a expressão de T₄ solúvel recombinante e T₄ de comprimento total recombinante submeteram-se a co-transfecção células de ovários de cricetos chineses ("CHO") utilizando uma de cada um desses plasmídeos e o plasmídeo pAdd26.

Construiu-se, em primeiro lugar, pBG368 como se segue. Como se descreveu na Figura 13, cortou-se o vector de expressão pBG312 da célula animal [R. Cate et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells", Cell, 45, págs. 685-98 (1986)] com EcoRI e BglII para eliminar um dos dois locais de restrição EcoRI e um dos dois locais de restrição BglII (o local EcoRI na posição 0 e o local BglII localizado aproximadamente na posição 99). O plasmídeo resultante, pBG368, reteve um local EcoRI na região de clonagem e um local BglII após a região de clonagem. Isto deixou um único local EcoRI e um único BglII no poliligante para fins de clonagem.

Mais especificamente, eliminou-se um local EcoRI e um local BglII mediante digestão parcial e sequencial de pBG312 com

enzimas de restrição EcoRI e BglII, respectivamente. Preencheu-se com Klenow e 4 nucleótidos novamente ligados para produzir pBG368 que contém locais de restrição únicos para enzimas EcoRI e BglII. Uma vez verificada a expressão transitória de T_4 solúvel construíram-se linhas de células estáveis que expressaram continuamente T_4 . Para fazer isto, utilizou-se o hospedeiro de expressão celular estável, a linha de células de ovários de cricetos chineses do mutante de deleção de di-hidrofolato redutase (DHFR⁻) [F-Kao et al., "Genetics of Somatic Mammalian Cells X Complementation Analysis of Glycine - Requiring Mutants", Proc. Natl. Acad. Sci., 64, págs. 1284-91 (1969); L. Chasin e G. Urlaub "Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity", Proc. Natl. Acad. Sci., 77, págs. 4216-80 (1980)].

Utilizando este sistema, submeteu-se a co-transfecção cada um dos genes T_4 construídos com pAdA26 [R. J. Kaufman e P. A. Sharp, "Amplification and Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Genes", J. Mol. Biol., 159, págs. 661-21 (1982)] contendo o gene DHFR de rato. Antes de realizar as co-transfecções, linearizaram-se todos os plasmídeos mediante clivagem de enzimas de restrição e, antes da transfecção, misturou-se cada um dos plasmídeos com pAdd26 de forma que a razão molar de pAdd26 para T_4 fosse de 1:10. Isto maximizou o nº de cópias do gene T_4 por transfectante.

Dentro da célula, ligaram-se os plasmídeos em conjunto para formar polímeros que podem ficar integrados nas sequências cromossômicas do hospedeiro por recombinação ilegítima [J. Haynes e C. Weisemann, "Constitutive, Long-Term Production of Human Inter

ferons by Hamster Cells Containing Multiple Copies of a Cloned Interferon Gene", Nucl. Acids Res., 11, págs. 687-706 (1983) S. J. Scahill et al., "Expression and Characterization of the Product of a Human Immune Interferon cDNA Gene in Chinese Hamster Ovary Cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, págs. 4654-58 (1983)7, Seleccionaram-se transfectantes que expressam o gene DHFR dos ratinhos em meios de cultura que carecem de nucleótidos, Submeteram-se então estes transfectantes a uma série de concentrações crescentes de metotrexato, um análogo folato tóxico que se liga a DHFR, para seleccionar níveis de células de DHFR,

A resistência ao metotrexato por expressão aumentada de DHFR é frequentemente o resultado da amplificação do gene DHFR que pode incluir a reiteração de segmentos cromossômicos grandes, chamados unidades amplificadas [R. J. Kaufman e P. A. Sharp, "Amplification and Expression of Loss of Dihydrofolate Reductase Genes in a Chinese Hamster Ovary Cell Line", Molec. Cell. Biol., 1, págs. 1069-76 (1981)7. Por consequência, a co-integração de sequências DHFR e rsT_4 permitiram a amplificação de genes rsT_4 . As linhas de células transfectadas de modo estável foram isoladas por clonagem em meio de crescimento selectivo, sondadas depois para expressão de T_4 com um antígeno T_4 (RIA) [D. Klatzmann et al., Nature, 312, págs. 767-768 (1984)7 e por imunoprecipitação a partir de meio condicionado após marcação metabólica da cisteína com ^{35}S (" ^{35}S -Cys").

Inseriu-se também o gene $rsT_{4,7}$ derivado de T_4 solúvel com um plasmídeo de expressão de células animais, como se segue,

4

Como se descreve na Figura 14C, cortou-se o plasmídeo pBG381 (Figura 14A) com EcoRI e NheI. Cortou-se depois p186-6 com EcoRI e NheI para remover o fragmento de 786 pares de bases e ligou-se o fragmento pBG381 digerido para formar o plasmídeo pBG391. A sequência de T₄ em pBG391 é idêntica à descrita em Maddon et al. (1985) supra nas posições 64 (triptofano) e 231 (fenilalanina) e à sequência de pBG381. Porém, na posição 3, a asparagina descrita por Maddon et al. e presente em pBG381 está substituída por lisina. A sequência de nucleótidos de pBG391 está representada na Figura 15.

Digeriu-se a seguir, p203-5 com NheI e OxaNI para remover o fragmento de 483 pares bases. Inseriu-se esse fragmento em pBG391 digerido com NheI/OxaNI para formar o plasmídeo pBG392, a construção da expressão de célula animal de rsT₄.7. A sequência de T₄ em rsT₄.7 contém aminoácidos idênticos aos da sequência de comprimento total de Maddon et al. nas posições de aminoácido 64 (triptofano) e 231 (fenilalanina). Porém, na posição 3, a asparagina descrita por Maddon et al está substituída por lisina. A sequência de nucleótidos de pBG392 está representada na Figura 16.

Na Figura 14D, representa-se a construção de outras construções de expressão de célula animal contendo sequências que codificam as deleções rsT₄.9 em pBG394 e rsT₄.12 em pBG396. Essas construções realizaram-se utilizando técnicas de recombinação convencionais. Os ligantes utilizados nessas construções estão representados na Figura 18. As sequências de nucleótidos de pBG394 e pBG396 representam-se nas Figuras 19 e 20.

L.

O plasmídeo pBG393 apresentado na Fig. 17 contém $rsT_4,8$, a forma perfeita de $rsT_4,7$. pBG393 contém 182 aminoácidos da sequência de T_4 madura, sem os 6 aminoácidos não- T_4 na extremidade C a seguir ao aminoácido 182. A sequência de nucleótidos de BG393 está representada na Figura 21. Podem-se construir outros plasmídeos de expressão de célula animal, de acordo com esta invenção, como se mostra na Figura 17. Incluem $rsT_4,10$ em pBG395 e $rsT_4,11$ em pBG397 (ver Figura 18 para ligantes específicos).

A sequência nucleotídica de BG395 está representada na Figura 22.

Purificação de T_4 solúvel recombinante

A construção de T_4 solúvel recombinante pBG380 expressa em células DHFR⁻ CHO foi desenvolvida para confluenciar em um meio de Eagles α -modificado (Gibco) suplementado com soro fetal de vitela, a 10%, glutamina 1mM e antibióticos de penicilina e estreptomomicina (100 μ g/ml de cada um). As células foram desenvolvidas a 37°C em dois 21 Cell Factory Systems (Nunc). Lavaram-se depois as células confluentes livres de soro fetal de vitela com meio de Eagles α -modificado sem soro fetal de vitela e cultivaram-se as células nesse meio a 37°C durante 4 dias. Subsequentemente co-
lheu-se o meio condicionado, filtrou-se através de um cartucho de filtro hidrófilico de 0,22 μ Millipore Millidisk (Millipore # M. CGL 305-01) e concentraram-se as proteínas segregadas em uma coluna de permuta iônica do tipo S rápida (S-Sepharose Fast Flow, Pharmacia # 17-0511-01) em tampão de MES 20 mM (pH 5,5).



Eluíram-se então as proteínas ligadas com Tris-HCl 20mM (pH7,7) e NaCl 0,3 M. A quantidade eluída foi subsequentemente diluída com 2 volumes de Tris-HCl 20mM (pH=7,7 e foi depois carregada para uma coluna que compreende anticorpos monoclonais anti-T₄ imobilizados na Thy posição 19, acoplados a Affigel-10 [uma oferta do Dr. Ellis Reinherz, Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts]. Lavou-se a coluna extensivamente e eluíu-se o material ligado sob a forma de fracções de 0,5 ml com glicina-HCl 50 mM (pH 2,5), NaCl 150 mM, EGTA 0,1 mM e 5 µg/ml de inibidor de tripsina pancreática de bovino, Aprotinina (Sigma # A1153). Utilizaram-se manchas de Western desenvolvidas com anti-soro de coelho contra peptídeos JB-2 a seguir à purificação. Utilizaram-se geles manchados de prata para seguir a ligação e a eluição de rsT₄.2 durante a cromatografia. A Figura 23 representa um gel manchado de Coomassie de rsT₄.2 purificado.

A análise por cromatografia em coluna por calibração de gel do rsT₄.2 purificado a partir da linha de células de CHO transfectada com pBG380, BG380G, sugeriu que rsT₄ é monomérico sob condições fisiológicas de pH e de concentração salina.

Sequenciação de proteína T₄ solúvel recombinante

Em seguida, determinou-se a sequência de aminoácidos N-terminal de uma T₄ solúvel recombinante, especificamente rsT₄.2, molécula purificada a partir do meio condicionado da linha de células de CHO transfectada com pBG380, BG380G, como se descreveu antes, mediante degradação de Edman automática em um sequenciador

em fase gasosa Applied Biosystems 470A [R. B. Pepinsky et al.,
J. Biol. Chem., 261, págs. 4239-46 (1986)].

A sequência amino-terminal coincidiu com a sequência que
 tinha sido previamente determinada para T₄ natural solubilizada
 isolada de células U937, supra. As sequências amino-terminais de
 proteínas T₄ solubilizada natural (sT₄) e rsT₄ purificada são pro-
 teínas $\Delta 2$, quando comparadas com as sequências amino-terminais
 previstas por Maddon et al., (1985), supra, com a extremidade ami-
 no madura localizada na posição 3 dessa sequência. As sequências
 amino-terminais de T₄ natural solubilizada (sT₄), T₄ solúvel re-
 combinante rsT_{4.2} segregada por BG380G transfectante de CHO con-
 tendo pBG380 e a sequência de proteína deduzida por Maddon et al.
 (1985), supra são como se segue:

sT₄: X-K-V-V-L-X-K-K-X-D-T-V-E-L-T-X-T-A-S-E

rsT_{4.2}: N-K-V-V-L-G-K-K-G-D-T-V-E-L-T-X-T-A-S-E

Maddon Q-G-N-K-V-V-L-G-K-K-G-D-T-V-E-L-T-C-T-A-S-E
 et al.

Nas sequências anteriores, os aminoácidos são representa-
 dos por códigos de letras simples como se segue:

| | | | | | | | |
|------|---|------|---|------|---|------|---|
| Phe: | F | Leu: | L | Ile: | I | Met: | M |
| Val: | V | Ser: | S | Pro: | P | Thr: | T |
| Ala: | A | Tyr: | Y | His: | H | Gln: | Q |
| Asn: | N | Lys: | K | Asp: | D | Glu: | E |
| Cys: | C | Trp: | W | Arg: | R | Gly: | G |

X: não determinado ou ambíguo

4.

Construímos também pBG211-11, um codificador para os 113 aminoácidos N-terminais da proteína T₄ solúvel. Esta construção, que codifica para uma proteína caracterizada por uma ponte de disulfureto simples, entre as cisteínas nas posições de aminoácido 18 e 86, é expressa convenientemente em E. coli.

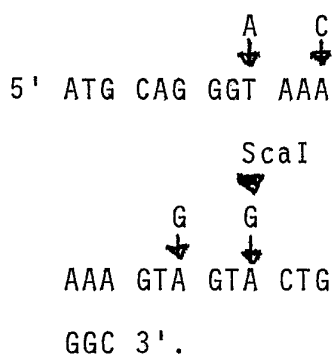
Para construir p211-11 como se mostra na Figura 24, corta-se o primeiro p195-8 (ver Figuras 8D e 9A) com ClaI para remover a fita ClaI - ClaI que contém a sequência de cDNA de rsT₄.2. Digeriu-se depois, pAT₁53 γ 3SH16 Δ Amp; o plasmídeo do promotor operão de triptofano a partir do interferão gama produzindo a estirpe E. coli BN374 com ClaI e eliminou-se o cDNA que codifica para o interferão gama. Subsequentemente, inseriu-se a fita ClaI - ClaI no plasmídeo de E. coli cortado por ClaI na parte da frente do promotor operão triptofano e ligou-se para produzir p196.10.

Como se mostra na Figura 25, submeteu-se pBG380 a mutagenese dirigida para o oligonucleótido para inserir três codões de paragem translacionais em série seguindo a sequência de cDNA de T₄ que codifica para os aminoácidos 23 a 113 em pBG380, para produzir pBG394.

Construiu-se depois p211-11 a partir dos fragmentos de cada um dos p-196-10, pBG394 e p1034 como se mostra na Figura 26. O primeiro fragmento que inclui as sequências do vector foi produzido por restrição de p196-10 com HindII e ClaI para remover a sequência de codificação da T₄ a partir dos aminoácidos 61 a 374 de rsT₄.2 incluindo a sequência de vector a seguir à extremidade

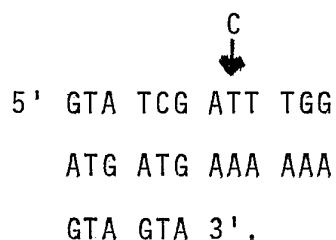
3' do gene rsT_4 . O segundo fragmento, um segmento HindIII - BglIII que inclui ps codões para os aminoácidos de T_4 61-113 de rsT_4 .⁹ seguido imediatamente por um triplete de codões de paragem em série, foi isolado por digestão com HindIII/BglIII de pBG394. O terceiro fragmento, um fragmento BamHI-ClaI que contém um sinal terminação transcricional T_4 de bacteriófago ϕ H. N. Kirsch e B. Allet, "Nucleotid Sequences Involved in Bacteriophage T_4 Gene 32 Translational Self-Regulation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, págs. 4937-41 (1982)⁷ foi isolado por digestão com BamHI/ClaI de p1034. Ligou-se depois estes três fragmentos para produzir p211-11, uma construção de T_4 que codifica para uma forma solúvel do aminoácido 113 da proteína T_4 com asparagina na posição 3 de aminoácido (isto é, rsT_4 .113.1).

Submeteu-se depois p211-11 a mutagênese dirigida para o local de oligonucleótido (Figura 27) para alterar o aminoácido na posição 3 de a asparagina para lisina utilizando o oligonucleótido T_4 -66:



Isto produziu o plasmídeo p214-10, um vector de T_4 solúvel do aminoácido 113 corrigido completamente que codifica para uma forma solúvel do aminoácido 113 da proteína T_4 , com lisina na

posição 3 do aminoácido (isto é, rsT₄.113.2). Como se mostra na Figura 27, submeteu-se p214-10 a mutagênese dirigida para o local de oligonucleótido para eliminar a glutamina e a glicina nas posições 1 e 2 de aminoácido, respectivamente, da sequência de T₄, utilizando o oligonucleótido T₄ AID-87:



Isto produziu p215-7, uma construção de T₄ solúvel de aminoácido 111, incluindo o promotor trp que dirige a expressão de uma forma solúvel de aminoácido 111 da proteína T₄, com lisina na posição 3 de aminoácido (isto é, rsT₄.111).

Construiu-se a seguir p218-8 uma construção de aminoácido 111 que dirige a expressão de uma forma solúvel de aminoácido 111 de proteína T₄, com lisina na posição 3 de aminoácido (isto é, rsT₄.111) sob o controle do promotor P_L como se descreveu na Figura 28.

Mais especificamente, cortou-se p197-12 (Figura 9-A) com ClaI para remover o fragmento de 101 pb que contém sequências de ligamento e terminação. Cortou-se também p215-7 com ClaI para remover a fita ClaI-ClaI que contém a sequência de cDNA de rsT₄.111 e a sequência de terminação da transcrição de ϕ T₄ [Kirsch e Allet, supra]. Subsequentemente, inseriu-se a fita ClaI-ClaI em p197-12 cortado com ClaI para produzir p218-8.

Com vista a expressar $rST_{4.113.1}$, transformou-se *E. coli* A89 com p211-11 mediante técnicas convencionais [Maniatis et al. (1982), supra] para formar *E. coli* A89/p211-11. *E. coli* A89 é um derivado de *E. coli* SG936 sensível à tetraciclina. Isolou-se *E. coli* A 89 a partir de *E. coli* SG936 de acordo com o método de S. R. Maloy e W. D. Nunn, "Selection For Loss of tetracycline Resistance by *Escherichia coli*", J. Bact. 145, págs. 110-12 (1981) que se baseia na capacidade do ácido fusárico do agente de quebração lipofílico para inibir selectivamente as estirpes resistentes. Mais especificamente, plaqueou-se *E. coli* SG936 em meio que continha, por litro, 5g de triptona, 5g de extracto de levedura, 10g de NaCl, 10g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 50 mg de clorotetraciclina-HCl, 12 mg de ácido fusárico, 0,1 mM de $ZnCl_2$ e 15g de agar. As colónias que se desenvolveram a 30°C (estirpes supostas sensíveis à tetraciclina) foram novamente testadas para a sensibilidade à tetraciclina em placas de L-agar que continham 5 µg/ml de tetraciclina. Uma estirpe sensível à tetraciclina designada A89 foi então considerada incapaz de se desenvolver em LB agar a 42°C, verificando-se assim a presença da mutação *htpR*.

Os transformantes foram seleccionados pela resistência à tetraciclina. Colheu-se uma colónia simples em 20 ml de meio mínimo mais casaminoácido a 0,2%, mais triptofano (100 µg/ml), mais tetraciclina (10 µg/ml) em um frasco de agitação de 100 ml colocado numa incubadora com agitação por ar à temperatura de 30°C e deixou-se desenvolver as células durante a noite. Na manhã seguinte, inocularam-se 40 ml de meio mínimo mais casaminoácidos a 0,2%, mais triptofano (100 µg/ml) mais tetraciclina (10 µg/ml) com a cultura da noite a $DO_{600}=0,05$ em um frasco de 500 ml. As



células foram desenvolvidas até à fase semilogarítmica e depois induzidas por granulação, lavando-se uma vez em um meio mínimo e ressuspendendo-se depois em um meio mínimo mais casaminoácidos a 0,2% mais tetraciclina (10 µg/ml) na ausência de triptofano. Removeu-se DO₆₀₀ 0,6 de células após 0,1,2,3 e 4 horas de incubação e após desenvolvimento durante a noite.

As alíquotas foram centrifugadas e os aglomerados de células foram submetidos a lise mediante ebulição em tampão de carga de gel Laemmli. Após centrifugação para remover detritos de células, metade de cada uma das amostras foi submetida a SDS-PAGE seguido de análise da mancha de Western com sondas de antipeptidos de coelho de acordo com a presente invenção ou mediante coloração da proteína com azul de Coomassie (Figuras 29A e 29B).

Purificação de rsT₄.113.1

Purificou-se a seguir rsT₄.113.1 a partir de transformante de E. coli mediante dois passos essencialmente quantitativos envolvendo cromatografia de permuta aniônica e cromatografias de filtração em gel realizadas sob condições de redução e desnaturação.

Mais especificamente, suspendeu-se 14 g de células molhadas a partir de uma fermentação em um frasco de agitação de 4 litros em 100 ml de um tampão de Tris 20 mM (pH=7,5) contendo 20 µg/ml de DNase, 20 µg/ml de RNase e fenilmetilfluoreto de sulfonilo ("PMSF") 1 mM. A suspensão foi aplicada a uma prensa francesa sob 70,3 Kg/cm₂ (1000 psi) em duas passagens e depois

centrifugada num rotor Sa600 de 18000 g durante 15 minutos a 4°C. O aglomerado resultante foi solubilizado em 20 ml de um tampão de Tris 20 mM (pH=7,5) contendo ureia 7 M e 2-mercaptoetanol 10 mM. Submeteu-se depois a suspensão a ultracentrifugação a 85000 x g durante 90 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi diluído mediante adição de 80 ml de tampão de Tris 20 mM (pH=7,5) contendo ureia 7 M e 2-mercaptoetanol 10 mM e aplicaram-se 40 ml da amostra a uma coluna de 3x4 cm de fluxo rápido de Sepharose-Q (Sigma, St. Louis, Missouri) que tinha sido pré-equilibrada no mesmo tampão. A coluna foi desenvolvida com um gradiente em um volume total de 400 ml com aumento de NaCl de 0 a 0,3 M no mesmo tampão de Tris/ureia/2-mercaptoetanol. As fracções da coluna foram controladas por absorção a 280 nm e por conteúdo de proteína mediante SDS-PAGE (15% de acrilamida). As fracções foram também analisadas por manchas de Western. A A Figura 30 painel (a) é um cromatograma que representa a purificação de rST₄.113.1 mediante cromatografia de permuta iônica. Nessa figura identificam-se os picos que contêm rST₄.113.1. Verificou-se que rST₄.113.1 é eluído no início do gradiente de NaCl e separa-se bem dos contaminantes de baixo peso molecular.

Com vista a separar rST₄.113.1 dos contaminantes de elevado peso molecular, realizou-se a cromatografia de filtração com gel de uma mistura que continha rST₄.113.1. para purificação final da proteína até próximo da homogeneidade (> 95% de pureza). Mais especificamente, preparou-se uma fracção que continha 20 mg de proteína em 50 ml e depois concentrou-se até 10 ml numa unidade de ultracentrifugação de células agitada (Amicon, Danvers, M. A.) utilizando uma membrana PM-30 (Amicon). Subsequentemente,

aplicou-se 5,0 ml do concentrado a uma coluna de 1,5 x 95 cm S-300 (Sigma) equilibrada e desenvolvida com o mesmo tampão de Tris/ureia/2-mercaptoetanol. Controlaram-se as fracções da coluna relativamente à absorção a 280 nm e ao conteúdo de proteína mediante SDS-PAGE. As fracções foram também analisadas mediante manchas de Western e preparou-se depois, uma mistura contendo $rsT_4.113.1$ (aproximadamente 4 mg) em 15 ml. A Figura 30, painel (b) é um cromatograma relativo à purificação de $rsT_4.113.1$ mediante separação por filtração com gel da mistura de $rsT_4.113.1$. Nessa figura os picos das fracções que continham $rsT_4.113.1$ estão identificados.

A Figura 30, painel (c) é uma análise SDS-PAGE relativa à purificação do derivado rsT_4 mediante cromatografia e centrifugação. Na Figura 30, painel (c) os sectores descritos são:

- sector A: padrões de pesos moleculares
- sector B: extractos de células
- sector C: aglomerado de célula a seguir à solubilização do extracto de células em condições não desnaturantes
- sector D: sobrenadante a seguir à solubilização do extracto de células em tampão não desnaturante
- sector E: sobrenadante a seguir ao passo de ultracentificação
- sector F: mistura de Sepharose Q
- sector G: mistura de filtração com gel S-300

L

Novo tratamento ("Refolding") de rsT₄.113.1 purificado

Tratou-se de novo ("refolded") o rsT₄.113.1 purificado mediante diluição e diálise submetendo-o a condições de não-desnaturantes e oxidantes. Mais especificamente, o novo tratamento ("refolding") da proteína para uma concentração de 0,5 D₂O (280) / ml foi atingido mediante o processamento de diálise contra 500 volumes de ureia 3 M, Tris (pH=7,5) 20 mM; 500 volumes de ureia 1 M, acetato de amônio 0,1 M (pH=6,8) e finalmente o mesmo volume de uma solução salina tamponada com fosfato. Através do novo tratamento ("refolding"), as amostras da proteína foram controladas para o conteúdo relativo mediante análise espectral e mediante cromatografia em fase líquida de alta resolução ("HPLC") realizada em um sistema cromatográfico em fase líquida 150A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Califórnia). Uma coluna de octasililo (Aquapore Rp-300, 0,46x3,0 cm) foi equilibrada em 80% de ácido trifluoroacético a 0,1% ("TFA")/água (dissolvente A) e 20% de TFA a 0,085%/acetonitrilo a 70% (dissolvente B) e desenvolveu-se com um gradiente linear de aumento de concentração de acetonitrilo desde 20% até 80% (dissolvente B) durante 45 minutos a um caudal de 0,5 ml/min.

Como se mostra na Figura 31, painel (a), a proteína em ureia 7M, 2-mercaptoetanol 10 mM e Tris 20 mM (pH=7,5) eluiu-se a partir de uma coluna de HPLC com acetonitrilo a 49% no gradiente. Em passos subsequentes, a partir de ureia 1 M/acetato de amônio 1 mM (pH=6,8) [Figura 31, painel (b)], até solução salina tamponada com fosfato [Figura 31], painel (c)], verificou-se um aumento da percentagem de rsT₄.113.1 que eluiu primeiro no gradiente

4

de HPLC com acetonitrilo a 47%. A identidade do pico do início da eluição como produto oxidado foi verificada por redução de rsT_4 .113.1 em soluções não caotrópicas e processamento da amostra assim tratada por HPLC nas mesmas condições.

A eluição de rsT_4 .113.1 oxidado antes da proteína reduzida em HPLC sugere que a formação de pontes de dissulfureto simples diminuem a hidrofobicidade relativa da proteína [J. L. Browing et al., Anal. Biochem. 155, págs. 123-28 (1986)]. A análise espectral de rsT_4 .113.1 foi realizada durante o novo tratamento ("refolding") com vista a controlar o rendimento relativo da proteína solúvel do procedimento. Este método de tratamento permitiu recuperar aproximadamente 20% de rsT_4 .113.1. A análise de HPLC indicou uma quantidade inferior a 15% de contaminante de proteína reduzida na preparação (Figura 30, painel (c), sector G).

Sequenciação de rsT_4 .113 com as características iniciais recuperadas

Realizou-se então a análise de aminoácidos de rsT_4 .113.1 mediante degradação automatizada de Edman num sequenciador em fase gasosa Applied Biosystems 470A equipado com um sistema de dados 900A. Os aminoácidos feniltio-hidantoína gerados no decurso da química de degradação foram analisados em série utilizando um analisador Applied Biosystems 120A PTH equipado com uma coluna de 2,1x220 mm PTH-C18. A proteína (10 μ g) para análise de sequência foi aplicada a SDS-PAGE (15% de acrilamida) e electrocolorida numa membrana Immobilon (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts) como descreveu P. Matsudaira, J. Biol. Chem., 262, págs. 10035-38

(1987).

A análise de aminoácidos das amostras de proteína foi realizada mediante hidrólise da proteína em HCl 6N, sob vácuo, durante 24 horas a 110°C. Os hidrolisados foram depois analisados em um analisador de Beckman 6300 equipado com detecção pós-coluna por ninidrina. A análise da mancha de Western dos geles SDS-PAGE foi realizada por técnicas padrão utilizando anti-soro JB-1 de coelho.

A análise de sequência revelou uma sequência de terminal amino: Met-Gln-Gly-Asn-Lys-Val-Val---

Verificou-se que a proteína rs T₄.113.1 purificada continha quantidades estequiométricas de metionina de terminal amino colocada na estrutura da proteína para expressão em E. coli e uma cadeia polipeptídica intacta consistente com uma sequência derivada da construção do plasmídeo. A recuperação de feniltiohidantoinil-metionina no primeiro ciclo da química de degradação foi 60% consistente com os rendimentos iniciais de proteína obtidos no Edman automatizado. Esta observação exclui a possibilidade de uma percentagem significativa do rsT₄.113.1 carecer de metionina de iniciação, isto é, a NH₂-metionina não foi removida pela expressão de rsT₄.113.1 em E. coli ou de uma análise da sequência ser prejudicada pela presença de glutamina no primeiro ciclo da química de degradação. A análise de sequência foi realizada durante 40 ciclos e não se observou nenhuma evidência de carbanilação da lisina. A análise de aminoácidos revelou uma correlação estreita dos valores teóricos e reais para os aminoácidos, indicando assim a ausência marcada da degradação proteolítica no decurso da expressão ou purifi-

cação ou ambos.

Imunoprecipitação de linhas de células de CHO produzindo T₄ solúvel

Testou-se o meio condicionado das células CHO marcadas metabolicamente com ³⁵S-Cys transfectadas com uma das construções T₄ mutantes pBG377, pBG380, pBG381, construção pBG379 de T₄ recombinante de comprimento total desta invenção ou com apenas o vector, para determinar se algum deles produziu uma molécula reconhecida pelo anti-corpo T₄ monoclonal 19 Thy. Para realizar este teste incubou-se cerca de 10⁷ células de CHO transfectadas com pBG380, pBG381, pBG377, pBG379 ou com pBG312 durante 5 horas a 37°C com 180 µCi/ml de cisteína marcada com ³⁵S. [Dupont, New England Nuclear] em 4 ml de meio RPMI Cys⁺ (Gibco). Após marcação das células, 1 ml do meio condicionado filtrado transformou-se em 0,5 mM com fluoreto de fenilmetil-sulfonilo e foi imunoprecipitado com OKT₄ e Sepharose de proteína A [P. H. Sayre e E. L. Reinherz, Eur. J. Immunol., 15, págs. 291-95(1985)]. Subsequentemente, incubou-se o meio das células marcadas com ³⁵S com OKT₄ (ATCC #CRL 8002). Imunoprecipitou-se a seguir com Sepharose de proteína A e submeteram-se os imunoprecipitados a SDS-PAGE sob condições reductoras em geles de poli-acrilamida a 10% [U. K Laemmli, Nature, 227, págs. 680-85 (1980)]. Realizou-se a autoradiografia com película de raios X X-Omat (Eastman Kodak).

Como se mostra nos sectores 3-5 da Figura 32, pBG380 (rsT₄.2) e pBG381 (rsT₄.3) dirigiram a síntese de uma proteína T₄ segregada, imune, marcada com ³⁵S que foi reconhecida pelo anti-

-corpo T_4 de OKT $_4$. O imunoprecipitado truncou moléculas migradas como proteínas 49Kd, um resultado consistente com os seus pesos moleculares previstos. Em contraste, nenhum antigene T_4 pôde ser detectado no meio condicionado de linhas de células transfectadas de modo estável com pBG377 (rsT $_4$.1) ou pBG379 (rf1:T $_4$). A análise da imunoprecipitação dos extractos celulares das linhas de células transfectadas com pBG377 sugere que o gene rsT $_4$.1 pode estar mal dobrado ("misfolded") o que podia acontecer para um bloco na sua secreção [M. J. Gething et al., Cell, 46, págs. 939-50(1986)7].

Na Figura 32, os sectores representam o seguinte: sector 1: imunoprecipitação do meio condicionado de células CHO co-transfectadas de modo estável com vectores pBG312 e pAdD26. Sector 2: branco. Sectores 3 e 4: imunoprecipitação do meio condicionado de células CHO-co-transfectadas de modo estável com pBG380 (rsT $_4$.2) e pAdD26. Sectores 5 e 6: imunoprecipitação do meio condicionado de células CHO co-transfectadas de modo estável com pBG381 (rsT $_4$.3) e pAdD26. Sector 7: imunoprecipitação do meio condicionado de células CHO co-transfectadas de modo estável com T_4 recombinante de comprimento total (pBG379) e pAdD26. Na Figura 32 a seta indica a posição prevista do T_4 solúvel a partir de pBG380 ou pBG381 relativos à migração de marcadores de peso molecular padrão.

Imunoprecipitação de linhas de células COS 7 que produzem T_4 solúvel recombinante

Expressou-se os derivados pBG392, pBG393 e pBG394 de T_4 solúvel recombinante em células COS7 por electroporação, essen-

cialmente como descreveu G. Chu et al., "Electroporation for the Efficient Transfection of Mammalian Cells with DNA", Nuc. Acids Res., 15, págs. 1311-26(1987). Mais especificamente, introduziram-se 20 μ g de DNA de plasmídeo circular fechado e 380 μ g de veículo (DNA de esperma de salmão agitado por som) em 3×10^7 células de COS 7. As células foram submetidas a electroporação utilizando um Pulsador de genes (Biorad) ajustado para 300 volts. Subsequentemente, incubaram-se células COS 7 em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal de vitela, durante 24 horas. Colheu-se depois os meios condicionados, filtrou-se através de um cartucho de filtro hidrófilo de 0,22 μ Millipore Millidisk (Millipore # MCGL 305-01) e concentraram-se as proteínas segregadas numa coluna de permuta iônica S rápida (S-Sepharose Fast Flow, Pharmacia # 17-0511-01) em tampão MES 20 mM (pH=5,5).

Eluiu-se a seguir as proteínas ligadas com Tris-HCl 20 mM (pH=7,7) e NaCl 0,3 M. A mistura de eluição foi subsequentemente diluída com 2 volumes de Tris-HCl 20 mM (pH=7,7) e carregou-se depois numa coluna que compreende tanto anti-anticorpo monoclonal T₄ na posição 19 Thy e Sepharose de proteína A como OKT₄A e Sepharose de proteína A. Lavou-se a coluna extensivamente e eluiu-se o material ligado com fracções de 0,5 ml com glicina-HCl 50 mM (pH=2,5), NaCl 150 mM, EGTA 0,1 mM e 5 μ g/ml de inibidor de tripsina pancreático bovino, Aprotinina (Sigma, # A1153). Os imunoprecipitados foram submetidos a SDS PAGE (10% de gel) seguido por imunocoloração contra anti-soro de coelho desenvolvido contra o peptido JB-1. Utilizou-se geles corados de prata a seguir à ligação e eluição de rT₄ durante a cromatografia.

A Figura 33 descreve uma análise de imunomancha de pBG392 expressa transitoriamente (rsT₄.7) [Sectores 10,11]; pBG393 (rsT₄.8) [sectores 10,11] pBG393 (rsT₄.8) [sectores 4,7,8] e pBG394 (rsT₄.9) [sector 5]. Os padrões são 50 ng de rsT₄.3 purificado (sector 1), 150 ng de rsT₄.3 purificado (sector 2) e 250 ng de srT₄.3 purificado (sector 3). A seta indica a posição esperada de migração de uma proteína com o peso molecular relativo de rsT₄.7; 21000 daltons. A amostra que foi carregada no sector 4 perdeu-se e os sectores 6 e 9 estão sem resultados ("blank").

Como se mostra nos sectores 10 e 11 da Figura 35, pBG392 (rsT₄.7) dirigiu a síntese de uma proteína imune segregada que foi reconhecida pelos anti anti-corpos T₄ OKT₄A e 19Thy. Os sectores 4, 7 e 8 também demonstraram que pBG393(rsT₄.8) dirigiu a síntese de uma proteína imune segregada que foi reconhecida por OKT₄A e 19Thy. Esta análise ilustra que rsT₄.7 contém o epítotope OKT₄A. Sugere também que a região de ligação para HIV envolve resíduos de ligação nos resíduos de T₄ de terminal 182 amino.

Pelo contrário, nenhuma quantidade de T₄ solúvel podia ser detectada no meio de linhas de células transfectadas com pBG394 (rsT₄.9) [ver sector 5]. A análise de imunoprecipitação de extractos celulares de linhas de células transfectadas com pBG397 mostrou, porém, que rsT₄.9 foi reconhecido por OKT₄.A. Admite-se que rsT₄.9, uma estrutura de 113 aminoácidos, liga o vírus HIV e representa uma segunda geração de T₄ solúvel, uma com apenas duas cisteínas e uma das três pontes de dissulfureto.

Por consequência, rsT₄.9 é produzido, facilmente em E. coli

4.

li ou sistemas de levedura.

De um modo semelhante, embora nenhuma T_4 solúvel pudesse ser detectado nos meios de linhas de células transfectadas com pBG396 (rs T_4 .12) a análise de extractos celulares dessas linhas de células mostrou que rs T_4 .12 foi reconhecido por OK T_4 A. Deste modo, rs T_4 .12 pode também ligar-se ao vírus HIV.

Radio-imuno-ensaio e análise de epítopes de rs T_4 .113

Com vista a determinar se o fragmento 113 de rs T_4 continha determinantes estruturais para ligação a OK T_4 A, Leu-3A e OK T_4 , realizou-se a seguir o radio-imuno-ensaio e a análise de epítopes de rs T_4 .113 utilizando um radio-imuno-ensaio de inibição competitivo [C. J. Newby et al., "Solid-Phase Radioimmune Assays" in Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (Ed.), 1, págs. 34,1-34,8 (1986)]. Como OK T_4 A e Leu-3A bloqueiam a infecção de HIV in vitro [Dalgleish et al., supra] e ligação de T_4 a gp 120/160 [McDougal et al., supra], esta análise serviu como uma primeira aproximação para se saber se rs T_4 .113 continha ou não elementos estruturais para interacção com HIV.

Revestiram-se, primeiro, placas de microtitulação de 96 cavidades com o fundo em forma de U (Falcon) com 50 μ l/cavidade de anti IgG de ratinho, desenvolvido em cabra (Hyclone Typing Kit, Logan, Utah) em PBS (pH=7,0) até uma concentração de 50 μ g/ml e incubaram-se as placas, durante a noite, a 4°C. Lavaram-se as placas com 1xPBS e mancharam-se a seco. As placas foram, depois, blo

4

queadas mediante a adição de 100 μ l/cavidade de uma solução de 1xPBS contendo 5% de albumina de soro bovino, durante 1 hora à temperatura ambiente. Enxaguaram-se as placas com PBS, mancharam-se a seco e depois mancharam-se com 50 μ l de uma das três soluções de anticorpos que contêm OKT₄ (10 μ g/ml em tampão de bloqueio), OKT₄A (500 ng/ml em tampão de bloqueio) como também Leu-3A (Becton-Dickison) (500 ng/ml em tampão de bloqueio). Deixaram-se repousar as placas durante 2 horas à temperatura ambiente. Lavaram-se depois as placas 3 vezes com uma solução PBS Tween-80 a 0,05% e 2 vezes com 1 xPBS e mancharam-se a seco.

Numa placa separada, titularam-se amostras concorrentes de rsT₄.113.1 não marcado a partir de 20 μ g/ml e diluíram-se duas vezes em série não incluindo nenhum controlo concorrente), com volumes finais em cada cavidade de 25 μ l. O controlo positivo para este ensaio foi a competição com rsT₄.3 não marcado (375 aminoácidos). Adicionou-se, depois, 25 μ l de rsT₄.3 marcado com ¹²⁵I que contêm 10000 cpm/25 μ l (preparado de acordo com A. E. Bolton e W. M. Hunter, Radioimmunoassay and Related Methods, Chapter 2c). Subsequentemente, manchou-se todo o conteúdo de 50 μ l de cada cavidade das placas de ensaio contendo cada uma das três soluções de anticorpos e incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente. Lavaram-se as placas três vezes com solução PBS/Tween-80 a 0,5% e 2 vezes com 1 x PBS, manchou-se a seco e contactaram-se depois as cavidades num contador de raios gama de Beckman para radioactividade.

Como se mostrou na Fig. 34, rsT₄.113.1 compete com rsT₄.3 marcado com ¹²⁵I para a absorção com uma fase sólida de OKT₄A de

um modo que é função da dose. Adicionalmente, rsT₄.113.1 compete com rsT₄.3 marcado com ¹²⁵I para a absorção com uma fase sólida de Leu-3A em uma forma dependente da dose. Relativamente ao rsT₄.3 não marcado, o rsT₄.113.1 exibe uma afinidade molar para aqueles anticorpos com um factor igual a 3. Na gama de concentrações compreendida entre 0,4 e 25 µg/ml testada, rsT₄.113 não competiu com rsT₄.3 radiomarcado para ligação a OKT₄. Num ensaio semelhante observou-se que rsT₄.111 também compete com rsT₄.3 marcado com ¹²⁵I para ligação a OKT₄A e Leu-3A, mas não a OKT₄ [Figuras 35-37].

Com base nestes resultados, pensa-se que os epítopes para OKT₄A e Leu-3A estão contidos entre os 113 aminoácidos aminoterminais de T₄. Admite-se também que o epítotope para ligação de OKT₄ está localizado no terminal carboxi do polipeptido T₄.

Por consequência, pensa-se que o domínio de ligação gp120 está localizado entre os aminoácidos 113 ou 111 amino-terminais da proteína T₄. Com base nesta convicção, sintetizaram-se vários oligopeptidos que continham sequência dentro desse domínio estrutural. Esses oligopeptidos estão representados na Figura 3 como se segue:

| <u>Oligopeptido</u> | <u>Coordenadas de aminoácido</u> |
|---------------------|----------------------------------|
| JB-1 | 44-63 |
| rsT ₄ #6 | 18-29 |
| rsT ₄ #7 | 5-56 |
| rsT ₄ #8 | 84-97 |
| rsT ₄ #9 | 30-63 |

L.

Sintetizaram-se esses peptídeos utilizando técnicas de síntese de fosfonamido-DNA convencionais [tetrahedron Letters, 22, págs. 1859-62 (1981)]. Sintetizaram-se os peptídeos num sintetizador de DNA Applied Biosystems 380 A e purificaram-se através de electroforese de gel.

Ensaio ELISA para rsT₄.113

Realizou-se um ensaio ELISA para rsT₄.113.1 produzido por E. coli transformado por p211-11. Mediante este ensaio, fizeram-se diluições na solução de bloqueio, e entre cada passo, lavaram-se as placas com PBS/Tween-20 a 0,05%. Mais especificamente, revestiram-se as cavidades de placas de Immulon 2 (Dyna-tech, Chantilly, Virginia) com DO 0,005 (280 nm)/ml de OKT₄ (IgG2b) em tampão de bicarbonato 0,05 M até um volume de 50 µl/cavidade e incubaram-se as placas, durante a noite, a 4°C. Bloquearam-se depois as placas com albumina de soro bovino a 5% em PBS 200 µl/cavidade e incubou-se durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Subsequentemente, adicionaram-se 50 µl de 50 ng/ml de rsT₄.3 a cada cavidade, incubando durante a noite, a 4°C. Adicionou-se, a seguir, 50 µl/cavidade de uma mistura contendo rsT₄.113.1 e 10 ng/ml de OKT₄A e incubou-se durante 2 horas e meia à temperatura ambiente. Utilizando um Hyclone Kit (Hyclone), realizaram-se os passos seguintes. Em primeiro lugar, adicionou-se uma gota de anti-IgG2a de ratinho de coelho a cada cavidade e incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente. Adicionaram-se depois 100 µl de anti-IgG de coelho marcado

4

com peroxidase, diluiu-se a 1:4000 com tampão de bloqueio para cada cavidade, e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente.

Preparou-se um reagente de substrato como se segue. Diluiu-se reagente de substrato a 1:10 em água destilada e adicionou-se dois comprimidos de cromoforo, O-fenil-etilenodiamina ("OPD"), por 10 ml de substrato. Deixou-se a mistura dissolver completamente misturando-a com redemoinho. Alternativamente, pode-se utilizar um sistema de substrato de peroxidase TMB (Kirkegard & Perry Catalogue # 50-76-00). Subsequentemente, adicionou-se 100 μ l da solução de cromoforo a cada cavidade, incubou-se durante 10 a 15 minutos à temperatura ambiente e depois interrompeu-se o desenvolvimento da cor com 100 μ l de H_2SO_4 1N. Mediu-se, depois, DO a 490 nm, utilizando um leitor de planos ELISA.

Os resultados do ensaio apresentam-se na Figura 38.

Submeteram-se a seguir as proteínas T_4 solúveis produzidas pelas construções T_4 de acordo com a presente invenção a vários ensaios funcionais.

Ensaio da Actividade Antiviral de T_4 Solúvel

A actividade antiviral de T_4 solúvel de acordo com a presente invenção foi calculada utilizando modificações de vários sistemas in vitro utilizados para estudar agentes antivirais e neutralizar anticorpos [D. D. Ho, et al., "Recombinant Human Interferon

4

Alpha (A) Suppresses HTLV-III Replication in Vitro", Lancet, págs. 602-04 (1985); K. Hartshorn et al., "Synergistic Inhibition of HTLV-III Replication in Vitro by Phosphonoformate and Recombinant Interferon Alpha-A", Antimicrob Ag Chemoth, 30, págs. 189-91 (1986)7.

Para cada um destes ensaios, prepararam-se concentrações escalonadas de T₄ solúvel e pré-incubaram-se com um isolado IIIB derivado de H₉ de HIV [uma oferta dos Drs. M. Popovic e R. Gallo, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland7]. O isolado foi mantido como uma cultura infectada cronicamente em células H₉. As quantidades armazenadas de HIV livre de células foram obtidas a partir de fluidos sobrenadantes de culturas H₉ infectadas com HTLV-III (condições de cultura: 1x10⁶ células/ml com 75% de células viáveis). Prepararam-se séries de 10 diluições de T₄ solúvel recombinante variando entre 10 picogramas/ml e 10 microgramas/ml e incubaram-se com 50% de doses infecciosas de cultura de tecidos (TCID₅₀) de HIV durante 1 hora a 37°C, em RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal de vitela inativado por calor (FCS). Adicionaram-se depois 150 µl de células H₉ até uma concentração final de 0,5x10⁶ células/ml que não foram infectadas por HIV nas cavidades que contêm alíquotas de T₄ solúvel recombinante/mistura de HIV.

Ajustou-se cada inóculo de vírus a uma concentração de 250 TCID₅₀/ml e pré-incubaram-se 100 µl do inóculo do vírus com 200 µl de T₄ solúvel recombinante ou 100 µl de imunoglobulina preparada em triplicado em séries de 2 diluições durante 1 hora a 37°C antes da inoculação de 1,5 a 2x10⁶ células H₉ em 5 ml de

4

soro fetal de vitela suplementado com RPMI 1640 (20%), HEPES (10 mM), penicilina (250 μ /ml), estreptomicina (250 μ g/ml) e L-glutamina (2 mM). Nos dias 5,6,7,10 e 14 examinou-se cada uma das culturas relativamente aos efeitos citopáticos característicos ("CPE"). A neutralização foi definida como a inibição de formação de "syncytia" comparada com controlos.

O controlo positivo utilizado foi soro de neutralização de seropositivo HIV, como descreveu D. D. Ho et al., em "Human Immunodeficiency Virus Neutralizing Antibodies Recognize Several Conserved Domains On the Envelope Glycoproteins", J. Virol., 61, págs. 2024-28 (1987). Os controlos negativos utilizados foram soro seronegativo HIV sozinho e também apenas tampão.

Ensaio de efeito citopático (CPE)

Neste ensaio, seguindo protocolos convencionais para ensaios de efeito citopático [Klatzmann et al. (1984), supra e Wong-Staal and Gallo (1985), supra] examinaram-se microscopicamente as células H₉ para evidenciar os efeitos citopáticos de HIV.

O CPE foi registado numa escala de 4 pontos de 1⁺ a 4⁺ representando 4⁺ o grau mais elevado de CPE.

No décimo quarto dia as cavidades que continham T₄ soro livre recombinante de acordo com a presente invenção (rsT₄.2 derivado da linha de células BG380 CHO transfectada com pBG380) para 10 μ g/ml e não apresentaram nenhuma evidência de CPE enquanto

o controlo negativo apresentou 1⁺ a 3⁺ CPE.

Radio-imunoensaio p24

Testou-se a seguir T₄ solúvel como um inibidor de replicação viral num ensaio de replicação do virus HIV de acordo com D. D. Ho et al., J. Virol., 61, págs. 2024-28 (1987) e J. Sodorski et al., Nature, 322, págs. 470-74 (1986). Realizou-se o ensaio essencialmente como se descreveu excepto que as culturas foram propagadas nas cavidades do microtitulador que continha 200 µl. Neste ensaio, calculou-se a capacidade dos polipeptidos T₄ solúveis da presente invenção para bloquear a replicação de HIV como se mediu através da produção de antigenes p24 de HIV. Tiravam-se amostras de sobrenadantes duas vezes por semana para o antigene p24 de HIV como se descreve a seguir.

Obteve-se um conjunto ("Kit") de ensaio HTLV-III p24 Radioimmunoassay System, Catalogue Nº NEK-040, NEK-040A, Biotechnology Systems, New Research Products, Dupont⁷ que contém um antigene p24 de HIV marcado com ¹²⁵I purificado por afinidade, um anti-anticorpo p24 de coelho e um segundo anti-anticorpo de coelho desenvolvido na cabra o qual é utilizado para precipitar complexos de antigene-anticorpo. Realizou-se o ensaio de acordo com o protocolo incluído, com o conjunto ("Kit"). Por consequência, misturou-se a amostra a ensaiar ou uma de uma série de quantidades de antigene p24 não marcado com uma quantidade fixa de p24 marcado com ¹²⁵I e uma quantidade limitada fixa de anti-anticorpo p24 de coelho. Incubaram-se as amostras durante a noite à temperatura ambiente e adicionou-se depois uma composição de anti-

-imunoglobulina de coelho desenvolvida na cabra durante 5 minutos a 40°C. Centrifugaram-se as amostras num microfugo e aspirou-se o fluido sobrenadante. O p24 marcado com ^{125}I em forma de aglomerado foi quantificado para cada amostra por contagem gamma e construiu-se uma curva padrão para ^{125}I p24 substituído por quantidades conhecidas de antigene adicionado a tubos padrão. Calculou-se depois o p24 marcado com ^{125}I substituído pelo antígeno presente nas amostras desconhecidas, por interpolação, utilizando a curva padrão construída a partir de quantidades conhecidas de antigene p24 contido nas amostras padrão. Os resultados apresentam-se no Quadro a seguir.

ENSAIO DE p24 DE INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DE HIV

| <u>Dia</u> | <u>rsT_{4.2}</u> <u>($\mu\text{g/ml}$)</u> | <u>soro do</u> <u>paciente</u> | <u>CPM</u> <u>médio</u> | <u>% Ligado/</u> <u>/não ligado</u> |
|------------|--|-----------------------------------|----------------------------|--|
| 7 | - | negativo | 344 | 8,5 |
| | - | Positivo | 2,237 | 112,4 |
| | 0,5* | - | 551 | 19,9 |
| | 5,0** | - | 1,766 | 86,6 |
| 10 | - | Negativo | 230 | 2,2 |
| | - | Positivo | 2,459 | 124,6 |
| | 0,5 | - | 322 | 7,3 |
| | 5,0** | - | 1,980 | 96,3 |
| | - | Negativo | 221 | 1,8 |
| | - | Positivo | 2,284 | 115,0 |
| | 0,5 * | - | 246 | 3,1 |
| | 5,0 ** | - | 1,988 | 98,7 |

Estes resultados demonstram que T_4 solúvel de acordo com a invenção, para uma concentração de $5 \mu\text{g/ml}$, inibe completamente a replicação do vírus tal como se mediu neste ensaio padrão de 14 dias. Estes resultados estão também indicados no Fig. 39 sob a forma gráfica. Na Fig. 39, os valores foram calculados a partir de uma curva padrão de p_{24} , de acordo com as instruções do "Kit" de ensaio.

* Acreditou-se inicialmente que esta concentração fosse de $1,0 \mu\text{g/ml}$ baseado na aproximação preliminar de que 1 unidade de absorvância a 280 nm (" A_{280} ") era equivalente a 1 mg de $rsT_{4.2}$. A absorvância a 280 nm é uma primeira aproximação comumente utilizada para a concentração de proteína. Após a análise de aminoácidos da proteína, porém, verificou-se que tinha um coeficiente de extinção mais elevado do que o inicialmente suposto com 1 unidade A_{280} de $rsT_{4.2}$ equivalente a 0,5 mg da proteína.

** Esta concentração foi inicialmente considerada igual a $10 \mu\text{g/ml}$ baseado na aproximação preliminar de que 1 unidade de absorvância a 280 nm (" A_{280} ") era equivalente a 1 mg de $rsT_{4.2}$. A absorvância a 280 nm é uma primeira aproximação comumente utilizada, para a concentração da proteína. Após a análise de aminoácidos da proteína, verificou-se, porém, que tinha um coeficiente de extinção maior do que o inicialmente suposto com 1 unidade A_{280} de $rsT_{4.2}$ equivalente a 0,5 mg de proteína.

Realizou-se um ensaio de replicação de p_{24} como se descreveu atrás, excepto que o T_4 solúvel foi adicionado a culturas infectadas durante a realimentação nos dias 3,7 e 10, com vista a manter uma concentração de rsT_4 constante através do período de infecção. Os resultados deste ensaio estão indicados no Quadro a seguir.

INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DE HIV COM CONCENTRAÇÃO
CONSTANTE DE rsT_4

| <u>rsT_4</u> <u>($\mu\text{g/ml}$)</u> | <u>p_{24}</u> <u>(ng/ml)</u> |
|---|--|
| 0,008 | 770 |
| 0,031 | 970 |
| 0,125 | 85 |
| 0,5 | 0 |
| 5,0 | 0 |
| 0 | 1120 |
| não infectado | 0 |

Estes resultados demonstram que quando a proteína T_4 solúvel de acordo com esta invenção foi mantida a uma concentração constante durante o período de infecção, bastou apenas cerca de 0,125 $\mu\text{g/ml}$ da proteína para bloquear substancialmente a replicação de 250 TCID₅₀/ml de HIV-1.

De um modo vantajoso, a proteína T_4 solúvel de acordo com esta invenção, para concentrações excedendo bastante as necessárias para bloquear a replicação viral não exerce efeitos imuno-

tóxico in vitro, como medido pelos três ensaios de proliferação de linfócitos - resposta de linfócitos mista, fito-hemaglutinina e resposta estimulada de tétano.

Ensaio de inibição de "Syncytia"

Para estabelecer ainda o efeito de T₄ solúvel na ligação T₄-HIV env calculou-se o efeito de duas preparações da proteína T₄ solúvel da presente invenção nas propriedades "syncytiagênicas" de HIV no ensaio de co-cultura. Realizou-se um ensaio de fusão celular C8166 como se descreve em B. D. Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, págs. 8120-24 (1984).

Incubaram-se 1×10^9 células H9 infectadas de modo crônico com HTLV-IIIB, durante 1 hora a 37°C em 5% de CO₂ com várias concentrações de uma de duas preparações de rsT_{4,2} em 150 µl de meio RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal de vitelo. Adicionaram-se a seguir 3×10^4 C1866 células em 50 µl de meio (uma linha de linfócitos de sangue de cordão umbilical humano transformado em T₄⁺) [Sodroski et al., supra], até um volume final de 0,2 ml em cada cavidade. As concentrações finais das cavidades de T₄ solúvel foram 0,5 µg/ml* e 5,0 µg/ml* para a preparação #1 e 1,25 µg/ml* e 12,5 µg/ml* para a preparação #2. Contou-se depois o

* Estas concentrações foram inicialmente supostas como iguais 1 µg/ml, 10 µg/ml, 2,5 µg/ml e 25 µg/ml baseadas na aproximação preliminar de que 1 unidade de absorvância a 280 nm ("A₂₈₀") era equivalente a 1 mg de rsT_{4,2}. Após a análise de aminoácido da proteína, porém, verificou-se que tinha um coeficiente de extinção maior do que o inicialmente admitido sendo uma unidade de A₂₈₀ de rsT_{4,2} equivalente a 0,5 mg da proteína.

4

nº total de "syncytia" por cavidade 2 horas e 4 horas após a adição de C8166 células a 37°C em 5% de CO₂. Co-culturas paralelas utilizaram tampão isolado (controlo negativo) ou OKT₄A a 25 µg/ml (controlo positivo) como controlos. Considerou-se resultado positivo uma redução de 50% da "syncytia" comparada com os controlos ao fim de um tempo em que, pelo menos, 100 "syncytia" por 10⁴ células H₉ infectadas estavam presentes nas culturas de controlo. Os resultados deste ensaio apresentam-se a seguir, na Fig. 40 (dados ao fim de 2 horas).

INIBIÇÃO EM ENSAIO FUSÃO DE C8166

| <u>Preparação</u> | <u>rsT₄.27 (µg/ml)</u> | <u>% de inibição*</u> | |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------|
| | | <u>2 horas</u> | <u>4 horas</u> |
| tampão | 0 | 0 | 0 |
| rsT ₄ .2 | 0,5** | 30 | 42 |
| rsT ₄ .2 | 5,0** | 54 | 47 |
| rsT ₄ .2 | 1,25** | 16 | 21 |
| rsT ₄ .2 | 12,5** | 77 | 55 |
| OKT ₄ A (25 µg/ml) | 0 | 100 | 100 |

* Todos os ensaios foram realizados em triplicado e determinou-se o número médio de "syncytia" contado por cavidade para calcular a % de inibição. A % de inibição representa a diferença entre o número médio de "syncytia" no controlo negativo (sem rsT₄ ou OKT₄A) e o número médio de "syncytia" contado quando rsT₄ ou OKT₄A estavam presentes durante o ensaio, dividido pela contagem média de "syncytia" para o controlo negativo e multiplicado por 100.

** Estas concentrações foram inicialmente admitidas como sendo

4

Como se demonstrou neste quadro e na Fig. 40, a T_4 solúvel de acordo com esta invenção para concentrações de 5,0 $\mu\text{g/ml}$ e 12,5 $\mu\text{g/ml}$ inibiu a formação de "syncytia" em 2 horas, quando comparado com tampão isolado. Decorridas 4 horas após a adição de células C8166, T_4 solúvel, para uma concentração de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ continuou a exibir mais do que 50% de formação de "syncytia" em comparação com controlo negativo.

Calculou-se também o efeito de duas preparações da proteína T_4 solúvel $rsT_{4.7}$ sobre as propriedades "syncytiagênicas" de HIV em um ensaio semelhante de co-cultura. Os resultados deste ensaio indicam-se a seguir.

(cont. pág. ant.) 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ e 25 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, com base numa primeira aproximação de que 1 unidade de absorvância a 280 nm (" A_{280} "), era equivalente a 1 mg de $rsT_{4.2}$. Depois da análise de aminoácido da proteína, porém, verificou-se que tinha um coeficiente de extinção mais elevado do que o inicialmente suposto sendo uma unidade A_{280} de $rsT_{4.2}$ equivalente a 0,5 mg da proteína.

INIBIÇÃO EM ENSAIO DE FUSÃO DE C8166

Data de ensaio: dia 1

| <u>Preparação</u> | alíquota de 50 μ l/ | | <u>% de inibição 2 horas</u> |
|--|---|--------------------------------|----------------------------------|
| | <u>rsT_{4.7} (μg/ml)</u> | <u>/"sýncytia" "média"</u> | |
| Células H ₉ (controlo) | 0 | 0 | N/A |
| Células C8166 (controlo) | 0 | 0 | N/A |
| Células H ₉ infectadas com HIV adicionadas a células C8166 controlo | 0 | 118 | 0 |
| OKT ₄ A (controlo) | 0 | 0 | 100 |
| Prep. 1 de rsT _{4.7} | \approx 5,0* | 43 | 63,6 |

* Esta concentração foi inicialmente suposta como sendo 10 μ g/ml, com base na primeira aproximação de que 1 unidade de absorvância a 280 nm ("A₂₈₀"), era equivalente a 1 mg de rsT_{4.2}. Depois da análise de aminoácido da proteína, porém, verificou-se que tinha um coeficiente de extinção maior do que o inicialmente admitido, sendo uma unidade de A₂₈₀ de rsT_{4.2} equivalente a 0,5 mg da proteína.

4

Data do ensaio: dia 13

| <u>Preparação</u> | <u>rsT₄.7 (μg/ml)</u> | <u>Aliquota de 50 μl/ /Syncytia média</u> | <u>% de inibição para 2 horas</u> |
|--|---|--|---------------------------------------|
| Células H ₉ (controle) | 0 | 0 | N/A |
| Células C8166 (controle) | 0 | 1 | N/A |
| Células H ₉ infectadas por HIV adicionadas a células C8166 (controle) | 0 | 141 | 0 |
| OKT ₄ A (controle) | 0 | 0 | 100 |
| Prep. 2 de rsT ₄ .7 | $\approx 5,0^*$ | 27 | 80,9 |

* Esta concentração foi inicialmente suposta como sendo 10 μ g/ml com base numa primeira aproximação de que 1 unidade de absorvância a 280 nm (" A_{280} "), era equivalente a 1 mg de rsT₄.2. Depois da análise de aminoácidos da proteína, porém, verificou-se que tinha um coeficiente de extinção maior do que o inicialmente admitido sendo uma unidade de A_{280} de rsT₄.2 equivalente a 0,5 mg da proteína.

L.

Data de Ensaio: dia 14

| <u>Preparação</u> | <u>rsT_{4.7} (µg/ml)</u> | <u>aliquota de 50 µl/ /syncytia média</u> | <u>% inibição após 2 horas</u> |
|---|----------------------------------|---|------------------------------------|
| Células H ₉ (controlo) | 0 | 0 | N/A |
| Células C8166 (controlo) | 0 | 0 | N/A |
| Células H ₉ infectadas com HIV adicionadas a | | | |
| células C8166 (Controlo) | 0 | 128 | 0 |
| OKT ₄ A (controlo) | 0 | 0 | 100 |
| Prep. 1 de rsT _{4.7} | ≈ 5,0* | 35 | 72,7 |
| Prep. 2 de rsT _{4.7} | ≈ 5,0* | 2 | 98,4 |

Como se determinou nestas tabelas a proteína rsT_{4.7} de T₄ solúvel inibiu a formação de "syncytia" em células H₉ infectadas com HIV.

Calculou-se também o efeito de rsT_{4.113.1} e rsT_{4.111} sobre as propriedades "syncytiagênicas" de HIV num ensaio de co-cultivação. Realizou-se uma fusão de células C8166 do modo descrito em Walker et al. supra.

Incubaram-se 1×10^4 células de H₉, infectadas de modo crônico com HTLV-III B, durante 1 hora a 37°C em 5% de CO₂, com 5 a 50 µg/ml de rsT₄.113.1 ou rsT₄.111 em 150 µl de meio PPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal de vitela em placas microtituladoras de 96 cavidades. Adicionou-se depois, 3×10^4 C8166 células às cavidades em alíquotas de 50 µl. As placas foram incubadas durante 2 horas a 37°C em 5% de CO₂ e a seguir a esta incubação contou-se o número de "syncytia" por cavidade.

As "syncytia" foram consideradas como células contendo um citoplasma de balão maior do que três diâmetros de células. Todas as amostras foram contadas duas vezes. A co-cultura paralela utilizou OKT₄A isolado ou rsT₄.3 isolado para uma concentração de 25 µg/ml ((controles positivos) ou células H₉ isoladas ou células C8166 isoladas (controles negativos). Os resultados deste ensaio estão apresentados a seguir na Figura 41.

* Esta concentração foi inicialmente considerada como sendo 10 µg/ml com base na primeira aproximação de que 1 unidade de absorvância a 280 nm ("A₂₈₀"), era equivalente a 1 mg de rsT₄.2. Mediante a análise de aminoácidos da proteína, porém, verificou-se que tinha um coeficiente de extinção maior do que o inicialmente admitido, sendo uma unidade de A₂₈₀ de rsT₄.2 equivalente a 0,5 mg da proteína.

4.

INIBIÇÃO EM ENSAIO DE FUSÃO DE C8166

| <u>Preparação</u> | <u>rsT₄ (µg/ml)</u> | <u>% de inibição</u> |
|-----------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Células H ₉ (controlo) | 0 | 0 |
| Células C8166 (controlo) | 0 | 0 |
| rsT ₄ .113.1 | 1,25 | 35 |
| rsT ₄ .113.1 | 2,5 | 63 |
| rsT ₄ .113.1 | 4,25 | 63 |
| rsT ₄ .113.1 | 6,25 | 82 |
| rsT ₄ .113.1 | 12,5 | 96 |
| rsT ₄ .3 | 12,5 | 100 |
| OKT ₄ A (25 µg/ml) | 0 | 100 |

Como se verifica no Quadro e na Figura 41, rsT₄.113.1 apresentou uma inibição dependente da dose de formação de "syncytia" induzida por HIV. A actividade inibidora específica molar de rsT₄.113.1 pareceu ser reduzida de uma ordem de grandeza por comparação com a actividade anti-viral de formas maiores de T₄ solúvel recombinante. Deste modo, enquanto rsT₄.113.1 é eficaz relativamente à neutralização da fusão celular dependente de HIV in vitro, a sua actividade inibidora específica molar diminui de um factor de 10. É indeterminado se esta quantidade de decrescimento é devida a uma regeneração incompleta da proteína derivada de E. coli, à presença de três aminoácidos adicionais na extremi-

dade N de rsT₄.113.1 (Met-Gln-Gly), não existentes em rsT₄.2 ou rsT₄.3 produzido em células de mamíferos ou a ausência de estrutura adicional em rsT₄.113.1 necessário para a ligação de afinidade elevada a HIV.

Realizou-se também um ensaio de fusão de células C8166 com rsT₄.111 como se descreveu para rsT₄.113.1. Os resultados deste ensaio estão apresentados a seguir.

INIBIÇÃO EM ENSAIO DE FUSÃO DE C8166

| <u>Preparação</u> | <u>rsT₄ (µg/ml)</u> | <u>% de inibição</u> |
|----------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Célula H ₉ (controlo) | 0 | 0 |
| Células C8166 (controlo) | 0 | 0 |
| rsT ₄ .111 | 1,25 | 0 |
| rsT ₄ .111 | 2,5 | 40 |
| rsT ₄ .111 | 4,25 | 20 |
| rsT ₄ .111 | 6,25 | 67 |
| rsT ₄ .111 | 12,5 | 100 |
| rsT ₄ .111 | 25,0 | 100 |
| rsT ₄ .3 | 12,5 | 100 |
| rsT ₄ .3 | 25,0 | 100 |
| OKT ₄ A (25 µg/ml) | 0 | 100 |

Como se demonstrou neste Quadro, rsT₄.111 exibiu uma inibição dependente da dose, de formação de "synytia" induzida por HIV. Para uma concentração de 12,5 µg/ml e 25,0 µg/ml, foi conseguida a inibição completa de fusão celular.

Cinética de injeção intramuscular de T₄ solúvel

Examinou-se a cinética do aparecimento de uma proteína T₄ solúvel recombinante de acordo com a presente invenção (especificamente rT₄.3 a partir da linha de células BG381 transfectada com pBG381) em soro após injeção intramuscular como se segue.

Arranjaram-se dois macacos "cynomolgus" (Macaca fascicularis) que não possuíam doenças infecciosas e que gozavam de boa saúde. Cada macaco tinha sido submetido a um período de quarentena de 6 semanas antes da administração da proteína T₄ solúvel. Durante o período de administração manteve-se cada macaco com uma dieta convencional de macaco cão suplementada com fruta fresca. Colocou-se uma abertura de acesso vascular e um cateter numa veia femoral de cada animal antes do tratamento, com vista a facilitar a colheita de sangue.

Durante um período de 28 dias, cada animal recebeu diariamente duas vezes proteína T₄ solúvel recombinante por injeção intramuscular nos músculos grandes das coxas e das nádegas. Administraram-se injeções a cada animal à parte, durante 8 horas e cada injeção continha um volume de 0,15 ml/Kg (0,25 mg/kg) de rT₄.3 (da linha de células BG381 transformada com pBG381, para uma dose total de 0,5 mg/Kg/dia/macaco. Colheram-se amostras de soro para determinação de remoção no dia antes do primeiro tratamento e 1,2,4 e 8 horas após a primeira injeção, bem como 1,2,4,14 e 16 horas após a segunda injeção nos dias 7,14 e 28.

Verificou-se que a T₄ solúvel injectada por via intra-



muscular atingiu o nível máximo no soro entre 1 a 2 horas após a injeção, com o nível a cair lentamente e a atingir metade do valor máximo em aproximadamente 6 horas após a injeção. De acordo com os valores obtidos para a administração intravenosa (não representados), o nível de $rsT_{4.3}$ no soro deveria cair abaixo do atingido via injeção intramuscular, aproximadamente 2 horas após a injeção intravenosa. Deste modo, embora o nível máximo de $rsT_{4.3}$ no soro após injeção intramuscular não atinja o valor atingido via injeção intravenosa, é libertado lentamente para a corrente sanguínea, permanecendo detectável no soro durante um período muito mais longo. Este mecanismo de libertação lento associado com vias intramusculares de injeção é vantajoso porque fica disponível um nível maior de proteína T_4 solúvel durante um período de tempo maior para uma dada concentração; permanecendo, deste modo, num nível controlado. A administração intramuscular de proteína T_4 solúvel é particularmente eficaz no tratamento de doentes nos estádios iniciais de infecção por HIV, em impedir a disseminação do vírus ou em tratar doentes que tenham sido expostos ao vírus e que não são ainda seropositivos.

Determinaram-se os níveis de $rsT_{4.3}$ no soro utilizando um ensaio ELISA. Através deste ensaio, fizeram-se diluições em soluções de bloqueamento e entre cada passo lavaram-se as placas com PBS/0,05% de Tween-20. Mais especificamente, revestiram-se as cavidades de duas placas. Imulou com DO 0,01 (280 nm)/ml de OKT_4 (IgG2b) em tampão de bicarbonato 0,05 M até um volume de 50 μ l/cavidade e incubaram-se as placas durante a noite a 4°C. Bloquearam-se depois as placas com albumina de soro bovino a 5% em PBS, 200 μ l/cavidade e incubou-se durante 30 minutos à tempe-

4.

ratura ambiente.

Subsequentemente, adicionaram-se 50 μ l de amostra ou de padrão a cada cavidade, incubando durante 4 horas à temperatura ambiente. Adicionou-se depois, 50 μ l/cavidade de OKT₄A para 0,1 μ g/ml e incubou-se durante a noite a 4^oC. Utilizando um Hyclone Kit (Hyclone), realizaram-se os seguintes passos: primeiro, adicionou-se a cada cavidade 1 gota de anti-IgG2a de ratinho desenvolvido no coelho e incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente; adicionou-se depois 100 μ l de anti-IgG de coelho marcado com peroxidase, diluiu-se a 1:4000 com BSA a 5% PBS em cada cavidade e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente.

Preparou-se um reagente de substrato como se segue. Diluiu-se o reagente de substrato a 1:10 em água destilada e adicionou-se dois comprimidos de O-fenil-etilenodiamina ("OPD") cromófora por 10 ml de substrato. Deixou-se dissolver a mistura cuidadosamente, misturando com um vórtice. Alternativamente, pode ser utilizado um sistema de substrato de peroxidase TMB (Kirkegaard & Perry Catalogue # 50-76-00). Subsequentemente, adicionou-se 100 μ l da solução cromófora a cada cavidade, incubou-se durante 10 a 15 minutos à temperatura ambiente e depois interrompeu-se o desenvolvimento de cor com 100 μ l de H₂SO₄ 1N. Mediu-se depois a DO a 490 nm, utilizando um leitor de placas ELISA.

Os resultados do ensaio apresenta-se nos Quadros a seguir.

L

Formas polivalentes de T₄ solúvel recombinante

Os receptores podem ser caracterizados pela sua afinidade pelos ligantes específicos de tal modo que, no equilíbrio, a afinidade intrínseca (K_a) entre os receptores monovalente e o ligante monovalente pode ser definida como $[RL]/[Rf][Lf]$, onde $[RL]$ é a concentração do receptor (R) ligado ao ligante (L) e $[Rf]$ e $[Lf]$ são as concentrações do receptor e do ligante livres, respectivamente [P. A. Underwood, in Advances in Virus Research, ed. K. Maramorosch et al., 34, págs. 283-309 (1988)].

Para um receptor polivalente (com uma valência n) ligado a um ligante polivalente (com uma valência m), pode-se definir uma afinidade funcional como $n[R]/n[Rf]m[Lf]$, onde $[Rb]$ é a concentração dos locais de receptores ligados, e $n[Rf]$ e $m[Lf]$ são, respectivamente, as concentrações dos locais que ligam os receptores e os ligantes livres. O efeito do aumento de valência (o número de locais de ligação) é realçar a estabilidade dos complexos ligante-receptor. A afinidade de um receptor polivalente para um ligante polivalente dependerá de três factores: a associação intrínseca constante de cada local de ligação, a valência (número de locais de ligação) e a relação topológica entre os locais de ligação do receptor e do ligante. Em algumas circunstâncias, as interacções de ligação polivalentes conduzirão a uma afinidade funcional mais elevada. A diminuição da taxa de dissociação dos ligantes polivalentes com receptores polivalentes dá origem a um aumento da afinidade funcional [C. L. Hornick e F. Karush, Immunochemistry, 9, págs. 325-340 (1972); I. Otterness

Macaco # 7-91

Nível de rsT_4
(ng/ml)

| <u>Tempo (horas)</u> | <u>Dia 1</u> | <u>Dia 7</u> | <u>Dia 14</u> | <u>Dia 28</u> |
|----------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| 0 | 22,7* | 96,5 | 158,0 | 19,8 |
| 1 | 278,8 | 199,6 | 360,7 | 238,3 |
| 2 | 281,8 | 366,8 | 306,4 | 441,1 |
| 4 | 214,9 | 246,6 | 363,9 | 393,2 |
| 5 | | | | 290,4 |
| 8 | 72,3 | 105,0 | 199,4 | |
| 9** | 246,2 | | | |
| 10 | 259,6 | | | |
| 12 | 136,0 | | | |
| 22 | 23,8 | | | |
| 24 | 13,4 | | | |

Macaco # 7-92

Nível rsT_4
(ng/ml)

| <u>Tempo (horas)</u> | <u>Dia 1</u> | <u>Dia 7</u> | <u>Dia 14</u> | <u>Dia 28</u> |
|----------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| 0 | 6,7* | 56,0 | 106,3 | 60,9 |
| 1 | 87,2 | 225,8 | 178,0 | 437,7 |
| 2 | 254,2 | 377,9 | 253,2 | 770,6 |
| 4 | 170,0 | 167,3 | 308,2 | 821,5 |
| 5 | | | | 898,3 |
| 8 | 118,9 | 101,2 | 176,5 | |
| 9** | 405,1 | | | |
| 10 | 523,5 | | | |
| 12 | 371,5 | | | |
| 22 | 48,4 | | | |
| 24 | 39,4 | | | |

* - fundo ("background")

** - segunda injeção administrada após a colheita da amostra da oitava hora.

F. Karush, "Principles of Antibody Reactions", in Antibody: A basic tool, ed. J. J. Marchalonis e G. W. Warr, págs. 97-137 (1982)].

O caso mais simples de aumento da afinidade funcional por polivalência do receptor é representado por um receptor solúvel bivalente, tal como uma molécula de anticorpo que tem dois locais de ligação de ligantes idênticos, cada um capaz de ligar, independentemente, antígenos com igual afinidade. Se o antígeno estiver exposto polivalentemente, por exemplo, quimicamente ligado a um suporte sólido de forma a que o espaço entre os locais antigénicos possa ser ligado em ponte (pelos braços) ("arms") de ligação do anticorpo a dois antígenos, a afinidade funcional do anticorpo para o antígeno ligado ao suporte sólido será maior que a afinidade intrínseca do local de ligação do anticorpo para o antígeno monovalente [D. Crothers e H. Metzger, Immunochemistry, 9, págs. 341-57 (1972)]. Devido às partículas do vírus representarem antígenos polivalentes, a maior afinidade funcional dos anticorpos para os antígenos polivalentes é um factor importante para a neutralização do vírus dirigido ao anticorpo.

A associação de T_4 solúvel recombinante e a glicoproteína gp120 de revestimento principal de HIV é um exemplo de receptor monovalente que se liga a ligando monovalente. A afinidade desta interacção foi medida e a associação entre T_4 e gp120 tem uma constante de dissociação $K_d = 4 \times 10^{-9}$ M [L. Lasky et al., Cell, 50, págs. 975-88 (1987)].

Utilizando a analogia do anticorpo, pensa-se que rT_4 po-

livalente demonstrava uma maior afinidade para células infectadas com HIV, expondo gp120, do que rsT_4 monovalente e a relação topológica entre gp120 na partícula de vírus ou na superfície da célula infectada determinava o grau para o qual rsT_4 polivalente exibe maior afinidade funcional do que rsT_4 monovalente. Um exemplo de um rsT_4 polivalente é descrito a seguir, relativamente à produção de um rsT_4 bivalente recombinante que consiste em duas repetições em série de aminoácidos 3-178 seguidas pelas 199 aminoácidos C-terminais de rsT_4 .³ De acordo com esta invenção, um receptor "polivalente" possui dois ou mais locais de ligação para um dado ligando. Além do mais, a afinidade intrínseca de cada local de ligação do ligando de um dado receptor polivalente não necessita de ser idêntica.

Como se mostra na Figura 42, para construir rsT_4 bivalente, digeriu-se pBG391 com NheI, que cliva após a valina na posição 178 em rsT_4 e removeu-se a parte saliente de NheI na extremidade 5' com nuclease de feijão. A seguir, clivou-se com BglII para remover a metade do terminal C da sequência de codificação de rsT_4 em pBG391. Finalmente, ligou-se um fragmento DraI-BglII que continha a sequência de codificação para aminoácidos de rsT_4 (lisina) 3 até (isoleucina) 377 para o pBG391 clivado, para criar pBiv.1, um plasmídeo que codifica para uma proteína de fusão com uma duplicação em série dos 176 aminoácidos N-terminais de rsT_4 , seguindo-se os 199 aminoácidos C-terminais de rsT_4 .³ A proteína produzida por este plasmídeo, contém, deste modo, dois domínios adjacentes de ligação a OKT_4A ou gp120 N-terminais (definidos pelos resíduos de aminoácidos 3 a 111 de rsT_4 .¹¹¹), seguindo-se um domínio de C-terminal ligado a OKT_4 (Fig. 43).

pBiv. 1 foi transfectado por electroporação em células COS 7 para testar a expressão da proteína rsT_4 bivalente. Três dias mais tarde, testou-se o meio condicionado das células transfectadas em relação à presença da proteína bivalente rsT_4 por imunoprecipitação, seguindo-se a análise da mancha de Western da proteína precipitada. Ambos OKT_4A e OKT_4 foram utilizados para imunoprecipitação, para determinar que o epítotope OKT_4 e pelo menos um dos epítotores OKT_4A tivessem dobrado ("folded") correctamente. Ambos os anticorpos precipitaram uma proteína de peso molecular aparente previsto (60000 d) a partir do meio condicionado das células.

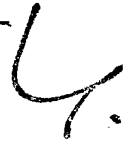
O rsT_4 bivalente pode ser purificado por purificação da imunoafinidade a partir de uma coluna de OKT_4 e a proteína purificada pode então ser utilizada para realizar ensaios de competição quantitativos com $rsT_4.3$. Pensa-se que a molécula bivalente demonstraria competição equivalente contra $rsT_4.3$ para ligação de OKT_4 , mas de modo significativo, maior competição contra rsT_4 monovalente para ligação de OKT_4A . A capacidade de T_4 solúvel recombinante bivalente para bloquear a formação de "syncytium" pode também ser demonstrada no ensaio de fusão de C8166. Pensa-se também, que o T_4 solúvel recombinante bivalente bloquearia a formação de "syncytium" para concentrações significativamente mais baixas do que rsT_4 monovalente, com base na afinidade funcional mais elevada de T_4 solúvel recombinante bivalente para gp120.

De acordo com formas de realização alternativas desta invenção, podem ser utilizados outros métodos para produção de rsT_4 polivalente. Por exemplo, rsT_4 polivalente podem ser produzidos

por ligação química de rsT_4 a qualquer molécula de veículo clinicamente aceitável, um polímero seleccionado do grupo que consiste em Ficoll, polietilenoglicol ou dextrano, utilizando técnicas de ligação convencionais. Alternativamente, rsT_4 pode ser quimicamente ligado a biotina e deixa-se o conjugado de rsT_4 com biotina ligar-se a avidina, resultando em avidina tetravalente/biotina/moléculas de rsT_4 . E rsT_4 pode ser covalentemente ligado a dinitrofenol (DNP) ou trinitrofenol (TNP) e o conjugado resultante precipitou com anti-DNP ou anti-TNP-IgM para formar conjugados decamédicos com uma valência de 10 para locais de ligação de rsT_4 .

Alternativamente, pode-se produzir uma molécula de anticorpo quimérica recombinante com sequências de rsT_4 substituídas para os domínios variáveis de uma qualquer ou ambas as cadeias leve e pesada da molécula de imunoglobulina. Devido ao facto de a T_4 solúvel recombinante possuir actividade de ligação a gp120, a construção de um anticorpo quimérico possuindo dois domínios de T_4 solúvel e domínios de região constante não modificada podia servir como um mediador do assassínio do alvo que são as células infectadas com HIV e que expressam gp 120.

Por exemplo, rsT_4 /IgG1 quimérico pode ser produzido a partir de dois genes quiméricos rsT_4 /cadeia quimérica leve κ humana (rsT_4/C_k) e rsT_4 /cadeia quimérica pesada gama 1 humana (rsT_4/C_{gama-1}). Ambas as regiões C_k e C_{gama-1} foram isoladas a partir de culturas de DNA recombinante humano e cada uma foi subclonada em vectores de selecção de células animais contendo quer neo resistência bacteriana quer marcadores gpt bacterianos para selecção em hospedeiros de células animais contra o antibiótico G_{418} ou ácido micofenólico, respectivamente.



Para construir os genes quiméricos $rsT_4/C_{\text{gama-1}}$ e rsT_4/C_k , um segmento de gene rsT_4 , incluindo, pelo menos, a sequência de sinal de secreção e os 110 resíduos de aminoácido de N-terminais da sequência de codificação de rsT_4 madura e incluindo um dador de união ou uma sua porção, é colocado a montante dos exões do domínio constante k e gama-1. Uma enzima de restrição apropriada pode ser utilizada para cortar no interior do intrão, a jusante da sequência de codificação de rsT_4 desejada, proporcionando deste modo um local dador de união. Subsequentemente, uma enzima de restrição apropriada é utilizada para cortar no interior de intrões a montante das regiões de codificação k e gama-1. A sequência rsT_4 é depois ligada à sequência da região constante k ou gama-1, de tal forma que a sequência de intrão rsT_4 seja contígua aos intrões gama-1 e k. Deste modo, um local de união receptor é proporcionado pelo intrão da região constante k ou gama-1. Alternativamente, os genes quiméricos rsT_4 podem ser construídos sem o uso de intrões, fundindo um segmento de gene de cDNA de rsT_4 apropriado directamente a regiões de codificação k ou gama-1.

Os vectores $rsT_4/C_{\text{gama-1}}$ e rsT_4/C_k podem ser depois co-transfectados, por exemplo, por electroporação em células hospedeiras linfóides ou não linfóides. A seguir à transcrição e à translação dos dois genes quiméricos, os produtos do gene podem associar-se em moléculas de anticorpo quiméricas.

A expressão dos produtos de gene quiméricos pode ser medida por um ensaio imunoabsorvente ligado (ELISA) a enzima que utiliza anti-anticorpo T_4 monoclonal QKT₄A como se descreveu antes ou mediante ensaios de competição para gp120 e radio-ensaios como se descreveu antes. A actividade das quimeras $rsT_4/IgG1$ pode

L

ser medida incubando-as com células injectadas com HIV, na presença de complemento humano, seguido da quantificação da subsequente lise mediada pelo complemento destas células. Alternativamente, a actividade pode ser medida na replicação HIV e ensaios de "Synaytium" como se descreveu antes.

Com vista a determinar se rsT_4 Bivalente tem uma potência maior do que rsT_4 monovalente, misturou-se OKT_4 , a várias concentrações, em conjunto com uma concentração constante de rsT_4 , de forma a que a relação molar de OKT_4 : rsT_4 varie entre 0,2 e 4. Após a pré-incubação da mistura durante a noite a $4^{\circ}C$, adicionaram-se alíquotas ao ensaio de "syncytium" de HIV descrito infra. OKT_4 não tem nenhum efeito neste ensaio quando utilizado isoladamente. Além disso, a concentração de T_4 solúvel recombinante escolhida, não causou inibição neste ensaio. Por consequência, procuraram-se indicações de que a mistura OKT_4/rsT_4 fosse mais potente do que rsT_4 isoladamente. Observou-se que, para relações de OKT_4 : rsT_4 maiores do que 0,2, ocorreu inibição parcial ou completa de formação de "syncytium". Admite-se que, sob condições em que moléculas de rsT_4 estejam ligadas a 1 molécula de OKT_4 , se pode verificar o maior efeito de inibição.

Deste modo, as formas monovalentes, bem como polivalentes de T_4 solúvel recombinante são utilizadas nas composições e métodos desta invenção.

Os microrganismos e as moléculas de DNA recombinantes preparados pelos processos de acordo com a presente invenção estão exemplificados pelas culturas depositadas colecção de culturas da In Vitro International, Inc., em Linthicum, Maryland, em 2 de Setembro de 1987 e identificadas como:

- BG378: E. coli MC1061/pBG378
- 199-7: E. coli MC1061/p199-7
- 170-2: E. coli JA221/p170-2
- EC100: E. coli JM83/pEC100
- BG377: E. coli MC1061/pBG377
- BG380: E. coli MC1061/pBG380
- BG381: E. coli MC1061/pBG381

A estas culturas foram atribuídos os números de acesso IVI 10143-10149, respectivamente.

Além disso, os microrganismos e as moléculas de DNA recombinante de acordo com a presente invenção, estão exemplificados por culturas depositadas na colecção de culturas da In Vitro International, Inc., em Linthicum, Maryland, em 6 de Janeiro de 1988 e identificados como:

- BG-391: E. coli MC1061/pBG391
- BG-392: E. coli MC1061/pBG392
- BG-393: E. coli MC1061/pBG393
- BG-394: E. coli MC1061/pBG394
- BG-396: E. coli MC1061/pBG396
- 203-5 : E. coli SG936/p203-5.

A estas culturas foram atribuídos os números de acesso IVI 10151-10156, respectivamente.

Os microrganismos e as moléculas de DNA recombinante de acordo com esta invenção estão também exemplificados por culturas depositadas na colecção de culturas da In Vitro International, Inc., em Linthicum, Maryland, em 24 de Agosto de 1988 e identificados como:

211-11: E. coli A89/pBG211-11

214-10: E. coli A89/pBG214-10

215-7 : E. coli A89/pBG215-7.

A estas culturas foram atribuídos os números de acesso IVI 10183-10185, respectivamente.

Embora se tenha descrito algumas formas de realização da presente invenção, é evidente que as construções básicas podem ser alteradas para proporcionar outras formas de realização que utilizam processos e composições de acordo com a presente invenção. Deste modo, considera-se que o âmbito da presente invenção é definido pelas reivindicações em anexo e não pelas formas de realização específicas que se apresentaram antes, a título de exemplos.

4.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de moléculas de DNA recombinante, caracterizado pelo facto de incluir uma fase de introdução, em um veículo de clonagem, de uma sequência de DNA escolhida no grupo constituído por:

- a) inserções de DNA de p199-7, pBG377, pBG380, pBG381, p203-5, pBG391, pBG392, pBG393, pBG394, pBG395, pBG396, pBG397, p211-11, p214-10 e p215-7;
- b) sequências de DNA que hibridizam para uma ou mais inserções de DNA anteriores e que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel; e
- c) sequências de DNA que codificam a expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel codificado por expressão para qualquer das inserções de DNA e sequências anteriores estando a referida sequência de DNA ligada de um modo operacional

4.

a uma sequência de controlo de expressão na molécula de DNA recombinante e estando expressa para produzir o referido polipeptido quando se cultiva um hospedeiro transformado com a referida molécula de DNA recombinante.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a referida sequência de DNA (b) codificar para a expressão de um polipeptido idêntico a T4 solúvel que inibe a adesão entre linfócitos T4⁺ e agentes infectantes que visam os linfócitos T4⁺ e a interacção de linfócitos T4⁺ com células que exibem antígenos e alvos de linfócitos T4⁺ mediados para matar.

3.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se escolher a referida sequência de controlo de expressão no grupo constituído pelos promotores proximal e distal de SV40 ou adenovírus, o sistema lac, o sistema Trp, o sistema LAC, o sistema TRC, o operador principal e regiões do promotor do fago λ , as regiões de controlo de revestimento proteínico fd, o promotor para 3-fosfoglicerato-quinase ou outros enzimas glicolíticos, os promotores de fosfatase ácida, o promotor polihedro do sistema de baculovírus e os promotores dos factores de α -acasalamento de leveduras.

4.- Processo para a transformação de um hospedeiro, caracterizado pelo facto de se introduzir nesse hospedeiro uma molécula

4.

de DNA recombinante preparada pelo processo de acordo com o processo referido em uma qualquer das reivindicações 1 a 3.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de se escolher o referido hospedeiro no grupo constituído por estirpes de E.coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, fungos, células animais, células vegetais, células de insectos e células humanas de tecidos de cultura.

6.- Processo para a preparação de polipeptidos idênticos a T4 solúvel, caracterizado pelo facto de se cultivar um hospedeiro transformado com uma molécula de DNA recombinante e de se escolher a sequência de DNA no grupo constituído por:

- a) inserções de DNA de p199-7, pBG377, pBG380, pBG381, p203-5, pBG391, pBG392, pBG393, pBG394, pBG395, pBG396, pBG397, p211-11, p214-10 e p215-7;
- b) sequências de DNA que hibridizam para uma ou mais inserções de DNA anteriores e que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel;
e
- c) sequências de DNA que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel codificado para expressão de qualquer das inserções de DNA e sequências anteriores, estando a referida sequência de DNA ligada de um modo operacional a uma se-

4.

quência de controlo de expressão na molécula de DNA recombinante e sendo expressa para produzir o referido polipeptido quando se cultiva um hospedeiro transformado com a referida molécula de DNA.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de se escolher o polipeptido produzido no grupo constituído por um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{362}$, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{362} , um polipeptido de fórmula $Met-AA_1-362$, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{374} , um polipeptido de fórmula $Met-AA_1-374$, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{377} , um polipeptido de fórmula $Met-AA_1-377$, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{374}$, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{377}$

4.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de se escolher o polipeptido no grupo constituído por um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{182}$, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{182} , um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-182}$, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{182}$, seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{182} , seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-182}$, seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{113}$, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{113} , um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-113}$, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{111}$, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{111} , um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-111}$, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{131}$, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{131} , um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-131}$, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{145}$, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{145} , um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-145}$, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{166}$, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{166} , um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-166}$, ou suas fracções.

5.

1 GAATTAATTC CAGCTTGCTG TGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAG
51 TCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGIATG CAAGCATGC ATCTCAATTA
101 GTCAGCAACC AGGTGTGAA AGTCCCAGG CTCCCAGCA GGCAGAAGTA
151 TGAAAGCAT GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCCTAACT
201 CCGCCATCC GCGCCCTAAC TCGCCCACT TCGCCCAAT CTCCGCCCA
251 TGGCTGACTA ATTTTTTTTA TTTATGCAGA GCGCGAGGCC GCCTGGCCT
301 CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTGGAGG GGTCTCTCTC
351 GTATAGAAC TCGGACCACT CTGAGACGAA GGTCTGGCTC CAGGCCAGCA
401 CGAAGGAGGC TAAGTGGAG GGGTAGCGGT CGTTGTCCAC TAGGGGGTCC
451 ACTCGCTCCA GGGTGTGAAG ACACATGTCG CCTCTTCCG CATCAAGGAA
501 GGTGATTGGT TTATAGGTGT AGGCCACGTG ACCGGGTGT CCTGAAGGGG
551 GGCATAAAA GGGGTGGG GCGGTTCGT CCTCACTCTC TTCGCGATCG
601 CTGTCTGCGA GGGCAGCTG TTGGGCTCGC GGTGAGGAC AAATCTTTCG
651 CGGTCTTTC AGTACTCTTG GATCGGAAAC CCGTCGGCT CCGAACGGTA
701 CTCGGCCACC GAGGACCTG AGCGAGTCCG CATCGACCGG ATCGGAAAC
751 CTCTCGAGAA AGCGTCTAA CCAGTCACAG TCGCAAGGTA GCTGAGCAC
801 CGTGGCGGC GCGAGCGGT GCGGTTCGG GTTGTTCCTG GCGGAGGTGC
851 TGCTGATGAT GTAATTAAG TAGCGGGTCT TGAGAGCGCG GATGGTCCGAG
901 GTGAGGTGT GCAGGGCTGA GATCGATCTG GCCATACACT TGAGTGACAA
951 TGACATCCAC TTTGCCCTTC TCTCCACAGG TGCCCACTCC CAGGTCCAAC
1001 TGGATCCAAG CTTCGACTCG AGGAATCCC CGAAGBAACA AAGCACCCCTC
1051 CCCACTGGGC TCCTGGTTC AGAGCTCAA GTCTTCACAC AGATACGCT
1101 GTTTGABAAG CAGCGGGCAA GAAAGACGCA AGCCAGAGG CCCTGCCATT
1151 TCTGTGGGCI CAGGTCCCTA CTGGCTCAGG CCCCCTGCCCT CCTCGGCAAG
1201 GCCACATGA ACCGGGGAGT CCTTTTAGG CACTTGCTTC TGGTGTGCA
1251 ACTGGCGCTC CTCCCAGCAG CCACTCGGG ¹²⁰¹ AAAGAAAGTG GTGCTGGCA
1301 AAAAAAGGGA TACAGTGGAA CTGACCTGTA CAGCTTCCCA GAAGAAGAGC
1351 ATACAATTCC ACTEGAAAAA CTCCAACCAG ATAAAGATTG TGGAAATCA



1401 GGGCTCCTTC TTAACATAAG GTCCATCCAA GCTGAATGAT CGCGCTGACT
1451 CAAGAAGAAG CTTGTGGGAC CAAGGAAACT TTCCCCTGAT CATCAAGAAT
1501 CTTAAGATAG AAGACTCAGA TACTTACATC TGTGAAGTGG AGGACCAGAA
1551 GGAGGAGGTG CAATTGCTAG TGTTCCGATT GACTGCCAAC TCTGACACCC
1601 ACCTGCTTCA GGGGCAGAGC CTGACCCTGA CCTTGGAGAG CCCCCCTGGT
1651 AGTAGCCCCCT CAGTGCAATG TAGGAGTCCA AGGGGTAAAA ACATACAGGG
1701 GGGGAAGACC CTCTCCGTGT CTCAGCTGGA GCTCCAGGAT AGTGGCACCT
1751 GGACATGCAC TGCTTGCAG AACCAGAAGA AGGTGGAGTT CAAAATAGAC
1801 ATCGTGGTGC TAGCTTTCCA GAACCTCCAG CATAGTCTA^{STOP}AA~~AA~~GAAAGAGG
1851 GGGAACAGGT GGAGTCTCC TTCCCCTCG CCTTTACAGT TGA~~AA~~AAGCTG
1901 ACGGGCAGTG GCGAGCTGTG GTGGCAGGCG GAGAGGGCTT CCTCCTCCAA
1951 GTCTTGGATC ACCTTTGACC TGAAGAACAA GGAAGTGTCT GTAAAACGGG
2001 TTACCCAGGA CCCTAAGCTC CAGATGGGCA AGAAGCTCCC GCTCCACCTC
2051 ACCCTGCCCC AGGCCTTGCC TCAGTATGCT GGCTCTGGAA ACCTCACCTC
2101 GGCCCTTGAA GCGAAAACAG GAAAGTTGCA TCAGGAAGTG AACCTGGTGG
2151 TGATGAGAGC CACTCAGCTC CAGAAAAATT TGACCTGTGA GGTGTGGGGA
2201 CCCACCTCCC CTAAGCTGAT GCTGAGTTTG AACTGGAGA ACAAGGAGGC
2251 AAAGTCTCG AAGCGGGAGA AGGCGGTGTG GGTGCTGAAC CCTGAGGCGG
2301 GGATGTGGCA GTGTCTGCTG AGTGA~~CT~~CGG GACAGGTCCT GCTGGAATCC
2351 AACATCAAGG TTCTGCCAC ATGGTCGACC CCGGTGCAGC CAATGGCCCT
2401 GATTTGAGAT CTTTGTGAAG GAACCTTACT TCTGTGGTGT GACATAATTG
2451 GACAACTAC CTACAGAGAT TTAAGCTCT AAGGTAAATA TAAAATTTT
2501 AAGTGATAA TGTGTTAAAC TACTGATTCT AATTGTTTGT GTATTTTAGA
2551 TTCCAACCTA TGGAACTGAT GAATGGGAGC AGTGGTGGAA TGCCTTTAAAT
2601 GAGGAAAACC TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG ATGATGAGGC
2651 TACTGCTGAC TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAAG AGAAAGGTAG
2701 AAGACCCCAA GGACTTTCCT TCAGAATTGC TAAGTTTTTT GAGTCATGCT
2751 GTGTTTAGTA ATAGA~~ACT~~CT TGCTTGCTTT GCTATTTACA CCACAAAGGA
2801 AAAAGCTGCA CTGCTATACA AGAAAATTAT GGAAAATAT TCTGTAACCT
2851 TTATAAGTAG GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT TTTTCTTACT
2901 CCACACAGGC ATAGAGTGTG TGCTATTAAT AACTATGCTC AAAAAATTGTG
2951 TACCTTTAGC TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA TATTTGATGT
3001 ATAGTGCCTT GACTAGAGAT CATAATCAGC CATACCACAT TTGTAGAGGT

4

3051 TTTACTTGCT TTA AAAAACC TCCCACACCT CCCCTGAAC CTGAAACATA
3101 AAATGAATGC AATTGTTGTT GTTAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT
3151 TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTC ACAATAAAG CATT TTTTTC
3201 ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAACT CATCAATGTA TCTTATCATG
3251 TCTGGATCCT CTACGCCGGA CGCATCGTGG CCGGCATCAC CGGCGCCACA
3301 GGTGCGGTTG CTGGCGCCTA TATCGCCGAC ATCACCGATG GGAAGATCG
3351 GGCTCGCCAC TTCGGGCTCA TGAGCGCTTG TTTCCGGCTG GGTATGGTGG
3401 CAGGCCCGTG GCCGGGGGAC TGTTGGGCGC CATCTCCTTG CATGCACCAT
3451 TCCTTGCGGC GCGGTGCTC AACGGCCTCA ACCTACTACT GGGCTGCTTC
3501 CTAATGCAGG AGTCGCATAA GGGAGAGCGT CGACCGATGC CCTTGAGAGC
3551 CTTCAACCCA GTCAGCTCCT TCCGGTGGGC GCGGGGCATG ACTATCGTCG
3601 CCGCACTTAT GACTGTCTTC TTTATCATGC AACTCGTAGG ACAGGTGCCG
3651 GCAGCGCTCT GGGTCATTTT CGGCGAGGAC CGCTTTCGCT GGAGCGCGAC
3701 GATGATCGGC CTGTGCTTG CGGTATTCGG AATCTTGAC GCCCTCGCTC
3751 AAGCCTTCGT CACTGGTCCC GCCACCAAAC GTTTCGGCGA GAAGCAGGCC
3801 ATTATCGCCG GCATGGCGGC CGACCGCGTG GGCTACGTCT TGCTGGCGTT
3851 CGCGACCGCA GGCTGGATGG CCTTCCCAT TATGATTCTT CTCGTTCCG
3901 GCGGCATCGG GATGCCCGG TTGCAGGCCA TGCTGTCCAG GCAGGTAGAT
3951 GACGACCATC AGGGACAGCT TCAAGGATCG CTCGCGGCTC TTACCAGCCT
4001 AACTTCGATC ACTGGACCGC TGATCGTCAC GCGGATTTAT GCCGCTCGG
4051 CGAGCACATG GAACGGGTTG GCATGGATTG TAGGCGCCGC CCTATACCTT
4101 GTCTGCTCC CCGCGTTGCG TCGCGGTGCA TGAGCCGGG CCACCTCGAC
4151 CTGAATGGAA GCCGGCGCA CCTCGCTAAC GGATTCACCA CTCCAAGAAT
4201 TGGAGCCAAT CAATTCTTGC GGAGAACTGT GAATGCGCAA ACCAACCTT
4251 GGCAGAACAT ATCCATCGCG TCCGCCATCT CCAGCAGCCG CACGCGGCGC
4301 ATCTCGGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCTGACG
4351 AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA
4401 CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC
4451 TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCTTCGG
4501 GAAGCGTGGC GCTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
4551 TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCC CCGTTCAGCC
4601 CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAAC TATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA
4651 GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA

4.

4701 GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA
4751 CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG
4801 TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
4851 GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTCGAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA
4901 AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC
4951 AGTGGAACGA AAACCTCACGT TAAGGGATT TGGTCATGAG ATTATCAAAA
5001 AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTA AAATGAAGTT TTAATCAAT
5051 CTAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA
5101 GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTATC CATAGTTGCC
5151 TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG
5201 CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTACCCG GCTCCAGATT
5251 TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCTT
5301 GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG
5351 AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC CAACGTTGTT GCCATTGCTG
5401 CAGGCATCGT GGTGTACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
5451 GGTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA
5501 AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG
5551 CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATC TCTTACTGTC
5601 ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
5651 ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGCGTCAA
5701 CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
5751 GGAAAACGTT CTTCCGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG
5801 ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT
5851 TACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC
5901 GCAAAAAAGG GAATAAGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT
5951 CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG
6001 GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC
6051 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT
6101 GACATTAACC TATAAAAAATA GCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAA

4.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de se escolher o polipeptido produzido no grupo constituído por um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{326}$ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{362} de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-362}$ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{374} de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-374}$, de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{377} de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-377}$ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{374}$ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{377}$ de proteína T4 madura ou suas fracções.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de se escolher o polipeptido produzido no grupo constituído por um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{182}$ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{182} de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-182}$ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula $AA_{-23}-AA_{182}$ de proteína T4 madura, seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido de fórmula AA_1-AA_{182} de proteína T4 madura, seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-histidina-serina-leucina, um polipeptido de fórmula $Met-AA_{1-182}$ de proteína T4 madura, seguido pelos aminoácidos asparagina-leucina-glutamina-histidina-serina-leucina, um polipeptido de fórmula

AA₋₂₃-AA₁₁₃ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula
AA₁-AA₁₁₃ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula

Met-AA₁₋₁₁₃ de proteína T4 madura, um poli-
peptido de fórmula AA₁-AA₁₁₁ de proteína T4 madura, um poli-
peptido de fórmula Met-AA₁₋₁₁₁ de proteína T4 madura, um polipepti-
do de fórmula AA₋₂₃-AA₁₃₁ de proteína T4 madura, um polipeptido
de fórmula AA₁-AA₁₃₁ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórm-
mula Met-AA₁₋₁₃₁ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula
AA₋₂₃-AA₁₄₅ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula
AA₁-AA₁₄₅ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula
Met-AA₁₋₁₄₅ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula
AA₋₂₃-AA₁₆₆ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula
AA₁-AA₁₆₆ de proteína T4 madura, um polipeptido de fórmula
Met-AA₁₋₁₆₆ de proteína T4 madura ou as suas fracções.

11.- Processo para a preparação de um polipeptido recombi-
nante idêntico a T4 solúvel, caracterizado pelo facto de se cul-
tivar um hospedeiro transformado com uma sequência de DNA que co-
difica para o referido polipeptido.

12.- Processo para a preparação de composições farmacêuti-
cas apropriadas para o tratamento e a prevenção de infecções por
HIV, caracterizado pelo facto de se associar uma quantidade imuno-
terapêutica ou imunossupressora eficaz de um polipeptido escolhido
no grupo constituído pelos polipeptidos produzidos pelo processo

4.

de acordo com uma qualquer das reivindicações 6 a 11, como ingrediente activo, com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

13.- Processo para tratamento e prevenção de infecções por HIV em um doente, caracterizado pelo facto de se utilizar nesse doente uma composição, preparada de acordo com o processo descrito na reivindicação 12, de um modo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, em uma gama de dosagens compreendida entre cerca de 0,5 e 5,0 mg/kg de peso do corpo e por dia.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de se utilizar uma composição de tratamento por via intramuscular, em uma gama de dosagens compreendida entre cerca de 0,5 e 5,0 mg/kg de peso do corpo e por dia.

15.- Processo para detectar ou controlar uma infecção por HIV, caracterizado pelo facto de se utilizar para diagnóstico uma quantidade eficaz de diagnóstico de um polipeptido preparado pelo processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 6 a 11.

16.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas apropriadas para tratar ou prevenir infecções por HIV, caracterizado pelo facto de se associar uma quantidade imunoterapêutica ou imunossupressora eficaz de um anticorpo para um polipeptido es-

4.

colhido no grupo constituído pelos polipeptidos produzidos pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 6 a 11, como ingrediente activo, com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

17.- Processo para tratar ou prevenir a infecção por HIV em um doente, caracterizado pelo facto de se tratar esse doente com uma composição produzida de acordo com a reivindicação 16 de um modo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, em uma gama de dosagens compreendida entre cerca de 0,5 e 5,0 mg/kg de peso do corpo e por dia.

18.- Processo para purificar vírus HIV de uma amostra, caracterizado pelo facto de se expor essa amostra a um polipeptido escolhido no grupo constituído pelos polipeptidos produzidos pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 6 a 11.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de se purificar vírus HIV de uma amostra biológica.

20.- Processo para a preparação de uma molécula de DNA recombinante, caracterizado pelo facto de se introduzir, em um veículo de clonagem, a inserção de DNA de p170-2, a qual está ligada de um modo operacional a uma sequência de controlo de expressão na referida molécula de DNA recombinante e está expressa para produ-

4.

zir um polipeptido idêntico a T4 quando se cultiva um hospedeiro transformado com a referida molécula de DNA recombinante.

21.- Processo para transformar um hospedeiro, caracterizado pelo facto de se introduzir nesse hospedeiro uma molécula de DNA recombinante preparada pelo processo de acordo com a reivindicação 20.

22.- Processo para a preparação de polipeptidos idênticos a T4, caracterizado pelo facto de se cultivar um hospedeiro transformado por uma molécula de DNA recombinante caracterizada pela inserção de DNA de p170-2, encontrando-se esta inserção de DNA ligada de um modo operacional a uma sequência de controlo de expressão na referida molécula de DNA recombinante e sendo expressa para produzir um polipeptido idêntico a T4 quando se cultiva um hospedeiro transformado com a referida molécula de DNA recombinante.

23.- Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade imunoterapêutica ou imunossupressora eficaz de um receptor de proteína solúvel, como ingrediente activo, com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

24.- Processo para tratar doentes, caracterizado pelo facto

4.

de se utilizar de um modo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico uma composição farmacêutica preparada de acordo com a reivindicação 23, como meio de tratamento, em uma gama de dosagens compreendida entre cerca de 0,5 e 5,0 mg/kg de peso do corpo e por dia.

25.- Método para detectar e controlar uma infecção viral, caracterizado pelo facto de se utilizar uma quantidade de diagnóstico eficaz de um receptor de proteína solúvel como meio de diagnóstico.

26.- Processo para a preparação de moléculas de DNA recombinante, caracterizado pelo facto de se introduzir, em um veículo de clonagem, uma sequência de DNA escolhida no grupo constituído por:

- a) uma inserção de DNA de pBiv.1,
- b) sequências de DNA que hibridizam para a inserção de DNA de pBiv.1 e que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T₄ solúvel polivalente; e
- c) sequências de DNA que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T₄ solúvel polivalente codificado para a inserção de DNA de pBiv.1, estando a referida sequência de DNA ligada de um modo operacional a uma sequência de controlo de expressão na referida molécula de DNA recombinante e sen-

4.

do expressa para produzir o referido polipeptido quando se cultiva um hospedeiro transformado com a molécula de DNA referida antes.

27.- Processo para transformar um hospedeiro, caracterizado pelo facto de se introduzir nesse hospedeiro uma molécula de DNA recombinante produzida pelo processo de acordo com a reivindicação 26.

28.- Processo para a preparação de um polipeptido polivalente idêntico a T4, caracterizado pelo facto de se cultivar um hospedeiro transformado com a referida molécula de DNA recombinante caracterizada por uma sequência de DNA recombinante escolhida no grupo constituído por:

- a) uma inserção de DNA de pBiv.1;
- b) sequências de DNA que hibridizam para a inserção de DNA de pBiv.1 e que codificam por expressão para um polipeptido semelhante a T4 solúvel polivalente; e
- c) sequências de DNA que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel polivalente codificado para a inserção de DNA de pBiv.1, estando a sequência de DNA referida ligada de um modo operacional a uma sequência de controlo de expressão na molécula de DNA recombinante referida

4

antes e sendo expressa para produzir o citado polipeptido quando se cultiva um hospedeiro transformado com a dita molécula de DNA.

29.- Processo para a preparação de um polipeptido idêntico a T4 solúvel polivalente, caracterizado pelo facto:

- a) de se cultivar um hospedeiro transformado com uma molécula de DNA recombinante produzida pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3 para produzir um polipeptido semelhante a T4-solúvel; e
- b) de se ligar o polipeptido referido a um veículo para se formar um polipeptido idêntico a T4 solúvel polivalente.

30.- Processo para a preparação de uma rsT4/JgG1 quimérica, caracterizado pelo facto de se co-transfectar uma célula hospedeira com um vector de expressão caracterizado por uma sequência de DNA constituída por:

- a) uma primeira fracção que incorpora uma sequência de DNA codificadora para uma região constante de uma cadeia leve de imunoglobulina; e
- b) uma segunda fracção que incorpora uma sequência de DNA escolhida no grupo constituído por:
 - (i) inserções de DNA de p199-7, pBG377, pRG380,

4.

pBG381, p203-5, pBG391, pBG392, pBG393, pBG394, pBG395, pBG396, pBG397, p211-11, p214-10 e p215-7;

(ii) sequências de DNA que hibridizam para uma ou mais inserções de DNA anteriores e que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel; e

(iii) sequências de DNA que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel codificado para expressão por qualquer das inserções de DNA e sequências anteriores sendo a segunda fracção referida antes ligada a montante da primeira fracção citada; e

um vector de expressão caracterizado por uma sequência de DNA que inclui:

- a) uma primeira fracção que incorpora uma sequência de DNA codificadora para uma região constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina; e
- b) uma segunda fracção que incorpora uma sequência de DNA escolhida no grupo constituído por:
 - (i) as inserções de DNA de p199-7, pBG377, pBG380, pBG381, p203-5, pBG391, pBG392, pBG393, pBG394, pBG395, pBG396, pBG397, p211-11, p214-10 e p215-7;
 - (ii) sequências de DNA que hibridizam para uma ou mais inserções de DNA anteriores e que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4

4.

solúvel; e

(iii) sequências de DNA que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel codificado para a expressão por qualquer das inserções de DNA e sequências anteriores, estando a segunda fração citada ligada a montante da dita primeira fração.

31.- Processo para a preparação de uma rsT4/IgG1 quimérica, caracterizado pelo facto de se transfectar uma célula hospedeira com um vector de expressão caracterizado por uma primeira sequência de DNA que inclui:

- a) uma primeira fração que incorpora uma sequência de DNA codificadora para uma região constante de uma cadeia leve de imunoglobulina; e
- b) uma segunda fração que incorpora uma sequência de DNA escolhida no grupo constituído por:
 - (i) as inserções de DNA de p199-7, pBG377, pBG380, pBG381, p203-5, pBG391, pBG392, pBG393, pBG394, pBG395, pBG396, pBG397, p211-11, p214-10 e p215-7;
 - (ii) sequências de DNA que hibridizam para uma ou mais inserções de DNA anteriores e que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel; e
 - (iii) sequências de DNA que codificam por expressão

4.

para um polipeptido idêntico a T4 solúvel codificado para expressão por qualquer das inserções de DNA e sequências anteriores, estando a segunda fracção citada ligada a montante da primeira fracção referida;

sendo também o referido vector de expressão caracterizado por uma segunda sequência de DNA constituída por:

a) uma primeira fracção que incorpora uma sequência de DNA codificadora para uma região constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina; e

b) uma segunda fracção que incorpora uma sequência de DNA escolhida no grupo constituído por:

(i) as inserções de DNA de p199-7, pBG377, pBG380, pBG381, p203-5, pBG391, pBG392, pBG393, pBG394, pBG395, pBG396, pBG397, p211-11, p214-10 e p215-7;

(ii) sequências de DNA que hibridizam para uma ou mais inserções de DNA anteriores e que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel; e

(iii) sequências de DNA que codificam por expressão para um polipeptido idêntico a T4 solúvel codificado para expressão por qualquer das inserções de DNA e sequências anteriores, sendo a segunda fracção referida antes unida a montante da primeira

4.

ra fracção citada.

32.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas caracterizado pelo facto de se incorporar uma quantidade eficaz imunoterapêutica ou iminosupressora de um polipeptido idêntico a T4 solúvel, como ingrediente activo, preparado pelo processo de acordo com uma das reivindicações 28 ou 29.

33.- Processo para tratar doentes, caracterizado pelo facto de se utilizar de um modo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico uma composição preparada pelo processo de acordo com a reivindicação 32, em uma gama de dosagens compreendida entre cerca de 0,5 e 5,0 mg/kg de peso do corpo e por dia.

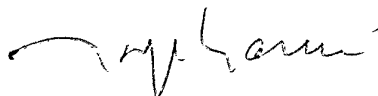
34.- Processo para detectar ou para controlar o desenvolvimento de infecção por HIV, caracterizado pelo facto de se utilizar uma quantidade eficaz de um polipeptido idêntico a T4 solúvel como agente de diagnóstico preparado pelo processo de acordo com uma das reivindicações 28 ou 29.

35.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se utilizar uma quantidade eficaz de uma rsT4/IgG1 quimérica, como agente imunoterapêutico ou immunosupressor, preparada pelo processo de acordo com a reivindicação 30 ou 31.

4.

36.- Processo para tratar doentes, caracterizado pelo facto se utilizar de um modo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico uma composição preparada pelo processo de acordo com a reivindicação 35, em uma gama de dosagens compreendida entre cerca de 0,5 e 5,0 mg/kg de peso do corpo e por dia,

Lisboa, 10 de Março de 1989
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



4.

R E S U M O

"Processo para a preparação de proteínas T4 solúveis"

A invenção diz respeito a sequências de DNA, moléculas de DNA recombinante e processos para a preparação da proteína T4 solúvel. Mais particularmente, esta invenção diz respeito a sequências de DNA que são caracterizadas por codificarem na expressão, num hospedeiro unicelular apropriado, formas solúveis de T4, o receptor na superfície de linfócitos T4⁺ ou derivados respectivos. De acordo com esta invenção, as sequências de DNA, as moléculas de DNA recombinante e os processos podem ser utilizados para produzir T4 solúvel essencialmente livre de outras proteínas de origem humana. Esta proteína solúvel pode ser, deste modo, utilizada de forma vantajosa em composições imunoterapêuticas e de diagnóstico.

As composições imunoterapêuticas baseadas em T4 solúvel são úteis no tratamento de doentes imunodeficientes que sofrem de doenças provocadas por agentes infecciosos cujos primeiros alvos são os linfócitos T4⁺. De acordo com uma forma de realização preferida, esta invenção diz respeito a composições baseadas em T4 solúvel que são úteis na prevenção, tratamento ou detecção do síndrome da imunodeficiência adquirida, complexo relacionado com o



SIDA e infecção de HIV.

Lisboa, 10 de Março de 1989
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

