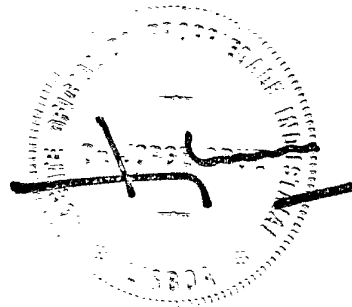




MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O invento diz respeito à preparação e identificação de uma porção da proteína do involucro do HIV denominada domínio de neutralização principal. Os polipeptídeos que incluem este domínio possuem a capacidade de induzirem e/ou ligarem-se a anticorpos neutralizantes.

Mais concretamente estes compostos são preparados por inclusão de uma sequência de aminoácidos que: a) é o domínio de neutralização principal de uma variante de HIV; b) é uma porção do domínio de neutralização

=====

REPLIGEN CORPORATION

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVAS PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DE HIV ÚTEIS NO DIAGNÓSTICO, PROFILAXIA OU TERAPIA DA SIDA"

principal de uma variante de HIV; ou c) é equivalente a um do m^{ínio} de neutralização principal ou a uma sua porção.

O invento diz respeito ainda a um processo para a preparação de novos peptideos de HIV que po - dem ser usados no diagnóstico, profilaxia ou terapia da SIDA. Estes polipeptídeos podem ser preparados por processos químicos de síntese conhecidos ou por técnicas de DNA recombinante.

REFERÊNCIA A UM PEDIDO DE PATENTE RELACIONADO

Isto é uma continuação em parte do nosso pedido de patente copendente Nº. de Série 359.543, entregue em 1 de Junho de 1989, o qual é uma continuação em parte do nosso pedido de patente copendente Nº. de Série 252.949, entregue em 3 de Outubro de 1988, o qual é uma continuação em parte do nosso pedido de patente copendente Nº. de Série 090.080 entregue em 27 de Agosto de 1987.

FUNDAMENTO DO INVENTO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus linfotrópico para células T humanas III (HTLV-III), o vírus associado a linfadenopatias (LAV) ou o retrovírus associado à SIDA (ARV) tem sido identificado como a causa da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Popovic, M., M.G. Sarngadharan, E. Read e R.C. Gallo [1984] Science 224: 497-500). O vírus apresenta tropismo para a sub-série de linfócitos OK T4⁺ (Klatzmann D., F. Barre-Sinoussi, M.T. Nugeyre, C. Dautet, E. Vilmex, C. Griscelli, F. Brun-Vezinet, D. Bouzioux, J.D. Gluckman, J.C. Chermann e L. Montagnier [1984] Science 225: 59-63). Os anticorpos contra proteínas de HIV presentes nos soros da maior parte dos pacientes com AIDS e dos pacientes com complexo relacionado com AIDS (ARC) e em pessoas assintomáticas infectadas com o vírus (Sarngadharan, M.G., M. Popovic, L. Bruch, J. Schupbach e R. C. Gallo [1984] Science 224: 506-508) tornaram possível o desenvolvimento de testes imunológicos que detectam anticorpos contra estes antígenos. Estes testes são usados para limitar o alastramento do HIV através de transfusões sanguíneas atra-

vés da identificação de amostras de sangue de pessoas infectadas com o vírus. Os testes de diagnóstico normalmente encontrados no comércio utilizam as proteínas de vírus inativado e antígenios.

Além de permitir novas abordagens do diagnóstico, o DNA recombinante dá grandes esperanças para o desenvolvimento de vacinas contra bactérias e vírus (Wilson, T. [1984] Bio/Technology 2: 29-39). Os organismos mais largamente empregues para expressar vacinas recombinantes têm sido E. coli, S. cerevisiae e células de mamífero em culturas. Por exemplo, vacinas de subunidades contra a febre efetosa (Kleid, D.G., D. Yansura, B. Small, D. Dowbenko, D.M. Moore, M.J. Brubman, P.D. Mckercher, D.O. Morgan, B.H. Robertson e H.L. Bacharach [1981] Science 214: 1125-1129) e malária (Young, J. F., W.T. Hockmeyer, M. Groos, W. Ripley-Ballon, R.A. Wirtz, J. H. Trospey, R.L. Beaudoin, M.R. Hollingclale, L.M. Miller, C.L. Diggs e M. Rasenberg [1985] Science 228: 958-962) foram sintetizados em E. coli. Outros exemplos são o antígeno de superfície do vírus da hepatite B produzido em levedura (Mc Allister, W.J., E.B. Buynak, R.Z. Maigetter, D.E. Wampler, W.J. Miller e M.R. Hilleman [1984] Nature 307: 178-180) e uma vacina para herpes produzida em células de mamífero (Berman, P. W., T. Gregory, D. Chase e L.A. Lasky [1984] Science 227: 1490-1492).

O invólucro de HIV na sua totalidade ou em parte tem sido usado para imunizar animais. Os termos "proteína", "peptídeo" e "polipeptídeo" têm sido usados indiscriminadamente neste pedido de patente para se referirem a compostos químicos tendo mais de um aminoácido. O termo "composto" conforme aqui é usado refere-se a compostos químicos em geral. Assim, "composto" inclui proteína peptídeos e polipeptídeos. Também estão incluídos na categoria de "composto" os compostos de fusão em que os polipeptídeos estão combinados com frações não polipeptídicas. Conforme é usado no presente invento, o termo "proteína natural do invólucro de

HIV" refere-se às proteínas gpl60, gpl20 e gp41 apenas. Conforme é usado no presente pedido de patente, HIV refere-se a qualquer vírus HIV, incluindo HIV-1 e HIV-2.

Tanto a gpl20 nativa (Robey et al [1986] Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 7023-7027; Matthews et al [1986] Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 9709-9713) e proteínas recombinantes (Laskey et al. [1986] Science 233: 209-212; Putney et al [1986] Science 234: 1392-1395) induzem anticorpos que podem neutralizar HIV em culturas celulares. No entanto, todos estes imunogénios induzem anticorpos que neutralizam apenas a variante viral da qual deriva a subunidade. Portanto, seria vantajoso e original uma nova vacina capaz de proteger contra múltiplos variantes virais.

É conhecido que HIV sofre variação da sequência de aminoácidos, particularmente no gene do invólucro (Starcich, B.R. [1986] Cell 45: 637-648; Hahn, B.H. et al [1986] Science 232: 1548-1553). Cerca de 100 variantes foram analisados por clonagem molecular e análise de reconhecimento com enzimas de restrição e vários destes foram analisados por sequenciação de nucleotídeos. Alguns destes são isolados de HIV conhecidos com RF (Popovic, M. et al. [1984] Science 224: 497-500), WMJ-1 (Hahn, B.H. et al. [1986] Science 232: 1548-1553), LAV (Wain-Habson, S. et al [1985] Cell 40: 9-17) e ARV-2 (Sanchez-Pescador, R. et al [1985] Science 227: 484-492). Um aspecto deste invento é a definição da fracção de HIV que compreende o principal domínio neutralizante. O domínio neutralizante principal está situado entre os resíduos da cisteína nos aminoácidos 296 e 331 do invólucro de HIV. A numeração dos aminoácidos segue a sequência publicada de HIV-III_B (Ratner, L. et al. [1985] Nature 313: 277-284). Sabe-se que este domínio é hipervariável mas retém as propriedades antigénios e imunogénicas específicas de tipo relacionadas com a neutralização do vírus.

Um outro aspecto do presente invento é a descoberta de aminoácidos altamente conservados den-

tro do domínio neutralizante principal. Se bem que tenham sido publicados certas sequências desta região (ver, por exemplo, Southwest Foundation for Biological Research, pedido de patente PCT publicada, Publicação Nº. WO 87/02775; Genetic Systems Corporation, Published United Kingdom Application Nº. GB 2196634 A; Stichting Central Diergeneeskundig Instituut, Pedido de Patente EPO Publicada Nº. 0311 219), a presença das regiões conservadas aqui descritas nunca antes foram descritas.

"Kits" de diagnóstico ou agentes terapêuticas usando proteínas virais isoladas a partir de células infectadas com vírus ou proteínas recombinantes conteriam apítomos específicos da variante viral a partir da qual foram isolados. Reagentes contendo proteínas de múltiplas variantes teriam a utilidade de serem mais largamente reactivos devidos a conterem uma maior diversidade de epítomos. Isto seria vantajoso no despiste de soro de paciente ou no tratamento terapêutico de pacientes.

Os peptídeos sintéticos podem ser vantajosos como ingredientes activo numa vacina, agente terapêutico ou reagente de diagnóstico devido à facilidade de produção e capacidade para modificar a sua estrutura e modo de apresentação.

Os peptídeos sintéticos têm sido usados com êxito na vacinação contra o vírus da febre afectosa (Bittle et al., [1982] Nature 298: 30-33); poliovírus (Emini et al. [1983] Nature 305: 699); hepatite B (Gerin et al. [1983] Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 2365-2369); e gripe (Shapira et al. [1984] Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 2461-2465).

Nesta altura existe de facto a necessidade de desenvolver uma vacina contra SIDA. Tal vacina, com vantagem, seria eficaz na imunização de um hospedeiro contra as variantes do vírus da SIDA.

Breve sumário do invento

O presente invento define a localização do principal domínio de neutralização do HIV e divulga métodos para usar este segmento da proteína do invólucro de HIV no desenvolvimento de reagentes para diagnóstico, terapêutica e profilaxia. Mais especificamente, o principal domínio de neutralização do HIV está situado entre os resíduos de cisteína 296 e 331 da proteína do envólucro de HIV. A localização deste domínio está mostrada na Tabela 1. Se bem que seja conhecido a sequência de aminoácidos específica do principal domínio de neutralização como altamente variável entre as variantes, encontramos peptídeos deste domínio que são invariavelmente capazes de induzir e/ou ligarem-se a anticorpos neutralizantes. Este resultado inesperado proporciona uma base para a projeção de composições e estratégias para a prevenção, diagnóstico e tratamento da SIDA. A descoberta do principal domínio de neutralização (também conhecido como a "ansa") resultou de uma pesquisa exaustiva envolvendo muitas proteínas e peptídeos do invólucro de HIV derivados de muitas variantes de HIV. São aqui divulgadas proteínas e peptídeos capazes de induzirem e/ou ligarem-se a anticorpos neutralizantes. Estas novas proteínas e peptídeos de HIV, ou seus equivalentes, podem ser usados no diagnóstico, profilaxia e/ou terapia da SIDA. Ainda, os peptídeos podem ser usados como imunogénios ou reagentes de despitte para gerar ou identificar anticorpos policlonais e monoclonais que poderão ser úteis na profilaxia, diagnóstico e terapia da infecção por HIV.

Um outro aspecto do invento é a descoberta de regiões altamente conservadas dentro do principal domínio neutralizante. Esta descoberta foi bastante inesperada devido à conhecida variabilidade dos aminoácidos dentro deste segmento da proteína do invólucro de HIV.

As proteínas e peptídeos do invento são aqui identificadas pelas suas sequências de aminoácidos e pelo DNA que as codifica. Assim, elas podem ser preparadas por processos de síntese química conhecidos ou por meios de DNA recombinante.

Estes peptídeos, ou peptídeos tendo as propriedades antigénicas ou imunogénicas destes peptídeos podem ser usados, com vantagem, uma vacina, e.g. uma mistura de peptídeos, para induzir uma gama larga de anticorpos neutralizantes no hospedeiro. Ainda, estes peptídeos podem ser usados sequencialmente, e.g. imunizando inicialmente com um equivalente peptídico do principal domínio de neutralização de uma variedade de HIV seguido de imunização com um ou mais dos peptídeos atrás. Anticorpos policlonais ou monoclonais que se ligam a estes peptídeos seriam vantajosos na profilaxia ou terapia contra o HIV, o agente causador da SIDA.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1 mostra sequências que normalmente ocorrem no principal domínio de neutralização.

Figura 2 é um esquema da construção do gene de múltiplos epítomos.

Figura 3 descreve os passos na construção de um gene específico de múltiplos epítomos.

Figura 4 mostra as sequências de quatro oligómeros de cadeia simples sintetizado para a construção de um gene de múltiplos epítomos.

Descrição detalhada do invento

É aqui descrito um segmento da proteína do invólucro de HIV que induz e/ou liga-se com anticorpos neutralizantes. Esta propriedade única e altamente inesperada foi observada em cada variante de HIV que foi examinada. O segmento de interesse foi designado o "principal domínio de neutralização". O principal domínio de neutralização está delimitado por resíduos cisteína que ocorrem nas posições 296 e 381. Deve-se notar que estes mesmos resíduos de cisteína foram descritas como começando em 302 em vez de 296 (Rusche, J.R. et al [1988] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (15): 3198-3202). Devido aos resíduos de cisteína estarem ligados através de ligações dissulfureto, o segmento entre os resíduos tendo a formar uma ansa. Portanto, o principal domínio de neutralização é também referido como a "ansa".

O segmento da proteína do envólucro aqui identificado como o principal domínio de neutralização é conhecido como sendo altamente variável entre variantes de HIV. Assim, é surpreendente que, para cada variante, este segmento seja capaz de induzir e/ou ligar-se com anticorpos neutralizantes.

O principal domínio de neutralização aqui identificado é um pequeno segmento da proteína do envólucro de HIV. Este pequeno segmento pode ser combinado com outros aminoácidos, caso se pretenda, com uma finalidade específica. Todas estas proteínas são aqui reivindicados excepto sempre que tais proteínas constituam uma proteína natural do invólucro de HIV. Conforme aqui é usado o termo "proteína natural do invólucro" refere-se apenas a gp160, gp120 e gp41.

Na Tabela 1 estão apresentados as sequências do principal domínio de neutralização para algumas das variantes testadas. A Tabela 9 contém uma lista completa

dos principais domínios de neutralização.

Os aminoácidos podem ser referidos usando um sistema de abreviatura de três letras ou de uma letra. Segue-se uma lista dos aminoácidos comuns e suas abreviaturas.

<u>Aminoácido</u>	<u>Símbolo de 3 letras</u>	<u>Símbolo de 1 letra</u>
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Asn and/or Asp	Asx	B
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Gln and/or Glu	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Segue-se uma lista de proteínas e peptídeos que compreendem os principais domínios de neutralização ou seus segmentos.

A. Proteínas recombinantes compreendendo um domínio de neutralização principal

1. Proteína de fusão de 10 kd do HIV, designada Sub 1. Na Tabela 2 está apresentada a sequência de aminoácidos da fracção HIV de Sub 1 na Tabela 2A está apresentada a sequência de DNA da fracção HIV de sub 1. A sequência de aminoácidos de sub 1 está apresentada na Tabela 2B e a sequência de DNA na tabela 2C.
2. Proteína fusão de 18 kd do HIV designada Sub 2. A sequência de aminoácidos da fracção HIV de Sub 2 está apresentada na Tabela 3 e a sequência de DNA da fracção HIV de sub 2 está apresentada na Tabela 3A. Toda a sequência de aminoácidos de Sub 2 está apresentada na Tabela 3B e toda a sequência de DNA na Tabela 3C.
3. Proteína de fusão de 27 kd do HIV designada PBl_{RF}. A sequência de aminoácidos da fracção HIV do PBl_{RF} está apresentada na tabela 4 e a sequência de DNA da fracção HIV de PBl_{RF} está apresentado na Tabela 4A. Toda a sequência de aminoácidos e a sequência de DNA de PBl_{RF} estão nas Tabelas 4B e 4C, respectivamente.
4. Proteína de fusão de 28 kd do HIV designada PBl_{MN}. A sequência de aminoácidos da fracção HIV de PBl_{MN} está apresentada na Tabela 5 e a sequência de DNA da fracção HIV de PBl_{MN} está apresentada na Tabe-

la 5A. Toda a sequência de aminoácidos e a sequência de DNA de PBl_{MN} estão apresentadas nas Tabelas 5B e 5C, respectivamente.

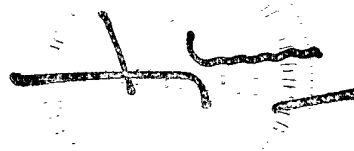
5. Proteína de fusão de 26 kd do HIV designada PBl_{SC}. A sequência de aminoácidos da fracção HIV de PBl_{SC} está apresentada na Tabela 6 e a sequência de DNA da fracção HIV de PBl_{SC} está apresentada na Tabela 6A. Toda a sequência de aminoácidos e a sequência de DNA de PBl_{SC} estão apresentadas na Tabela 6 e a sequência de DNA da fracção HIV de PBl_{SC} está apresentada na Tabela 6A. Toda a sequência de aminoácidos e a sequência de DNA de PBl_{SC} estão apresentadas nas Tabelas 6B e 6C respectivamente.
6. Proteína de fusão de 26 kd de HIV designada PBl_{WMJ2}. A sequência de aminoácidos da fracção HIV de PBl_{WMJ2} está apresentada na Tabela 7 e a sequência de DNA da fracção HIV de PBl_{WMJ2} está apresentada na Tabela 7A. Toda a sequência de aminoácidos e a sequência de DNA de PBl_{WMJ2} estão apresentadas nas Tabelas 7B e 7C, respectivamente.

B. Peptídeos sintéticos compreendendo segmentos do principal domínio neutralizante de variantes de HIV.

O aminoácido cisteína entre parêntesis é adicionado com a finalidade de fazer a ligação cruzada a proteínas veículo. Também, sempre que os peptídeos tenham cisteínas nos extremos ou perto destes, estas cisteínas podem formar uma ponte dissulfureto, dando assim aos peptídeos uma configuração em ansa. Para muitos destes peptídeos que não possuem cisteínas nos extremos ou perto destes, podem ser adicionadas cisteínas caso se pretenda uma configuração tipo ansa.

A configuração em ansa pode ser utilizada para aumentar as propriedades imunogênicas dos peptídeos. Outros aminoácidos entre parêntesis são espaçadores imunologicamente silenciosos.

Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile	Arg	Ile	Gln	Arg	Gly
Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Val	Thr	Ile	Gly	Lys	Ile	Gly
(Cys)											



Peptideo136 do isolado HIV-IIIIB);

Leu	Asn	Gln	Ser	Val	Glu	Ile	Asn	Cys	Thr	Arg	Pro	Asn
Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile	Arg	Ile	Gln	Arg	Gly	Pro
Gly	Arg	Ala	Phe	Val	Thr	Ile	Gly	Lys	Ile	Gly	Asn	Met

Peptideo139 (do isolado HIV-RF)

Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile	Thr	Lys	Gly	Pro	Gly
Arg	Val	Ile	Tyr	Ala	Thr	Gly	Gln	Ile	Ile	Gly	(Cys)

Peptide 141 (do isolado HIV-WMJ2);

Asn	Asn	Val	Arg	Arg	Ser	Leu	Ser	Ile	Gly	Pro	Gly
Arg	Ala	Phe	Arg	Thr	Arg	Glu	Ile	Ile	Gly	(Cys)	

Peptideo142 (do isolado HIV-MN);

Tyr	Asn	Lys	Arg	Lys	Arg	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly
Arg	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr	Lys	Asn	Ile	Ile	Gly	
(Cys)											

Peptideo143 (Do isolado HIV-SC);

Asn	Asn	Thr	Thr	Arg	Ser	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly
Arg	Ala	Phe	Tyr	Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Ile	Gly	
(Cys)											

Peptideo131 (do isolado HIV-IIIIB);

(Tyr) Cys	Thr	Arg	Pro	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile
Arg	Ile	Gln	Arg	Gly							

Peptideo132 (do isolado HIV-IIIIB);

Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Val	Thr	Ile	Gly	Lys	Ile	Gly	Asn
Met	Arg	Gln	Ala	His	Cys	(Tyr)						

Peptideo134 (do isolado HIV-IIIIB)

Glu	Arg	Val	Ala	Asp	Leu	Asn	Gln	Ser	Val	Glu	Ile	Asn
Cys	Thr	Arg	Pro	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile	



Peptide 339 (do isolado HIV-RF);

Ile Thr Lys Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr (Cys)

RP341 (do isolado HIV-SC);

Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Arg (Cys)

RP343 (do isolado HIV-SC);

Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr (Cys)

RP60 (do isolado HIV-IIIB);

Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser
Ile

RP335 (do isolado HIV-IIIB);

Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe (Cys)

RP337 (do isolado HIV-IIIB);

Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe
(Cys)

RP77 (do isolado HIV-IIIB)

Gly Pro Gly Arg Ala Phe

RP83 (do isolado HIV-WMJ1);

His Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Gly
(Cys)

RP79 (do isolado HIV-IIIB);

Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe (Cys)

RP57:

Ile Asn Cys Thr Arg Pro Ala His Cys Asn Ile Ser

RP55:

Ala His Cys Asn Ile Ser



RP75A:

(Ala Ala Ala Ala Ala Ala) Gly Pro Gly Arg (Ala
Ala Ala Ala Ala Cys)

RP56:

Ile Asn Cys Thr Arg Pro

RP59:

Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser

RP342 (do isolado HIV-MN);

Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr (Cys)

RP96 (relacionado com HIV-MN);

(Cys) Gly Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr
(Cys)

RP97 (relacionado com HIV-MN);

(Ser Gly Gly) Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr (Gly
Gly Ser Cys)

RP98 (relacionado com HIV-MN)

(Cys Ser Gly Gly) Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr
(Gly Gly Ser Cys)

RP99 (relacionado com HIV-MN);

(Cys Ser Gly Gly) Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr
(Gly Gly Ser)

RP100:

(Ser Gly Gly) Thr Arg Lys Gly Ile His Ile Gly Pro Gly Arg
Ala Ile Tyr (Gly Gly Ser Cys)

RP102:

(Ser Gly Gly) Thr Arg Lys Ser Ile Ser Ile Gly Pro Gly Arg
Ala Phe (Gly Gly Ser Cys)

RP91 (fusão MN-Hepatite)

Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Gly Phe Phe
Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp (Cys)

RP104:

(Ser Gly Gly) Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
(Gly Gly Ser Cys)

RP106:

(Ser Gly Gly) Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe (Gly
Gly Ser Cys)

RP108:

(Ser Gly Gly) His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Thr
Gly (Gly Gly Ser Cys)

RP70 (do isolado HIV-MN):

Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile
His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn Ile
Ile Gly Thr Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser

RP84 (do isolado HIV-MN);

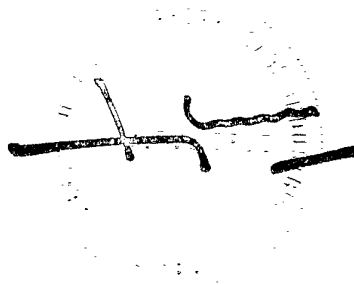
Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Gly (Cys)

RP144 (do isolado 7887-3):

Asn Asn Thr Ser Arg Gly Ile Arg Ile Gly Pro Gly Arg Ala Ile
Leu Ala Thr Glu Arg Ile Ile Gly (Cys)

RP145 (do isolado 6587-7):

Asn Asn Thr Arg Lys Gly Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala
Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly (Cys)



RP146 (do isolado CC);

Asn Asn Thr Lys Lys Gly Ile Arg Ile Gly Pro Gly Arg Ala
Val Tyr Thr Ala Arg Arg Ile Ile Gly (Cys)

RP147 (do isolado KK261);

Asn Asn Thr Arg Lys Gly Ile Tyr Val Gly Ser Gly Arg Lys
Val Tyr Thr Arg His Lys Ile Ile Gly (Cys)

RP150 (do isolado ARV-2);

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Tyr Ile Gly Pro Gly Arg Ala
Phe His Thr Thr Gly Arg Ile Ile Gly (Cys)

RP151 (do isolado NYS);

Asn Asn Thr Lys Lys Gly Ile Ala Ile Gly Pro Gly Arg Thr
Leu Tyr Ala Arg Glu Lys Ile Ile Gly (Cys)

C. Peptídeos híbridos contendo seqüências de mais do que resina variante

RP73 (dos isolados HIV-IIIB, HIV-RF):

Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Val Ile
Tyr (Cys)

RP74 (dos isolados HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-MN, HIV-SC):

Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Lys
Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr
(Cys)

RP80 (dos isolados HIV-IIIB, HIV-RF):

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr Ala Thr
(Cys)

RP81 (dos isolados HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-WMJ1, HIV-MN):

Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Gly
Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr Ala Thr
(Cys)

RP82 (dos isolados HIV-MN, HIV-WMJ1);

Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Gly
(Cys)

RP88 (dos isolados HIV-MN, HIV-SC);

Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
(Cys)

RP137 (dos isolados HIV-IIIB, HIV-RF);

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Thr Lys Gly Pro
Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly (Cys)

RP140 (dos isolados HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-MN, HIV-SC);

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Thr Lys Gly Pro Gly Arg
Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly (Cys)

Peptide 64 (dos isolados HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-MN, HIV-SC);

Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Ile Phe Tyr Arg
Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr (Cys)

Peptide 338 (dos isolados HIV-IIIB, HIV-RF);

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr (Cys)

Peptide 138 (dos isolados HIV-IIIB, HIV-RF);

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly
Pro Gly Arg Val Ile Tyr Ala Thr Gly Lys Ile Gly
(Cys)

RP63 (III_B-RF híbrido)

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr (Cys)

D. Sequências de peptídeos miscelâneos

RP41:

Gly Pro Gly Arg

RP61:

Gly Pro Gly Arg (Ala Ala Ala Ala Ala Ala Cys)

RP75:

(Cys Ala Ala Ala Ala Ala) Gly Pro Gly Arg Ala Phe (Ala Ala
Ala Cys)

RP111:

Ile Gln Arg Gly Pro Gly Ile Gln Arg Gly Pro Gly (Cys)

RP113:

Gln Arg Gly Pro Gly Arg Gln Arg Gly Pro Gly Arg Gln Arg
Gly Pro Gly Arg (Cys)

RP114:

Arg Gly Pro Gly Arg Gly Pro Gly Arg Gly Pro Gly Arg Gly
Pro Gly Arg (Cys)

RP116:

Gly Pro Gly Arg Ala Phe Gly Pro Gly Arg Ala Phe Gly Pro
Gly Arg Ala Phe (Cys)

RP120:

Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr (Cys)

RP121c:

(Cys) Gly Pro Gly Arg (Cys)

RP122c:

(Cys) Ile Gly Pro Gly Arg Ala (Cys)

RP123c:

(Cys) His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe (Cys)

As proteínas e peptídeos que exemplificam o presente invento podem ser preparadas por processos de síntese bem conhecidos. Tais processos de DNA recombinante são aqui divulgados uma vez que eles foram, de facto, os processos inicialmente utilizando para se obter as novas proteínas e peptídeos do invento. No entanto, uma vez preparadas estas identidades e as suas moléculas sequenciadoras, é obvio para os familiarizados com a área que o método preferido para os fazer seriam agora os meios de síntese química. Por exemplo, existem máquinas automáticas que podem fazer facilmente proteínas e peptídeos dos tamanhos moleculares aqui descritos.

Nos processo de DNA recombinante para fazer algumas das proteínas e peptídeos do invento foi usado um vector de expressão plasmídeo designado pREV2.2. Este plasmídeo foi inicialmente construido a partir de um plasmídeo pBGl.

O plasmídeo pBGl está depositado no hospedeiro E. coli MS371 no Northern Regional Research Laboratory (NRRL, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA). Está na colecção permanente deste depositário. E. coli MS371 (pBGl), NRRL B-15904, foi depositada em 1 de Novembro de 1984. E. coli MS371, NRRL B-15129 está agora disponível ao público.

O plasmídeo pREV2.2 foi depositado no hospedeiro E. coli JM 103 NRRL em 30 de Julho de 1986. E. coli JM103 (pREV2.2) recebeu o número de acesso NRRL B-18091 NRRL B-15904 e NRRL B-18091 estarão disponíveis, sem restrições ao público quando os fragmentos de uma patente que os divulga.

Outras estirpes de E. coli, aqui divulgadas, foram depositadas como se segue.

E. coli SG20251, NRRL B-15918 foi depositada em 12 de Dezembro de 1984.

E. coli CAG629(pKH1), NRRL B-18095
foi depositada em 30 de Julho de 1986.

Este último depósito pode estar
sujeito a técnicas convencionais para separar o plasmídeo da
célula hospedeira e portanto usa o hospedeiro E. coli CAG629
conforme aqui é descrito.

As presentes culturas foram depo-
sitadas em condições que asseguram que o acesso às culturas
estará disponível durante a pendência do pedido de patente que
se divulga a alguém determinado pelo Commissioner of Patents
and Trademarks que se lhes deve referir como 37 CFR 1.14 e
35 USC 122. Os depósitos estão disponíveis de acordo com os
requisitos das leis para patentes estrangeiras em países onde
as contrapartes do presente pedido, ou seus derivados tenham
sido requeridas. No entanto, deverá entender-se que a disponi-
bilidade de um depósito não constitui uma licença para prati-
car o presente invento em prejuízo dos direitos de patente ce-
didos por acção governamental.

Ainda, os presentes depósitos de
cultura serão guardados e tornados disponíveis ao público de
acordo com o disposto no Budapest Treaty for the Deposit of
Microorganisms, i.e., serão guardados com todo o cuidado neces-
sário para os manter viáveis e não contaminados durante um pe-
ríodo de pelo menos cinco anos após o pedido mais recente para
o fornecimento de uma amostra dos depósitos e em qualquer dos
casos durante um período de pelo menos 30 (trinta) anos após
a data de depósito ou durante a vida obrigatória de qualquer
patente que possa sair divulgando as culturas. O depositante
agradece o dever de substituir os depósitos caso o depositário
seja incapaz de fornecer uma amostra quando necessário devido
ao estado dos depósitos. Todas as restrições sobre a disponibi-
lidade ao público dos depósitos das presente culturas serão
irrevogavelmente removidos quando do pagamento de uma patente

que os divulgue.

As novas proteínas e peptídeos de HIV do presente invento podem ser expressas em Saccharomyces cerevisiae usando plasmídeos contendo o promotor induzível da galactose deste organismo (Broach, J.R., y. Li, L.C. Wu e M. Jayaram [1983] em Experimental Manipulation of Gene Expression, p.83, ed. M. Inouye, Academic Press). Estes plasmídeos são designados YEp51 e YEp52 (Broach, J.R. et al [1983]) e contêm a origem de replicação de E. coli, o gene da β -lactamase, o gene LEU2 de levedura, a origem de replicação de 2 μ m e o locus REP3 do círculo 2 μ m. A expressão do gene recombinante é conduzida pelo promotor do gene GAL10 de levedura.

Podem ser usados promotores de levedura tais como galactose e álcool-desidrogenase (Bennetzen, J.L. e B.D. Hall [1982] J. Biol. Chem. 257:3018; Ammerer, G. [1983] em Methods in Enzymology Vol.101, pág. 192), fosfoglicerato-cinase (Derynck, R., R.A. Hitzeman, P.W. Gray, D.V. Goeddel [1983] em Experimental Manipulation of Gene Expression, p.247, ed. M. Inouye, Academic Press), triosfosfato-isomerase (Abber, T.e G. Kawasaki [1982] J. Molec. and Applied Genet. 1:419) ou enolase (Innes, M.A. et al [1985] Science 226:21).

Os genes aqui divulgados podem ser expressos em células de macaco. Quando os genes codificados destas proteínas são clonados num dos plasmídeos como descrito em Okayama e Berg (Okayama, H. e P. Berg [1983] Molec. and Cell. Biol. 3:280) e referencias nele incluídas ou células C05 transformadas com estes plasmídeos, a síntese de proteínas do HIV pode ser detectada imunologicamente.

Podem ser usados outros sistemas de expressão de genes/Produção de proteínas em células de mamíferos. São exemplos de outros destes sistemas e sistema de expressão do vírus da vacina (Moss, B. 1985/ Immunology Today

6:243; Chakrabasti. S. K., Brechling, B. Moss /1985/ Molec. and Cell. Biol. 5:3403) e os vectores derivados de retrovírus murinos (Mulligan, R.C. [1983] em Experimental Manipulation of Gene Expression, p.155 ed. M. Inouye, Academic Press).

As proteínas e peptídeos de HIV do presente invento podem sintetizadas quimicamente por técnicos de síntese de peptídeos em fase sólida tais como BOC e DMOC (Merrifield, R.B. [1963] J. Amer. Chem. Soc. 85:2149; Chang, C. e J. Meienhofer [1978] Int. J. Peptide Protein Res. 11:246).

Tal como é bem conhecido na área, a sequência de aminoácidos de uma proteína é determinada pela sequência de nucleotídeos do DNA. Devido à redundância do código genético, i.e., mais do que um triplo de nucleotídeos codificador (codão) pode ser usado para a maior parte dos aminoácidos usados para fazer proteínas, diferentes sequências de nucleotídeos podem codificar um aminoácido particular. Assim, o código genético pode ser descrito como se segue:

Fenilalanina (Fen)	TTK	Histidina (His)	CAK
Leucina (Leu)	XTY	Glutamina (Glu)	CAJ
Isoleucina (Ile)	ATM	Asparagina (asn)	AAK
Metionina (Met)	ATG	Lisina (Lis)	AAJ
Valina (Val)	GTL	Ácido aspártica (asp)	GAK
Serina (Ser)	QRS	Ácido glutâmico (Glu)	GAJ
Prolina (Pro)	CCL	Cisteína (Cis)	TGK
Treonina (Tre)	ACL	Triptofano (Trp)	TGG
Alanina (Ala)	GCL	Arginina (Arg)	WGZ
Tirosina (Tir)	TAK	Glicina (Gli)	GGL
Sinal de terminação	TAJ		
Sinal de terminação	TGA		

Chave: Cada triplo de desoxinucleotídeos de 3 letras corresponde a um trinucleotídeo de mRNA, tendo um extremo 5' na esquerda e um extremo 3' na direita.

Todas as sequências de DNA aqui apresentadas são as da cadeia cuja sequência corresponde à sequência do mRNA, com timidina substituída por uracilo. As letras descrevem as bases purinas ou pirimidinas formadoras da sequência de desoxinucleotídeos.

A = adenina

G = guanina

C = citosina

T = timina

X = T ou C se Y fôr A ou G

X = C ou Y fôr C ou T

Y = A, G, C ou T se X fôr C

Y = A ou G se X fôr T

W = C ou A se Z fôr A ou G

W = C se Z fôr C ou T

Z = A, G, C ou T se W fôr C

Z = A ou G se W fôr A

QR = TC se S fôr A, G, C ou T; como alternativa

QR = AG se S fôr T ou C.

J = A ou G

K = T ou C

L = A, T, C ou G

M = A, C ou T.

O que foi dito mostra que as novas sequências de aminoácidos das proteínas e peptídeos de HIV do presente invento podem ser preparados através de outras sequências de nucleotídeos além das quais divulgadas. Sequências de nucleotídeos funcionalmente equivalentes codificadoras

das novas sequências de aminoácidos destas proteínas e peptídeos de HIV ou seus fragmentos tendo actividade antigénica ou imunogénica de HIV ou terapêutica podem ser preparadas por processos ou síntese conhecidos. Assim, o presente invento inclui tais sequências de nucleotídeos funcionalmente equivalentes.

Assim, o âmbito do presente invento inclui não só as sequências de nucleotídeos específicos aqui descritos como também sequências semelhantes codificadoras de proteínas ou fragmentos de proteínas tendo capacidade comparável para induzir a formação de e/ou ligação de anticorpos específicos de HIV possuindo as propriedades de neutralização do vírus.

O termo "equivalente" está a ser usado na sua aplicação normal em patentes significando uma sequência de nucleotídeos que desempenha um papel substancialmente idêntico ao da sequência ou nucleotídeos aqui identificados para produzir moléculas com substancialmente semelhante actividade antigénica ou imunogénica de HIV ou terapêutica essencialmente no mesmo tipo de hospedeiro. Estão dentro desta definição subfragmentos que possuem actividade antigénica ou imunogénica de HIV ou terapêutica.

Conforme foi divulgado atrás está dentro dos conhecimentos dos familiarizados com a engenharia genética como usar as sequências de nucleotídeos codificadores de actividade antigénica ou imunogénica de HIV ou terapêutica do presente invento para produzir proteínas de HIV via processos microbianos. A fusão das sequências num vector de expressão e transformação ou transfecção de hospedeiros, eucarióticos (células de levedura ou de mamífero) ou procarióticas (células bacterianas), são processos bem estabelecidos usados na produção de outras proteínas bem conhecidas, eg., insulina, interferões, hormona de crescimento humana, IL-1, IL-2 e similares. Processo semelhantes suas modificações óbvias podem ser empre-



ques para preparar proteínas ou peptídeos de HIV por meios microbianos ou tecnologia de cultura de tecidos de acordo com o presente invento.

As sequências de nucleotídeos aqui divulgadas podem ser preparadas por uma "máquina de genes" por processos bem conhecidos. Isto é possível devido à divulgação da sequência de nucleotídeos.

As enzimas de restrição descritas podem ser adquiridas à Bethesda Research Laboratories Gaithersburg, M.D. ou New England Biolabs, Beverly, M.A. As enzimas são usados de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Os vários métodos empregues na preparação dos plasmídeos e transformação de organismos hospedeiros são bem conhecidos. Estes processos estão todos descritos em Maniatis, T., E.F. Fritsche e J. Sambrook (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory New York. Assim, está dentro do conhecimento dos familiarizados com a engenharia genética extrair DNA de células microbianas, fazer digestões com enzimas de restrição, electroforese de fragmentos de DNA, colocar caudas em plasmídeos, e empalhar-los, inserir DNA, ligar DNA, transformar células, e.g. células E. coli, preparar DNA de plasmídeo, electroforese de proteínas e sequências DNA.

Os ensaios imunológicos que empregam proteínas ou peptídeos de HIV do invento podem tomar uma variedade de formas. Um tipo preferido é um ensaio em fase líquida em que o antigénio de HIV e a amostra a ser testada são misturadas e deixadas formar complexos imunes em solução os quais são então detectados por uma variedade de métodos. Um outro tipo preferido é um ensaio imunométrico em fase sólida. Nos ensaios em fase sólida uma proteína ou peptídeos de HIV é imobilizado numa fase sólida para formar um antigénio-

-imunoadsorvente. O imunoadsorvente é incubado com a amostra a ser testada. Após um período de incubação adequado, o imunoadsorvente é separado da amostra e o anticorpo marcado anti-IgIs humana é usado para detectar o anticorpo humano anti-HIV ligado ao imunoadsorvente. A quantidade da marca associada ao imunoadsorvente pode ser comparada com testemunhas positivas e negativas para testar a presença ou ausência de anticorpo anti-HIV.

O imunoadsorvente pode ser preparado por adsorção ou acoplamento de uma proteína ou peptídeo purificado de HIV a uma fase sólida. Podem ser usadas várias fases sólidas, como sejam esferas de vidro, polistireno, polipropileno, dextrano ou outro material. Outras fases sólidas adequadas incluem tubos ou placas formadas a partir destes materiais ou revestidos com eles.

As proteínas ou peptídeos de HIV podem ser ligadas covalentemente ou não covalentemente à fase sólida por técnicas tais como ligação covalente através de uma ligação amida ou éster ou adsorção. Após a proteína ou peptídeo de HIV estar fixada à fase sólida, a fase sólida pode ser revestida com uma proteína animal, e.g. 3% de gelatina de peixe. Isto proporciona uma proteína bloqueadora que reduz a adsorção não específica à superfície imunoadsorvente.

O imunoadsorvente é então incubado com a amostra a ser testada quanto ao anticorpo anti-HIV. No despista de sangue usa-se o plasma sanguíneo ou soro. O plasma ou soro é diluído com plasma ou soro animal normal. O plasma ou soro diluente deriva da mesma espécie animal normal. O plasma ou soro diluente deriva da mesma espécie animal que é a fonte do anticorpo anti-IgG humana. O anticorpo anti-IgG humana preferido é o anticorpo de cabras anti-IgG humana. Assim no formato preferido, o diluente será soro ou plasma de cabra.

As condições de incubação, e.g. pH e temperatura e a duração da incubação não são críticas. Estes parâmetros podem ser otimizados por experimentação de rotina. Geralmente, a incubação decorrerá durante 1-2 horas, a cerca de 45°C num tampão de pH 7-8.

Após incubação, o imunoadsorvente e a amostra são separados. A separação pode ser conseguida por qualquer técnica de separação convencional como seja sedimentação ou centrifugação. O imunoadsorvente deve então ser lavado para eliminar qualquer substância interferente.

O imunoadsorvente é incubado com o anticorpo marcado (marcador) anti-IgG humano para detectar o anticorpo humano a ele ligado. Geralmente o imunoadsorvente é incubado com uma solução do anticorpo marcado anti-IgG humana o qual uma pequena quantidade (cerca de 1%) do soro ou plasma da espécie animal que serve como fonte do anticorpo anti-IgG humana. O anticorpo anti-IgG humana pode ser obtido a partir de qualquer fonte animal. No entanto, é preferido o anticorpo de cabra anti-IgG humana. O anticorpo anti-IgG humana pode ser um anticorpo contra o fragmento Fc da IgG humana, por exemplo anticorpo de cabra anti-Fc de IgG humana.

O anticorpo anti-IgG humano ou anti-Fc de IgG humana pode ser marcado com um material radioactivo como seja ^{125}I ; marcado com uma marca óptica, como seja um material fluorescente; ou marcada com uma enzima tal como peroxidase de rábula silvestre. O anticorpo anti-humano pode também ser biotinilado e avidina usada para detectar a sua ligação ao imunoadsorvente.

Após incubação com o anticorpo marcado, o imunoadsorvente é separada da solução e a marca associada ao imunoadsorvente é avaliada. Dependendo da escolha da marca, a avaliação pode ser feita por uma variedade de métodos. A marca pode ser detectada com um contador gama se a marca for

um material fluorescente. No caso de uma enzima, a detecção da marca pode ser feita colorimetricamente empregando um substrato da enzima.

A quantidade de marca associada ao imunoabsorvente é comparado com testemunhas positivas e negativas de modo a determinar a presença de anticorpos anti-HIV. As testemunhas são geralmente analisadas simultaneamente com a amostra a ser testada. Uma testemunha positiva é um soro contendo anticorpo contra HIV; uma testemunha negativa é um soro de indivíduos saudáveis que não contem anticorpo contra HIV.

Por conveniência e normalização, os reagentes para efectuar o ensaio imunométrico podem ser montados em "kits" de ensaio. Por exemplo, um "kit" para o despiste de sangue, pode incluir:

- (a) um imunoabsorvente, e.g. uma esfera de polistireno revestida com uma proteína ou peptídeo de HIV;
- (b) um diluente para a amostra de soro ou plasma, e.g., soro ou plasma normal de cabra;
- (c) um anticorpo anti-IgG humana, e.g., anticorpo de cabra anti-IgG humana em solução aquosa tamponada contendo aproximadamente 1% de soro ou plasma de cabra;
- (d) uma testemunha positiva, e.g. soro contendo anticorpo contra pelo menos uma das novas proteínas ou peptídeos de HIV; e
- (e) uma testemunha negativa; e.g., soro reunido ou indivíduos saudáveis que não contêm anticorpo contra pelo menos uma das novas proteínas ou peptídeos de HIV.

Se a marca fôr uma enzima, um elemento adicional do "kit" pode ser o substrato da enzima.

Um outro tipo de ensaio para anticorpos anti-HIV é um ensaio de antigénios em sanduiche. Neste ensaio uma proteína ou peptídeo marcado de HIV é usado em vez do anticorpo anti-IgG humana para detectar anticorpo anti-HIV ligado ao imunoabsorvente. O ensaio baseia-se em princípio na bivalência das moléculas de anticorpo. Um sítio de ligação do anticorpo liga-se ao antigénio fixado à fase sólida; o segundo está disponível para ligação ao antigénio marcado. O processo do ensaio é essencialmente o mesmo descrito para o ensaio imunométrico exceptuando que após incubação com a amostra, o imunoabsorvente é incubado com uma solução de proteína ou peptídeo marca de HIV. As proteínas ou peptídeos de HIV podem ser marcados com radioisótopo, uma enzima, etc., para este tipo de ensaio.

Num terceiro formato, a proteína bacteriana, proteína A, que se liga ao segmento Fc de uma molécula de IgG sem interferir com a interacção antigénio-anticorpo pode ser usada como traçador marcado para detectar anticorpo anti-HIV adsorvido ao imunoabsorvente. A proteína A pode ser facilmente marcada com um radioisótopo, enzima ou outras espécies detectáveis.

Os ensaios imunoquímicos que empregam uma proteína ou peptídeo de HIV têm sido várias vantagens relativamente aos que empregam um vírus completo (ou destruído). Os ensaios baseados numa proteína ou peptídeo de HIV aliviarão a preocupação acerca das quantidades cada vez maiores de vírus infeccioso e da variabilidade inerente associada à cultura de células e produção de vírus. Ainda, os ensaios auxiliarão a minimizar o modo de construir SIDA pelos técnicos em hospitais, clinicas e bancos de sangue que efectuam o teste.

Os ensaios imunoquímicos que empregam proteínas recombinantes do envólucro derivados de várias variantes virais. Têm vantagens adicionais relativamente às proteínas de uma única variante de HIV. Os ensaios que incluem sequências de proteína de várias variantes são provavelmente mais precisos na detecção de anticorpos na população humana infectada com várias variantes de HIV. Também o ensaio imuno-sorvente em fase sólida com enzima (ELISA) utilizando diferentes proteínas variantes de HIV permitiria a determinação de serotipos predominantes em diferentes áreas geográficas. Esta determinação não foi possível até agora uma vez que nenhum "kit" de detecção de anticorpos disponível utiliza mais de uma variante de HIV.

Uma outra utilização de proteínas recombinantes de variantes de HIV é induzir anti-soros específicos das variantes em animais de laboratório. Este anti-soro proporcionaria um reagente para identificar qual a variante viral que infectou um indivíduo. Normalmente, a "tipagem dos vírus" pode apenas ser feita por clonagem e sequenciação de genes virais. A ligação do soro específica da variante a um isolado viral de um paciente proporcionaria um meio de detecção rápida normalmente não disponível. Por exemplo, os soros induzidos contra proteínas designadas PBl_{IIIB}, PBl_{RF}, PBl_{MN}, PBl_{SC} e PBl_{WMJ2} podem ser usados para a despiste de isolados virais de pacientes para determinar qual a variante de HIV com o que o isolado clínico apresenta mais semelhanças. Este "despiste" pode ser feito por uma variedade de técnicas de ligação de anticorpo-antígeno conhecidos.

Vacinas compreendendo uma ou mais das proteínas ou peptídeos de HIV, aqui divulgados, e suas variantes tendo propriedades antigénicas, podem ser preparadas por processos conhecidos. Por exemplo, tais vacinas podem ser preparadas na forma injectável, e.g. soluções ou suspensões líquidas. Também podem ser preparadas formas sólidas para solução ou suspensão num líquido antes da injeção.

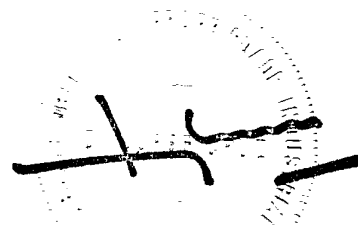
Facultativamente, a preparação também pode ser emulsionada. O ingrediente ou ingredientes antigénicos activos podem ser misturados com excipientes que são farmacêuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo. São exemplos de tais excipientes água, soro fisiológico, dextrose, glicerol, etanol ou similares e suas combinações..Em adição, como se pretenda, a vacina pode conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tamponantes do pH ou adjuvantes tais como hidróxido de alumínio ou muranil-dipeptídeo ou suas variações. No caso de peptídeos, o acoplamento a moléculas maiores tais como KLH algumas vezes aumenta a imunogenicidade. Convencionalmente as vacinas são administradas parenteralmente, por injeção, por exemplo por via subcutânea ou intramuscular. Formulações adicionais adequadas a outros modos de administração incluem supositórios e, nalguns casos, formulações orais. Para os supositórios, os ligantes tradicionais e veículos incluem, por exemplo, polialcalenoglicóis ou triglicéridos. Os supositórios podem ser formados a partir de misturas contendo o ingrediente activo na gama entre cerca de 0,5% e cerca de 10%, de preferência cerca de 1 a cerca de 2%. As formulações orais podem incluir os excipientes normalmente empregues, tais, como por exemplo, manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio e similares. Estas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas formulação de libertação controlada ou pós e contêm entre cerca de 10% e cerca de 95% de ingrediente activo, de preferência entre cerca de 25% e cerca de 70%.

Os compostos podem ser formulados na vacina como formas neutras ou sais. Sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição ácida (formados com os grupos amina livres do peptídeo) e que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, ácido clorídrico ou fosfórico ou com ácidos orgânicos tais como acético, oxálico, tartárico, mandélico e similares. Os sais formados com os grupos carbonilo livres podem também ser derivados de bases inor-

gânicos tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio, ou férricos e com bases orgânicos tais como isopropilamino, trimetilamina, x-etilaminoetanol, histidina, procarina e similares. Uma composição de vacina pode incluir peptídeos contendo epítomos de células T auxiliares em combinação com fragmentos de proteína contendo o principal domínio de neutralização. Vários destes epítomos foram mapeados dentro do envólucro de HIV e estas regiões observou-se estimularem a proliferação e libertação de linfocinas pelos linfócitos. Colocando estes epítomos em simultâneo numa vacina poderá resultar na estimulação das respostas imunes humoral e celular.

Como alternativa, uma composição de vacina pode incluir um composto que funcione para aumentar a resposta imune em geral. Um destes compostos é a interleuquina-2 (IL-2) que foi descrita como aumentando a imunogenicidade por estimulação generalizada do sistema imune (Nunberg et al. [1988] Em New Chemical and Genetic Approaches to Vaccination, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). IL-2 pode ser acoplada com um peptídeo ou proteína de HIV compreendendo o PND para aumentar a eficácia da vacinação.

As vacinas são administradas de modo compatível com a formulação de dosagem em quantidades tais que sejam terapêuticamente eficazes e imunogénicas. A quantidade a ser administrada depende do indivíduo a ser tratado, da capacidade do sistema imune do indivíduo para sintetizar anticorpos e do gene de protecção pretendido. As quantidades precisas do ingrediente activo que é necessário administrar depende da avaliação do médico e são específicos para cada indivíduo. No entanto, gamas de dosagem adequadas são da ordem de várias centenas de microgramas de ingrediente activo por indivíduo. Os regimes adequados para a administração inicial e os reforços são também variáveis, mas tipicamente uma administração inicial é seguida de uma injeção subsequente ou outra administração com um intervalo de uma ou duas semanas.



É conhecido que o HIV sofre variação da sequência de aminoácidos, particularmente no gene do invólucro (Starcich, B.R. [1986] Cell 45: 637-648; Hahn, B.H. et al [1986] Science 232: 1548-1553). Cerca de 100 variantes foram analisados por clonagem molecular e análise de reconhecimento com enzimas de restrição e vários destes foram analisados por sequenciação de nucleotídeos. Alguns destes são os isolados HIV conhecidos: como RF (Popovic, M. et al [1981] Science 224: 497-500), WHJ-1 (Halm, B.H. et al [1986] Science 232: 1548-1553), LAV (Wain-Hobson, S. et al [1985] Cell 40: 9-17) e ARV-2 (Sanchez-Pescador, R. et al [1985] Science 227: 484-492). Os peptídeos de HIV para proteger contra infecções por diferentes isolados de HIV. Ainda, pode-se fazer uma preparação da vacina usando mais do que um fragmento de proteína do envólucro correspondendo o principal domínio de neutralização de mais do que um isolado de HIV para proporcionar imunidade e portanto conferir melhor protecção contra SIDA. Como alternativa, a preparação de vacina pode ser feita usando um único fragmento de proteína que compreende um arranjo em tandem dos princípios epitopos de neutralização de mais do que um isolado de HIV. Através da identificação do principal domínio de neutralização do HIV, esta região do polipeptídeo pode ser usada para formular reagentes importantes de vacinas, diagnósticos e terapêutico.

Os anticorpos contra os peptídeos recombinantes aqui descritos são úteis como reagentes terapêuticos e profiláticos. A geração de anticorpos policlonais ou monoclonais capazes de neutralizar uma variedade de variantes de HIV poderá ser usado para reduzir a incidência de infecção acidental e tratar pessoas infectadas com HIV que estão imunocomprometidas. Em adição, os regimes de imunização podem induzir soros policlonais capazes de neutralizarem várias variantes de HIV; A capacidade para neutralizar múltiplos variantes de HIV é designada de um modo geral como anticorpo neutralizante. Num sentido lato o anticorpo neutralizante pode neutralizar duas ou mais variantes ou todas as variantes de HIV.

Portanto, uma mistura de anticorpos neutralizantes larga que neutraliza diferentes grupos de variantes de HIV será útil no diagnóstico, profilaxia e terapia de SIDA.

É surpreendentemente e vantajoso que a imunização com peptídeos de cinco variantes de HIV dê origem a soros capazes de neutralizarem mais do que estas cinco variantes de HIV quando a imunização com dois não o consegue. O Exemplo 22 mostra que a imunização com cinco peptídeos induz soros neutralizantes com uma larga gama de actividade. Os soros neutralizantes com uma larga gama de actividade podem também ser obtidos se várias sequências da região hipervariável das diversas variantes de HIV forem apresentadas como um único peptídico sintético. Em adição, pode-se incluir estes soros neutralizantes com uma larga gama de actividade por re-imunização dos animais sensibilizados com RPL36 ou proteínas equivalentes com peptídeos contendo apenas os aminoácidos conservados dentro desta região hipervariável. Estes regimes de imunização seriam úteis para a vacinação e indução de anticorpos úteis como agentes terapêuticos.

A imunoglobulina polivalente para usar na imunização passiva pode ser preparada por imunização de cavalos ou juntando soro humano e fraccionando o componente com IgG do plasma ou do soro. Linhas celulares produtoras de anticorpo monoclonal humano ou de ratinho podem ser preparados por transformação convencional e tecnologia de hibridomas (Methods in Enzymology Vol. 121, Secções I e II [1986] e ds. J.J. Langose e H.V. Vunakis, Academic Press). O anticorpo monoclonal contra HIV pode ser preparado de acordo com os processos descritos por Matsushita et al. (Matsushita et al [1988] Journal of Virology 62(6): 2107-2114). Uma vez que a maior parte dos anticorpos monoclonais são produzidos em espécies que não a humana, eles são muitas vezes imunogénicos para os humanos. Para usar com êxito estes anticorpos monoclonais no tratamento de humanos, pode ser necessário criar uma molécula de anticorpo quimérico onde a fracção de polipeptídeo envolvida

na ligação do ligando (a região variável) deriva de uma espécie e a fracção envolvida na estabilidade estrutural e outras funções biológicas (a região constante) deriva de um anticorpo humano. Os métodos para a produção de anticorpos quiméricos em que o domínio variável deriva de um hospedeiro e o domínio constante deriva de um segundo hospedeiro, são bem conhecidos dos familiarizados com a matéria. Ver, por exemplo, Neuberger et al., Publicação WO Nº. 86/01533, prioridade 9/3/84; Morrison et al., Publicação EP Nº. 0 173 494, prioridades 8/27/84. Um método alternativo, em que um anticorpo é produzido substituindo as regiões determinantes da complementaridade (CDRs) de região variável com as CDRs de uma imunoglobulina da especificidade antigénica pretendida, foi descrito por Winter (Publicação GB Nº. 2.188 638, prioridade 3/27/86). Os monoclonais murinos podem ser tornados compatíveis com a utilização terapêutica através da produção de um anticorpo contendo uma fracção Fc humana (Morrison, S.L. [1989] Science 229: 1202-1207). Os processos estabelecidos permitiram a construção, expressão e purificação de tal anticorpo monoclonal híbrido. Os regimes de administração terapêutica de imunoglobulina foram anteriormente usados para uma série de doenças infecciosas.

Tal como aqui é usado o termo "anticorpo" pretende incluir anticorpos monoclonais ou policlonais, anticorpos completos ou fragmentos de anticorpos tendo a actividade imunológica do anticorpo completo. Também incluídos no termo "anticorpo", estão os anticorpos quiméricos tendo as regiões variáveis e as regiões constante de diferentes espécies hospedeiras ou aqueles em que apenas as CDRs são substituídas.

Para o tratamento da infecção por HIV, as composições compreendendo anticorpos podem ser administrados a um indivíduo ou animal necessitado de tratamento. Como alternativa, os antígenos de HIV aqui descritos podem ser administrados para estimular a resposta imune do próprio paciente. Quando do tratamento com um antígeno de HIV, pode

ser administrado um único antigénio ou, de preferência um antigénio ou mistura de antigénios de larga neutralização. Tais composições estão descritos detalhadamente nos exemplos que se seguem.

A capacidade para modificar peptídeos feitos por síntese orgânica pode ser vantajosa para o uso em diagnóstico, terapia e profilaxia ao melhorar a eficácia da imobilização, aumentar a estabilidade da proteína, aumentar a imunogenicidade, alterar a imunogenicidade, reduzir a toxicidade ou permitir a ocorrência simultânea de várias modificações. Por exemplo os peptídeos podem ser modificados para aumentar ou dominar a carga global por modificação dos grupos amina ou carboxilo (carbamilação) trifluoroacetilação ou succinilação de grupos amina; acetilação de grupos carbonilo). Os peptídeos podem ser tornados mais estáveis por exemplo através da inclusão de D-aminoácidos ou circularização do peptídeo. O estado de redução aos peptídeos pode ser alterado por exemplo através de sulfonação de grupos cistínico. Os peptídeos podem também ser modificados covalentemente ou não covalentemente com materiais não proteicos tais como lípidos ou açúcares para aumentar a imunogenicidade ou solubilidade. O polietilenoglicol pode ser usado para aumentar a solubilidade. O presente invento todas estas modificações químicas das proteínas e peptídeos aqui divulgados desde que a proteína e/ou peptídeos modificados retenham substancialmente todas as propriedades antigénicas/imunogénicas do composto parental.

Os peptídeos podem também ser modificados de modo a conter propriedades antigénicas de mais do que uma variante viral. Isto foi feito por exemplo com o vírus da febre aftosa.

O vírus da febre aftosa é semelhante ao HIV por existirem múltiplas variantes e a imunização com uma variante não conduzir à protecção contra outras variantes. A utilidade real dos peptídeos como imunogénios é demons-

trada ao reduzir imunidade contra mais do que uma variante por modificação, do peptídeo de modo a este possuir propriedades de ambas as variantes naturais. Quando tal variante modificada foi usada para imunizar os animais a testar, estes ficaram protegidos contra o vírus da febre aftosa estirpe A10 e A12 (Brown, F. em Vírus Vaccines, ed. G. Dreesman, J. Bronson, R. Kennedy, pág. 49-54 [1985]).

Os peptídeos ou proteínas de HIV contendo um epítipo PND podem também ser acoplados a uma partícula viral não relacionada ou nula incorporados, num vírus replicativo, ou outro microorganismo de modo a aumentar a imunogenicidade. O epítipo HIV pode ser genética ou quimicamente ligado à partícula viral ou microorganismo ou a uma fracção ou componente imunogénico. Os epítipos antigénios foram ligados a proteínas virais ou partículas virais para aumentar a resposta imune. Por exemplo a proteína VP6 da cápside de rotavírus foi usada como proteína veículo imunológico para um epítipo de interesse na forma monomérica ou como oligómeros de VP6 na forma de partículas (Publicação EP Nº. 0.259.149). De modo semelhante Evans et al. (1989, Nature 339:385) constituíram quimeras da proteína da cápside de poliovírus e um epítipo d gp41 de HIV para aumentar a imunogenicidade do epítipo de HIV. Determinantes antigénicos estranhos também foram expressos e apresentados por células bacterianas. Uma estirpe de Salmonella expressando um gene clonado da flagelina de Salmonella, no qual foi inserido um epítipo da toxina da cólera ou de antigénio de superfície da hepatite B, foi descrito como indutora de respostas celulares e humorais aos epítipos inseridos (Newton, et al. [1989] Science 244: 70-72; e Wu et al [1989] Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 4726-4730).

O Exemplo 18 mostra que um peptídeo contendo sequências de aminoácido das duas variantes de HIV pode bloquear a actividade de neutralização de anti-soros neutralizantes específicos dos dois vírus. Isto sugere que uma peptídeo ou proteína contendo sequências de dois ou mais va-

riantes de HIV pode induzir uma resposta imune eficaz contra duas ou mais variantes de HIV.

O Exemplo 19 mostra que a imunização com proteínas do envólucro de dois isolados de HIV induz uma resposta imune capaz de neutralizar dois isolados de HIV. Isto sugere que a co-imunização com proteínas de duas ou mais variantes de HIV pode induzir uma resposta imune eficaz contra duas ou mais variantes de HIV.

Seguem-se exemplos que ilustram o processo do invento, incluindo a melhor maneira de o realizar. Estes exemplos não devem ser pensados como limitantes. Todas as proporções dos solventes nas misturas são por volume excepto se de outro modo for dito.

EXEMPLO 1

Construção do plasmídeo pREV2.2

O vector da expressão plasmídeo pREV2.2 foi construído a partir do plasmídeo pBG1. O plasmídeo pBG1 pode ser isolado a partir do seu hospedeiro E. coli por métodos bem conhecidos, e.g., usando processos de clarificação dos lisados por gradientes de densidade isopícnicos e similares. Tal como pBG1, pREV2.2 expressa genes inseridos a seguir ao promotor de E. coli. As diferenças entre pBG1 e pREV2.2 são as seguintes:

1. pREV2.2 não possui uma proteína de replicação do plasmídeo (rop) funcional.

2. pREV2.2 tem o terminador de transcrição do trpA inserido no sítio AatII. Esta sequência assegura a terminação da transcrição de genes com um nível de expressão elevado.
3. pREV2.2 possui genes que conferem resistência à ampicilina e clorofenicol, enquanto que pBG1 proporciona resistência apenas à ampicilina.
4. pREV2.2 contém uma sequência codificadora de sítios para várias endonucleases de restrição.

Os processos que se seguem foram usados para fazer cada uma das quatro alterações atrás referidas:

- 1a. 5 µg do plasmídeo pBG1 foram cortados com NdeI, que dá dois fragmentos de aproximadamente 2160 e 3440 pares de bases.
- 1b. 0,1 µg de DNA da mistura de digestão, após inactivação da NdeI, foi tratado com DNA-ligase de T4 em condições que favorecem a ligação intramolecular (200 µl de volume de reacção usando condições normalizadas de reacção com DNA-ligase de T4 [New England Biolabs, Beverly, MA]). A ligação intramolecular do fragmento de 3440 pares de bases deu um plasmídeo resistente à ampicilina. A mistura de ligação foi usada para transformar a estirpe recipiente E. coli JM103 (adquirida à New England Biolabs) e os clones resistentes à ampicilina foram seleccionados por processos convencionais.
- 1c. O plasmídeo produto, pBG1 Δ N, em que foi eliminado o fragmento NdeI de 2160 pares de bases do pBG1, foi seleccionado preparando o plasmídeo a partir de clo-

nes resistentes à ampicilina e determinando os padrões de digestão com as enzimas de restrição NdeI e SalI (fragmentos produzidos de aproximadamente 1790 a 1650). Esta deleção inactiva o gene rop que controla a replicação do plasmídeo.

- 2a. 5 µg de pBG1 N foi então digerido com EcoRI e BclI e o fragmento maior de aproximadamente 2455 pares de bases foi isolado.
- 2b. Prepara-se um fragmento sintético de DNA de cadeia dupla segundo o processo de Itakura et al (Itakura, K., J. J. Rosit e R.B. Wallace [1984] Ann. Rev. Biochem. 53: 323-356 e referências nele inclusas) com a seguinte estrutura:

5' GATCAAGCTTCTGCAGTCGACGCAT

3' TTCGAAGACGTCAGCTGCGTACGCC

GCGGATCCGGTACCCGGGAGCTCG3'

TAGGCCATGGGCCCTCGAGCTTAA 5'

Este fragmento tem extremos coesivos BclI e EcoRI e contém sequências de reconhecimento para várias endonucleases de restrição.

- 2c. 0,1 µg do fragmento EcoRI-BclI de 2455 pares de bases e 0,01 µg do fragmento sintético foram ligados em DNA-ligase de T4 e foram transformadas células competentes da estirpe JM103. As células portadoras do plasmídeo recombinante, onde o fragmento sintético foi inserido em pBG1 Δ N entre os sítios BclI e EcoRI, foram seleccionados por digestão do plasmídeo com HpaI e EcoRI. Os fragmentos de diagnóstico são de aproximadamente 2355 e 200 pares de bases. Este plasmídeo é designado pREV1.

2d. 5 µg de pREV1 foram digeridos com AatII, o qual cliva num único sítio.

2e. Sintetizaram-se os seguintes fragmentos de cadeia dupla:

5' CGGTACCAGCCCGCCTAATG

3' TGCAGCCATGGTCGGGCGGA

AGCGGGCTTTTTTTTGACGT3'

TTACTCGCCCGAAAAAAAC 5'

Este fragmento tem extremos coesivos AatII e contém uma sequência de terminação de transcrição TrpA

2f. 0,1 µg de pREV1 digerido com AatII foi ligado com 0,01 µg do fragmento sintético num volume de 20 µl usando DNA-ligase de T4.

2g. Células da estirpe JM103, tornados competentes, foram transformadas e seleccionadas os clones resistentes à ampicilina

2h. Usando uma dupla digestão com as enzimas de restrição KpmI e EcoRI do plasmídeo isolado a partir de colónias seleccionadas, isolou-se uma célula contendo a construção correcta. Os tamanhos dos fragmentos KpmI e EcoRI gerados são de aproximadamente 2475 e 80 pares de bases. Este plasmídeo é designado pREV1TT e contém o terminador da transcrição TrpA.

3a. 5 µg de pREV1TT, preparado como descrito atrás (por meios convencionais) foram clivados com NdeI e XmnI e isolado o fragmento com aproximadamente 850 pares de bases.

- 3b. 5 µg do plasmídeo pBR325 (BRL, Gaithersburg, MD), o qual contem os genes que conferem resistências ao cloranfenicol assim como à ampicilina e à tetraciclina, foram clivados com BclI e os extremos tornados cerses com polimerase Klenow e desoxinucleotídeos. Após inativação da enzima, a mistura foi tratada com NdeI e isolado o fragmento com aproximadamente 3185 pares de bases. Este fragmento contem os genes da resistência ao clorofenicol e à ampicilina e a origem da replicação.
- 3c. 0,1 µg do fragmento NdeI-XmnI de pREVlTT e o fragmento NdeI do pBR325 foram ligados em 20 µl com DNA-ligase de T4 e a mistura usada para transformar células competentes da estirpe JML03. Seleccionaram-se células resistentes à ampicilina e ao clorofenicol.
- 3d. Usando duplas digestões com EcoRI e NdeI do plasmídeo de clones seleccionados, seleccionou-se um plasmídeo que deu fragmentos de tamanhos aproximados 2480, 1145 e 410 pares de bases. Este foi designado plasmídeo pREVlTT/chl e possui genes para resistência à ampicilina e ao cloranfenicol.

4a. Sintetizou-se o seguinte fragmento de cadeia dupla:

MluI EcoRI ClaI BamHI SalI HindIII SmaI

5' CGAACGCGTGGCCGATATCATCGATGG-

ATCCGTCGACAAGCTTCCCGGGAGCT 3'

3' GCTTGCGCACCGGCTATAGTAGCTAC-

CTAGGCAGCTGTTCTGAAGGGCCC 5'

Este fragmento, com um extremo cerne e um extremo coesivo SstI contém sequências de reconhecimento para vários sítios de enzimas de restrição.

- 4b. 5 µg de pREV1TT/chl foram clivados com NruI (a qual cliva a cerca de 20 nucleotídeos do sítio BclI) e SstI (a qual cliva dentro do sítio de clonagem múltiplo). O fragmento maior, aproximadamente 3990 pares de bases, foi isolado a partir de um gel de agarose.
- 4c. 0,1 µg do fragmento NruI-SstI do pREV1TT/chl e 0,01 µg do fragmento sintético foram tratados com DNA-ligase de T4 num volume de 20 ul.
- 4d. Esta mistura foi usada para transformar a estirpe JMI03 e foram seleccionados os clones resistentes à ampicilina.
- 4e. O plasmídeo já foi purificado a partir de vários clones e despistado por digestão com MluI ou ClaI. Os clones recombinantes com o novo sítio de clonagem múltipla darão um fragmento quando digeridos com qualquer uma destas enzimas, uma vez que cada uma delas cliva o plasmídeo apenas num sítio.
- 4f. A sequência do sítio de clonagem múltipla foi verificada. Isto foi feito cortando o plasmídeo com HpaI e PvuII e isolando o fragmento de 1395 pares de bases, clonando-o no sítio SmaI de mpl8 e sequenciando-o por sequenciação de dideoxinucleotídeos usando métodos convencionais.
- 4g. Este plasmídeo foi designado pREV2.2.

EXEMPLO 2

Construção do vector de expressão bacteriano pREV2.1

O plasmídeo pREV2.1 foi construído usando o plasmídeo pREV2.2 e um oligonucleotídeo sintético. O plasmídeo resultante foi usado para construir pPb1-Sub1 e pPb1-Sub2.

Segue-se um exemplo de como construir pREV2.1:

1. O plasmídeo pREV2.2 foi clivado com as enzimas de restrição NruI e BamHI e o fragmento de 4 kb foi isolado a partir de um gel de agarose.
2. Sintetizou-se o seguinte oligonucleotídeo de cadeia dupla:

```

5'      CGAACGCGTGGTCCGATATCATCGATG      3'
3'      GCTTGCGCACCAGGCTATAGTAGCTACCTAG  5'

```

3. Os fragmentos de 1 e 2 são ligados em 20 µl usando DNA-ligase de T4, usados para transformar células competentes de E. coli e isolados as colônias resistentes ao cloranfenicol.
4. Foram identificados clones de plasmídeos que contêm o oligonucleotídeo de 2 abrangendo a região do sítio NruI até ao sítio BamHI e recreando estes dois sítios de restrição. Este plasmídeo é designado pREV2.1.

EXEMPLO 3

Construção e expressão do plasmídeo pPB1-Sub1

O plasmídeo pPB1-Sub1, que contém aproximadamente 165 pares de bases (pb) de DNA codificando essencialmente o gene env de HIV desde o sítio PvuII até ao sítio DraI e a partir do qual é sintetizada uma proteína de fusão de aproximadamente 12 kd contendo esta fracção da proteína gpl20 do envólucro, pode ser constituído como se segue:

1. Corte do plasmídeo pPB1_{IIIB} com MluI e DraI e isolamento do fragmento de aproximadamente 165 pb.
2. Corte do plasmídeo pREV2.1 com MluI e SmaI e isolamento do fragmento grande, de aproximadamente 4 kd, a partir de um gel de agarose.
3. Ligação do fragmento preparado em 2. com o fragmento de pREV2.1 num volume de 20 µl usando DNA-ligase de T4, usando a mistura de ligação para transformar células competentes estirpe CAG629 e seleccionando transformantes resistentes à ampicilina.
4. Selecção de tais transformantes, através dos padrões de restrição, que possuem o fragmento de gpl20 clonado na orientação correcta para gerar uma proteína de fusão. Quando a estirpe portadora deste plasmídeo recombinante é cultivada em meio a 2% contendo 50 µg/ml de ampicilina e o complemento total de proteínas celulares é sujeito a electroforese num gel de SDS-poliacrilamida, uma proteína de aproximadamente 12 kd pode ser visualizada por coloração com azul Coomassie ou por análise de transferências Western usando como sonda soros seleccionados de individuos

infectados com HIV.

EXEMPLO 4

Purificação da proteína recombinante contendo sequências do envólucro de HIV presentes no plasmídeo pPB1-Sub1

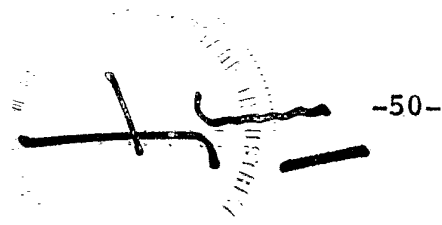
1. Crescimento das células: As células foram cultivadas num volume de 10 litros num fermentador Chemap (Chamopec, Woodburg, NY) em meio a 2% (2% de extracto de levedura, bacto-triptona, casaminoácidos [Difco, Detroit, MI], 0,2% de potássio monobásico, 0,2% de potássio dibásico e 0,2% de sódio dibásico). A temperatura de fermentação foi de 30°C, o pH foi de 6,8 e forneceu-se ar a 1 vvm. Fez-se a selecção do plasmídeo adicionando cloranfenicol e 20 µg/ml. A produção típica de células (peso molecular) foi de 30 g/l.
2. Lise celular: 50 g, peso molhado, de células de E. coli contendo a proteína de fusão recombinante do envólucro de HIV foram resuspenso num volume final de 100 ml em 50mM Tris-HCl pH 8,0, potássio-ácido etilenodiaminotetracético (KEDTA) 5mM, ditionitritol (DTT) 5mM, B-mercaptoetanol 15mM, 0,5% de TRITONTM X-100 (Pharmacia, Piscataway, NY) e fluoreto de fenilmetil-sulfonilo (PMSF) 5mM. A suspensão foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente.

Este material foi lisado usando um BEAD-BEATERTM (Biosfec Products, Barthesville, OK) contendo um volume igual de esferas de vidro de 0,1-

-0,15 mm. A lise foi feita durante 6 min à temperatura ambiente com intervalos de 1 min. O líquido foi separado das esferas e centrifugado durante 2,5 h a 20000 x g. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspense em 100 ml de ureia 8M, 20mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM DTT, β -mercaptoetanol 15mM, 5mM PMSF e 1mM KEDTA. O sedimento foi solubilizado usando um homogenizador Polytrons e centrifugado a 20000 x g durante 2 h.

Cromatografia CM: O dialisado foi aplicado numa coluna de 100 ml (2,5 cm x 20 cm) contendo CM FAST FLOW SEPHAROSETM (Pharmacia) equilibrada em ureia 8M, ácido 4-(2-hidroxietil-1-piperazina) etano-sulfônico (HEPES) 10mM, pH 6,5, β -mercaptoetanol 15mM, e 1mM KEDTA à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 200 ml de tampão de equilíbrio e a proteína eluída com um gradiente linear de 1,0 litro de 0-0,4M NaCl. A proteína de HIV (12kd) eluiu a aproximadamente 0,2M NaCl conforme detectado por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

Obteve-se posterior purificação reunindo frações contendo Sub-1 e aplicando-as numa coluna de filtração com gel S-200 (Pharmacia) equilibrada no mesmo tampão da coluna anterior.



EXEMPLO 5

Construção e expressão do plasmídeo pPB1-Sub2

O plasmídeo pPB-1 Sub2 que contém aproximadamente 320 pb de DNA codificando essencialmente o gene env de HIV desde o sítio PouII até ao sítio ScaI, e a partir do qual se sintetizou uma proteína de fusão de aproximadamente 18 kd contendo esta fracção da proteína do envólucro gp120, pode ser construído como se segue:

1. Corte do plasmídeo pPB1_{IIIB} com MluI e ScaI e isolamento do fragmento de aproximadamente 320 pb.
2. Corte do plasmídeo pREV2.1 com MLUI e SmaI e isolamento do fragmento grande de aproximadamente 4kd, a partir de um gel de agarose.
3. Ligação do fragmento preparado em 2. com o fragmento de pREV2.1 num volume de 20 µl usando DNA-ligase de T4, transformação da estirpe de células competentes SG20251 com a mistura de ligação e selecção dos transformantes resistentes à ampicilina.
4. Selecção de tais transformantes, através de padrões de restrição adequados, que tenham o fragmento de gp120 clonado na orientação correcta para gerar uma proteína de fusão. Quando a estirpe portadora deste plasmídeo recombinante é cultivada em meio a 2% contendo 50 µg/ml de ampicilina e o complemento total de proteínas celulares sujeito a electroforese num gel de SDS-poliacrilamida, uma proteína com aproximadamente 18kd pode ser visualizada por coloração com azul Coomassie ou por análise de transferências Western usando como sonda soro seleccionado de indi-

víduos infectados com HIV.

EXEMPLO 6

Purificação de proteína recombinante contendo sequências do envólucro de HIV do plasmídeo pPB1-Sub2.

1. Crescimento das células: As células foram cultivadas num volume de 10 litros num fermentador Chemap em meio a 2%. A temperatura de fermentação foi de 37°C, o pH foi de 6,8 e introduziu-se ar a 1 vvm. A selecção de plasmídeos foi conseguida com 20 µg/ml de clorofenicol. A produção celular típica (peso molhado) foi de 30 g/l.
2. Lise celular: 50 g, peso celular molhado, de E. coli contendo a proteína de fusão recombinante do envólucro de HIV foram resuspenso num volume final de 100 ml em 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM KEDTA, 5mM DTT, β-mercaptoetanol 15mM 0,5% TRITONTM X-100 e 5mM PMSF. A suspensão foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente.

Este material foi lisado usando um BEAD-BEATERTM contendo um volume igual de esferas de vidro de 0,1-0,15mm. A lise foi feita durante 6 min à temperatura ambiente em intervalos de 1 min. O líquido foi separado das esferas e centrifugado durante 2,5 h a 20000xg. O sobrenadante foi removido e o sedimento resuspenso em 100 ml de guanidina-hidrocloreto 6M, 20mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM DTT, β-mercaptoetanol 15mM, 5mM PMSF e 1mM KEDTA. O sedimento

foi solubilizado usando um homogenizador Polytron e centrifugado a 20000xg durante 2h.

O sobrenadante (90 ml) foi dialisado contra 4 litros de ureia 8M, formato de sódio 20mM, pH 4,0, 1mM EDTA, e β -mercaptoetanol 15mM. O tempo de duração de cada diálise foi de 8 h ou mais com três mudas de tampão. Usou-se o tubo de diálise Spectraphor (SLP, McGraw Park, IL) com um PM de exclusão de 3,5 kd.

3. Cromatografia CM: O dialisado foi aplicado numa coluna de 100 ml (2,5 cm x 20 cm) contendo CM FAST FLOW SEPHAROSETM (Pharmacia) equilibrada em ureia 8M, formato de sódio 20mM pH 4,0, β -mercaptoetanol 15mM e 1mM Na EDTA à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 200 ml de tampão de equilíbrio e a proteína eluída com um gradiente linear de 1,0 litro de 0-0,4 M NaCl. A proteína de HIV (18kd) eluiu a aproximadamente 0,2M NaCl conforme detectado por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

Posterior purificação foi conseguida reunindo fracções contendo Sub2 e aplicando-as numa coluna de filtração de gel S-200 (Pharmacia) equilibrada no mesmo tampão da coluna anterior.

EXEMPLO 7Peptídeos sintéticos

A síntese de peptídeos pode ser feita por uma variedade de processos estabelecidos, por exemplos, sínteses automatizadas de peptídeos. Os peptídeos foram montados por síntese em fase sólida em esferas de polistireno interligados começando no extremo carbonilo e adicionando aminoácidos passo por passo (Merrifield, R.B. [1963] S. Am. Chem. Soc. 85:2149). Cada síntese foi efectuada num sintetizador de peptídeos automático (Applied Biosystems 430-A) usando química t-BOC convencional. Os aminoácidos foram acoplados como anidridos simétricos altamente reactivos formados imediatamente antes de usar. Para minimizar as dificuldades de acoplamento usou-se dimetilformamida como agente de acoplamento. O ensaio quantitativo com ninidrina foi usado para medir a eficácia de acoplamento após adição de cada aminoácido (Sarin, V.K., S.B. H. Kent, J.P. Tam, R.B. Merrifield [1981] Anal. Biochem. 117: 147 (1981)):

Todos os peptídeos foram desprotegidos e clivados do suporte de polistireno usando uma clivagem HF alternativa. A resina contendo peptídeo foi ressuspensa numa mistura de ácido trifluoroacético, ácido trifluorometano-sulfónico e captadores de tiol orgânico (Tam, J.P., W.F. Heath, R.B. Merrifield [1986] J. Am. Chem. Soc. 108: 5242). O peptídeo solúvel foi purificado com éter etílico e após remoção do éter, ressuspensa em carbonato de sódio 200mM, guanidina-HCl 3M. Os peptídeos brutos foram purificados por cromatografia em fase reversa numa coluna semi-preparativa C₁₈ Vidac de 1,0 cm x 25 cm. Os tampões empregues foram; (A) 0,1% ácido trifluoroacético em H₂O e (B) 0,1% de ácido trifluoroacético em 80% acetonitrilo 20% H₂O. Utilizou-se a eluição com gradiente para eluir o peptídeo ligado e as fracções colhidas foram

analisadas para identificar o produto puro. A identidade dos peptídeos foi confirmada por análise de aminoácidos após hidrólise com HCl 6N. A síntese inclui a adição de aminoácidos terminais não homologos de HIV com fins de marcação, ligação cruzada de estruturas do peptídeo. Estes aminoácidos não HIV estão indicados entre parêntesis.

O produto de síntese pode ser ainda purificado por uma série de técnicas de separação, por exemplo, cromatografado de permuta iônica.

EXEMPLO 8

Construção e expressão do plasmídeo pPB1_{RF}

O plasmídeo pPB1_{RF} que contém aproximadamente 565 pb de DNA codificando essencialmente o gene env de HIV_{RI} desde o sítio PouII até ao sítio BglIII e a partir do qual foi sintetizado uma proteína de fusão de 27 kd contendo esta fracção da proteína do involucro de gp120 pode ser constituído como se segue:

1. Síntese do fragmento de DNA na Tabela 4A.
2. Corte do plasmídeo pREV2.2 com EcoRI e BamHI e isolamento do fragmento grande, aproximadamente 4 kd de um gel de agarose.
3. Ligação do fragmento preparado em 1. com o fragmento pREV2.2 num volume de 20 µl usando DNA-ligase de T4, transformação de células competentes da

estirpe CAG 629 com a mistura de ligação e selecção dos transformantes resistentes à ampicilina.

4. Selecção de tais transformantes, através de padrões de restrição adequados, que possuem o fragmento gp 120 clonado na orientação correcta para gerar uma proteína de fusão. Quando a estirpe portadora deste plasmídeo recombinante é cultivada a 32°C em meio a 2% contendo 50 µg/ml de ampicilina e o complemento total de proteínas celulares sujeito a electroforese num gel de SDS-poliacrilamida, pode-se observar uma proteína de aproximadamente 27kd por coloração com azul coomassie ou por análise de transferências western usando como sonda soros seleccionados de animais infectados com HIV.

EXEMPLO 9

Purificação de proteína recombinante contendo sequências do envólucro de HIV do plasmídeo pPB1_{RF}

1. Crescimento das células: As células foram cultivadas num volume de 10 litros num fermentador Chemap em meio a 2%. A temperatura de fermentação foi de 30°C, o pH foi de 6,8 e o ar for introduzido a 100 m. A selecção de plasmídeos foi conseguida com 20 µg/ml de clorofenicol. A produção celular típica molhada foi de 30 g/l.
2. Lise celular: 50 g, peso molhado de células, de E. coli contendo a proteína de fusão recombinante do invólucro de HIV foram ressuspensos num volume final

de 100 ml em 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM KEDTA, 5mM DTT, B-mercaptoetanol 15mM, 0,5% TRITONTM X-100 e 5mM PMSF. Adicionou-se 300 mg de lisozima e incubou-se a suspensão durante 30 min à temperatura ambiente.

Este material foi lisado usando um BEAD-BEATERTM contendo um volume igual de esferas de vidro de 0,1-0,15 mm. A lise foi feita durante 6 min à temperatura ambiente em intervalos de 1 min. O líquido foi separado das esferas e centrifugado durante 2,5 h a 20000xg. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 100 ml de ureia 8M, 20mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM DTT, B-mercaptoetanol 15mM 5mM PMSF e 1mM KEDTA, O sedimento foi solubilizado usando um homogenizador Polytron e centrifugado a 20000xg durante 2 h.

O sobrenadante (90 ml) foi dialisado contra 4 litros de ureia 8M, 20mM HEPES, pH 6,5 1mM EDTA e B-mercaptoetanol 15mM. De cada vez a diálise foi feita durante 8 h ou mais com três mudas de tampão. Usou-se tubo de diálise Spectrophor com um pm de exclusão de 3,5 kd.

3. Cromatografia CM: O dialisado foi aplicado numa coluna de 100 ml (2,5 cm x 20 cm) cheia com CM FAST FLOW SEPHAROSETM equilibrada em ureia 8M, 10mM HEPES pH 6,5, B-mercaptoetanol 15mM e 1mM NaEDTA à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 200 ml de tampão de equilíbrio e a proteína eluída com um gradiente linear de 1,0 litro de 0-0,4M NaCl. A proteína de HIV (26kd) eluiu a aproximadamente 0,2M NaCl conforme testado por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

Posterior purificação foi conseguida reunindo as fracções contendo PBl_{RF} e aplicando-os numa coluna de filtração com gel S-300 equilibrada no mesmo tampão da coluna anterior.

EXEMPLO 10

Construção e expressão do plasmídeo pPBl_{MN}

O plasmídeo pPBl_{MN} que contém aproximadamente 600 pb de DNA codificando essencialmente o gene eno de HIV_{MN} desde o sítio BglIII até ao sítio BglIII e a partir do qual se sintetizou uma proteína de fusão de aproximadamente 28kd contendo esta fracção da proteína do invólucro de gp120, pode ser construído como se segue:

1. Síntese do fragmento de DNA na Tabela 5A
2. Corte do plasmídeo pREV2.2 com BamHI
3. Ligação do fragmento preparado em 1 com o fragmento de pREV2.2 num volume de 20 µl usando DNA-ligase de T4, transformação de células competentes de estirpe CAG 629 com a mistura resultante e selecção dos transformantes resistentes à ampicilina.
4. Selecção de tais transformantes, através de padrões de restrição adequados, que possuem o fragmento de gp120 clonado na orientação correcta para gerar uma proteína de fusão. Quando a estirpe portadora deste plasmídeo recombinante é cultivada a 32°C em meio a

2% contendo 50 µg/ml de ampicilina e o complemento total de proteínas celulares sujeito a electroforese num gel de SDS-poliacrilamida, pode-se observar uma proteína de aproximadamente 28 kD por coloração com azul Coomassie ou por análise de transferência Western usando como soros seleccionados de indivíduos infectados com HIV.

EXEMPLO 11

Purificação de proteína recombinante contendo sequências do invólucro de HIV do plasmídeo pPE1_{MN}

1. Crescimento das células: Cultivaram-se células num volume de 10 litros num fermentador Chemap em 2% de meio. A temperatura de fermentação foi de 30°C, o pH foi de 6,8 e introduziu-se ar a 1 vvm. A selecção de plasmídeos foi feita com 20 µg/ml de cloranfenicol. A produção típica (peso molhado) de células foi de 30 g/l.

Lise celular: 50 g, peso molhado de células, de E. coli contendo a proteína de fusão recombinante do invólucro de HIV foram ressuspensos num volume final de 100 ml em 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM KEDTA, 5mM DTT, β-mercaptoetanol 15mM, 0,5% TRITONTM X-100 e 5mM PMSF. Adicionou-se 300 mg de lisozina e a suspensão foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente.

Este material foi lisado usando um BEAD-BEATERTM contendo um volume igual de esferas

de vidro de 0,1-0,15 mm. A lise foi feita durante 6 min à temperatura ambiente em intervalos de 1 min. O líquido foi separado das esferas e centrifugado durante 2,5h a 20000xg. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 100 ml de ureia 8M, 20mM Tris-Cl pH 8,0, 5mM DTT, β -mercaptoetanol 15 mM PMSF e 1mM KEDTA. O sedimento foi solubilizado usando um homogenizador Polytron e centrifugado a 20000xg durante 2 h.

O sobrenadante (90 ml) foi dialisado contra 4 litros de ureia 8M, 20mM HEPES, pH 6,5, 1mM EDTA e β -mercaptoetanol 15mM. De cada vez a diálise decorreu durante 8 h ou mais com três mudas de tampão. Usou-se tubo de diálise Sepectraphor com um PM de exclusão de 3,5 kd.

3. Cromatografia CM: O dialisado foi aplicado numa coluna de 100 ml (2,5 x 20 cm) cheia com CM FAST FLOW SEPHAROSETM e equilibrada em ureia 8M, 10mM HEPES pH 6,5, β -mercaptoetanol 15mM e 1mM KEDTA à temperatura. A coluna foi lavada com 200 ml de tampão de equilíbrio e a proteína eluída com um gradiente linear de 1,0 litro de 0-0,4M NaCl. A proteína de HIV (28 Kd) eluiu a aproximadamente 0,2M NaCl conforme testado por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

Conseguiu-se posterior purificação reunindo as fracções contendo PBl_{MN} e aplicando-as numa coluna de filtração com gel S-300 equilibrada no mesmo tampão da coluna anterior.

EXEMPLO 12

Construção e expressão do plasmídeo pPB1_{SC}

O plasmídeo pPB1_{SC} que contém aproximadamente 570 pb de DNA codificando essencialmente o gene env de HIV_{SC} desde o sítio PouII até ao sítio BglII, e a partir da qual é sintetizada uma proteína de fusão de aproximadamente 26kd contendo esta fracção da proteína do invólucro de gp120, pode ser construída como se segue:

1. Síntese de fragmento de DNA na Tabela 6A.
2. Corte do plasmídeo pREV2.2 com EcoRI e BamHI e isolamento do fragmento grande, aproximadamente 4kd, do gel de agarose.
3. Ligação do fragmento preparado em 1, com o fragmento do pREV2.2 num volume de 20 µl usando DNA-ligase de T4, transformação de células competente da estirpe CAG 629 com a mistura de ligação resultante e selecção dos transformantes resistentes à ampicilina.
4. Selecção de tais transformantes, através de padrões de restrição adequados, que possuem o fragmento de gp120 clonado na orientação correcta para dar origem a uma proteína de fusão. Quando a estirpe portadora deste plasmídeo recombinante é cultivada a 32°C em meio a 2% contendo 50 µg/ml de ampicilina e o complemento total de proteínas celulares sujeito a electroforese num gel de SDS-poliacrilamida, pode-se observar uma proteína de aproximadamente 26 kd por coloração com azul Comassie ou por análise de transferência Western usando como sonda soros seleccionados de in-

divíduos infectados com HIV.

EXEMPLO 13

Purificação de proteína recombinante contendo sequência do invólucro de HIV do plasmídeo pPB.

1. Crescimento das células: As células foram cultivadas num volume de 10 litros num fermentador Chemap em meio a 2%. A temperatura de fermentação foi de 30°C, o pH foi de 6,8 e introduziu-se ar a 1 vvm. A selecção de plasmídeos foi conseguida com 20 µg/ml de cloranfenicol. A produção celular típica (peso molhado) foi de 30 g/l.
2. Lise celular: 50 g, peso molhado de células, de E. coli contendo a proteína de fusão recombinante do envólucro de HIV foram ressuspensos num volume final de 100 ml em 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM KEDTA, 5mM DTT, β-mercaptoetanol 15mM, 0,5% TRITONTM X-100 e 5mM PMSF. Adiciona-se 300 mg de lisozina e incuba-se a suspensão durante 30 min à temperatura ambiente.

Este material foi lisado usando um BEAD-BEATER^{TN} contendo um volume igual de esferas de vidro de 0,1-0,15 mm. A lise foi feita durante 6 min à temperatura ambiente em intervalos de 1 min. O líquido foi separado das esferas e centrifugado durante 2,5 h a 20000xg. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em 100 ml de ureia 8M, 20mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM DTT, β-mercapto-

etanol 15mM, 5mM PMSF e 1mM KEDTA. O sedimento foi so lubilizado usando um homogenizador Polytron e centrifi fugado a 20000xg durante 2 horas.

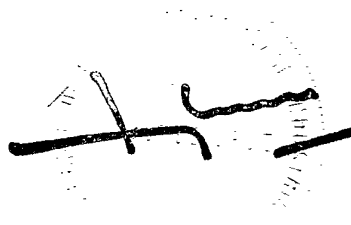
O sobrenadante (90 ml) foi dialisado contra 4 litros de ureia 8M, 20 mM AEPES, pH 6,5, 1mM EDTA e B-mercaptoetanol 155mM e 1mM KEDTA à temperatura ambiente. O dialisado foi aplicado numa coluna de 100 ml (2,5 cm x 20 cm) cheia com CM FAST FLOW SEPHAROSE TM equilibrado em ureia 8M, 10mM HEPES pH 6,5, B-mercaptoetanol e 1mM KEDTA à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 200 ml de tampão de equilíbrio e a proteína eluída com um gradiente linear de 1,0 litro de 0-0,4M NaCl. A proteína de HIV (26 kd) eluiu a aproximadamente 0,2M NaCl conforme testado por electroforese em gel de SDS-poliacrilamída.

Posterior purificação foi conseguida reunindo as fracções contendo PBl_{SC} e aplicando-as numa coluna de filtração com gel S-300 no mesmo tampão da coluna anterior.

EXEMPLO 14

Construção e expressão do plasmídeo pPBl_{WMJ2}

O plasmídeo pPBl_{WMJ2}, que contém aproximadamente 550 pb de DNA codificando essencialmente o gene env de HIV_{WMJ2} e a partir do qual se sintetizou uma proteína de fusão recombinante de aproximadamente 26 Kd contendo esta fracção da proteína do invólucro gp120, pode ser construí-



do como se segue:

1. Síntese do fragmento de DNA na Tabela 7A.
2. Corte do plasmídeo pREV2,2 com Eco RV e BamHI e isolamento do fragmento grande, aproximadamente 4kd, a partir de um gel de agarox.
3. Ligação do fragmento preparado em 1 com o fragmento pREV2.2 num volume de 20 ul usando DNA-ligase de T4, transformação de células competentes da estirpe CAG 629 com a mistura de ligação e selecção dos transformantes resistentes à ampicilina.
4. Selecção de tais transformantes, através dos padrões de restrição adequados, que possuam o fragmento de gp120 clonado na orientação correcta para gerar uma proteína de fusão. Quando a estirpe portadora deste plasmídeo recombinante é cultivada a 32°C em meio a 2% contendo 55ug/ml de ampicilina e o complemento total de proteínas celulares sujeito a electroforese num gel de SDS-poliacrilamida, uma proteína de aproximadamente 26Kd pode ser visualizada por coloração com azul coomassie ou por análise de transferências Western usando como sonda soros seleccionados de indivíduos infectados com HIV.

EXEMPLO 15

Purificação de proteína recombinante contendo sequências do
invólucro de HIV PLASMÍDEO pPB1WMJ2

1. Crescimento das células: As células foram cultivadas num volume de 10 litros num fermentador Chemap em meio a 2%. A temperatura de fermentação foi de 30°C, o pH de 6,8 e o ar foi introduzido a 1 vvm. A selecção de plasmídeos foi conseguida por 20 µg/ml de cloranfenicol. A produção típica de células (peso molhado) foi de 30 g/l.
2. Lise celular: 50 g, peso molhado de células, de E. Coli contendo a proteína de fusão recombinante do invólucro de HIV, foram ressuspensos num volume final de 100 ml em 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM KEDTA, 5mM DTT β-mercaptoetanol, 0,5% de TRITONTM X-100 e 5mM PMSF. Adicionou-se 300 mg de lisozima e a suspensão foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente.

Este material foi lisado usando um BEAD-BEATERTM contendo um volume igual de esferas de vidro de 0,1-0,15 mm. A lise foi feita durante 6 min à temperatura ambiente em intervalos de 1 min. O líquido foi separado das esferas e centrifugado durante 2,5 h a 20000xg. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 100 ml de ureia 8M, 20mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM DTT, β-mercaptoetanol 15mM e 5mM PMSF. Adicionou-se 300 mg de lisozima e a suspensão foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente.

Este material foi lisado usando um BEAD-BEATERTM contendo um volume igual de esferas de vidro de 0,1-0,15 mm. A lise foi feita durante 6 min à temperatura ambiente em intervalos de 1 min. O líquido foi separado das esferas e centrifugado durante 2,5 h a 20000xg. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em 100 ml de ureia 8M, 20mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM DTT, β-mercaptoetanol 15mM, 5mM PMSF e 1mM KEDTA. O sedimento foi solubilizado

usando um homogenizador Polytron e centrifugado a 20000xg durante 2 h.

O sobrenadante (90 ml) foi dialisado contra 4 litros de ureia 8M, 20mM HEPES, pH 6,5, 1mM EDTA e β -mercaptoetanol 15mM. A diálise foi feita durante 8 h ou mais com três mudas de tampão, Usou-se tubo de diálise Spectraphor com um PM de exclusão de 3,5 kd.

3. Cromatografia CM: O dialisado foi aplicado numa coluna de 100 ml (2,5 cm x 20 cm) cheia com CM FAST FLOW SEPHAROSETM equilibrada em ureia 8M, 10mM HEPES pH 6,5, β -mercaptoetanol 15mM e 1mM Na EDTA à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 200 ml de tampão de equilíbrio e a proteína eluída com um gradiente linear de 1,0 litro de 0-0,4M NaCl. A proteína de HIV (26 kd) eluiu a aproximadamente 0,2M NaCl conforme testado por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

Conseguiu-se posterior purificação reunindo as fracções contendo PBl_{WMJ2} e aplicando-se numa coluna de filtração de gel S-300 equilibrada ao mesmo tampão da coluna anterior.

EXEMPLO 16

Inibição da fusão celular

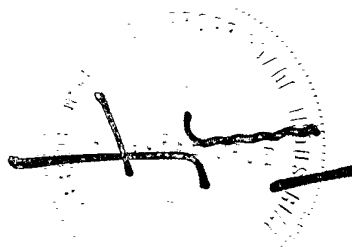
A fusão in vitro de células infectadas com HIV com células T positivas para T4 foi medida na presença e ausência de soro imune. Este é um ensaio bem conhecido (Putney et al [1986] Science 234: 1392-1395).

Células cronicamente infectada a células não infectadas (1:15) foram misturadas e incubadas durante 24 h. Contaram-se os focos de células fundidas (células gigantes) (geralmente cerca de 60). Quando as células foram misturadas adicionou-se uma diluição de um soro imune, por exemplo soro contra todo o invólucro de HIV (gp 160) ou contra uma proteína ou peptídeo do invento. Um decréscimo de 90% nas células gigantes após 24 h indica que o soro imune pode bloquear a fusão. Este ensaio pode ser feito com células infectadas com várias estirpes de vírus, por exemplo, HIV_B e HIV_{RF}.

EXEMPLO 17

Fusão de células com competição

Usando o ensaio descrito no Exemplo 16, pode-se determinar se as proteínas ou peptídeos contêm um epítopo reconhecido pelos anticorpos que são responsáveis pela inibição da fusão celular. Por exemplo, a inibição da fusão de células infectadas com HIV_{IIIB} pelo anti-soro contra a



proteína PBl-III_B do pedido anterior é descrito pela adição da proteína PBl-III_B a 50 µg/ml. Usando anti-soro contra PBl-III_B e adicionado qualquer uma das proteínas ou peptídeos, por exemplo, Sub 2, Sub 1, CNBR1, peptídeo 135 ou peptídeo 136 a 5 µg/ml bloqueia totalmente a actividade do anti-soro contra PBl. Em adição, o anti-soro contra PBl-RF que é capaz de neutralizar HIV-RF pode ser bloqueado nesta actividade pelo peptídeo 139. Um peptídeo contendo apenas a fracção central do peptídeo 139, e.g. peptídeo 339, pode também bloquear a actividade de inibição da fusão do anti-soro contra PBl-RF. Isto, pela primeira vez, localiza os aminoácidos críticos necessários para induzir neutralização ou bloquear o anticorpo inibidor da fusão contra uma sequência de dez aminoácidos (e.g. peptídeo 339).

EXEMPLO 18

Co-imunização de PBl-III_B e PBl_{RF}

O anti-soro de um animal imunizado com duas proteínas PBl dos isolados HIV_{III_B} e HIV_{RF} foi capaz de bloquear a fusão celular de células infectadas com HIV_{III_B} e HIV_{RF}. Isto demonstra que a co-imunização com proteínas separadas contendo sequências do invólucro de dois isolados de HIV induz uma resposta imune capaz de neutralizar ambos os isolados. Esta nova propriedade das proteínas pequenas ou peptídeos bloqueadores de soro imune não foi anteriormente descrita.

Algumas das proteínas e peptídeos do presente invento contêm todo o epítipo para a indução de

resposta imune humoral que neutraliza a infecção por HIV e bloqueia a fusão de células infectadas por HIV. Isto é mostrado por estas proteínas e peptídeos que competem com estas actividades do soro de animais imunizados com todo o envólucro de HIV. Mais especificamente, as proteínas e peptídeos que podem competir com as actividades de soros anti-gp160 ou anti-PB1 são Sub2, Sub 1, CNBr1, peptídeo 135 e peptídeo 136.

As proteínas e peptídeos do invento podem também ser usados para estimular uma resposta proliferativa de linfócitos em humanos infectados com hiv. Isto estimularia então o sistema imune para responder ao HIV em tais indivíduos.

EXEMPLO 19

Construção e expressão do plasmídeo pPB1_{IIIB}

O plasmídeo pPB1 que contem aproximadamente 540 pb de DNA codificado essencialmente o gene env de HIV desde o sítio PouII até ao sítio BglII e a partir do qual foi sintetizado uma proteína de fusão de aproximadamente 26 kd contendo esta fracção da proteína do invólucro gp120 pode ser construído como se segue:

1. Síntese do DNA com a sequência mostrada na Tabela 8: Estes fragmentos de DNA pode ser sintetizado por métodos convencionais e codifica uma fracção de gp 120. Possui um extremo cerse no extremo 5' e um extremo que se ligará a uma extremidade BamHI no extremo 3'.

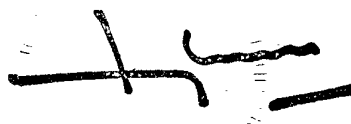
2. Corte de 5 µg do plasmídeo pREV2.2 com EcoRI e BamHI e isolamento do fragmento grande, aproximadamente 4kd, de um gel de agarose.
3. Ligação de 0,1 µg do fragmento na tabela 8 com 0,1µg do fragmento de pREV2.2 num volume de 20 µl usando DNA-ligase de T4, transformação de células competentes da estirpe SG20251 com a mistura de ligação e selecção dos transformantes resistentes à ampicilina.
4. Usando o padrão de restrição AhaIII do plasmídeo purificado, selecção de células portadoras do plasmídeo recombinante com o fragmento sintetizado na orientação em que o extremo cerse do fragmento ligado ao extremo EcoRV de REV2.2 e os extremos pertuberantes BamHI se ligam uns aos outros. A digestão com AhaIII do plasmídeo correcto dá fragmentos com comprimento de aproximadamente 1210, 1020, 750, 690, 500, 340 e 20 pares de bases. Quando a estirpe portadora deste plasmídeo recombinante é cultivado em meio a 2% contendo 50 µg/ml de ampicilina e o complemento total de proteínas celulares é sujeito a electroforese num gel de SDS-poliacrilamida, pode-se observar uma proteína de aproximadamente 26 kd por coloração com azul Coomassie ou por análise de transferências Western usando como sonda soros seleccionados de individuos infectados com AIDS, ARC ou HIV.

EXEMPLO 20

Purificação de proteína recombinante contendo sequências do
invólucro de HIV do plasmídeo pPBL_{IIIB}

1. Crescimento das células: As células foram cultivadas num volume de 10 litros num fermentador Chemap em meio a 2%. A temperatura de fermentação foi de 37°C, o pH foi de 6,8 e o ar foi introduzido a 1vvm. A selecção do plasmídeo foi conseguida com 50 µg/ml de ampicilina e 20 µg/ml de cloranfenicol. A produção celular típica (peso molhado) foi de 30 g/l.
2. Lise celular: 50 g, peso molhado de células; E. coli contendo a proteína de fusão recombinante do envólucro de HIV, foram ressuspensos num volume final de 100 ml em 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM KEDTA, 5mM DTT, β-mercaptoetanol 15mM, 0,5% de TRITONTM x-100 e 5mM PMSF. Adicionaram-se 300 mg de lisozima e a suspensão foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente.

Este material foi lisado usando um BEAD-BEATERTM (Biospec Products, Barthesville, DK) contendo um volume igual de esferas de vidro de 0,1-0,15 mm. A lise foi feita durante 6 min à temperatura ambiente em intervalos de 1 min. O líquido foi separado das esferas e centrifugado durante 2,5 h a 20000xg. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 100 ml de guanidina-hidrocloreto 6M, 20mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM DTT; β-mercaptoetanol 15mM, 5mM PMSF e 1mM KEDTA. O sedimento foi solubilizado usando um homogenizador "Polytron" e centrifugado a 20000xg durante 2 h.



O sobrenadante (90 ml) foi dialisado contra 4 litros de ureia 8M, 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA e β -mercaptoetanol 15mM. A diálise foi feita durante 8 h ou mais com três mudas de tampão. Usou-se tubo de diálise Spectraphor (S/P; McGrow Park, I L) com um PM de exclusão de 3,5 kd.

3. Cromatografia CM: O dialisado foi aplicado numa coluna de 550 ml (5 cm x 28 cm) cheia com CM FAST FLOW SEPHAROSETM equilibrada em ureia 8M, fosfato de potássio 10mM pH 7,0, β -mercaptoetanol 15mM e 1mM KEDTA à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 2 litro de tampão de equilíbrio e a proteína eluída com um gradiente linear de 5,0 litros de 0-0,4 M NaCl. A proteína de HIV (26 kd) eluiu a aproximadamente 0,2 M NaCl conforme testado por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

EXEMPLO 21

Imunização com dois ou mais peptídeos para se obter anti-soros com uma larga gama de neutralização

Cinco peptídeos, i.e., peptídeos 135, peptídeo 139, peptídeo 141, peptídeo 142 e peptídeo 143, foram individualmente ligados a proteínas veículo e usadas para imunizar cabras. Cada peptídeo é capaz de induzir neutralização específica de tipo quando usado individualmente como imunogénio. Os peptídeos sintéticos foram ligados através de uma ligação sulfidrilo a hemiziamina de lapa (KLH) usando succinimidil-4-(n-maleimidometil)ciclo-hexano 1-carboxilato (Pier-

ce). A proporção de peptídeo para KLH foi de 1:2 por peso. 200 µg de cada peptídeo ligado foi usado na mistura de imunização (um total de 1 mg de 5 peptídeos, 2 mg de KLH). Este método de ligação ou de imunização é apenas um exemplo e não pretende ser limitativo. Após quatro imunizações, o soro imune foi testado quanto à neutralização destes cinco isolados de HIV assim com o de outros isolados diferentes. O soro imune bloqueou a fusão de células infectadas com qualquer um dos cinco isolados de onde derivaram as sequências peptídicas. Em adição, o soro neutralizou outras variantes não usadas na imunização.

Soros neutralizados com actividade igualmente larga podem ser obtidos por variações deste imunogénio. Por exemplo, usando mais do que cinco peptídeos tendo a sequência de aminoácidos derivada do principal domínio de neutralização de mais de cinco variantes. Como alternativa, pode também ser usado um único peptídeo (e.g. peptídeo 64 ou peptídeo 74) contendo segmentos homólogos de diversas variantes de HIV pode ser também usado para induzir um anticorpo neutralizante com uma larga gama de actividade.

EXEMPLO 22

Imunização sequenciada com dois peptídeos como método de indução de soros neutralizantes com uma gama larga de actividade

Um protocolo de imunização capaz de induzir anticorpos neutralizantes com uma gama larga de actividade podem tomar a forma de imunização inicial com um peptídeo ou proteína antigénicamente equivalente ao principal do-

mínio de neutralização ou seus segmentos. A imunização inicial é seguida de uma segunda imunização. A imunização inicial pode ser feita por exemplo com o peptídeo 135, peptídeo 139, peptídeo 141, peptídeo 142 ou peptídeo 143, com subsequente imunização por exemplo com um ou mais dos seguintes peptídeos:

O método é imunizar com uma proteína ou "peptídeo e depois fazer o impulsionamento da resposta imune contra uma sub-série definida do imunogénio original. Este método de imunização pode ser útil na metodologia de vacinas e também na obtenção de anticorpos policlonais ou monoclonais neutralizantes com uma larga gama de actividade com fins terapêuticos.

EXEMPLO 23

Identificação de segmentos críticos do principal domínio de neutralização

Certos segmentos do principal domínio de neutralização são capazes de induzir as respostas antigénicas e imunogénicas que estão associadas do principal domínio de neutralização como um todo. Por exemplo, uma região do principal domínio de neutralização conhecida como a "ponta da ansa" mostrou-se capaz de induzir e/ou ligar-se a anticorpos neutralizantes. Esta capacidade é observada para o "pico da ansa" de uma variedade de variantes de HIV. A ponta da ansa compreende um segmento de três aminoácidos que é altamente conservado entre as variantes de HIV, juntamente com vários aminoácidos que ocorrem de ambos os lados dos três aminoácidos conservados. Os três aminoácidos conservados os quais são Gli, Pro, Gli, geralmente ocorrem aproximadamente nas posições 311, 312 e 313 da proteína do envólucro de HIV.

A "ponta da ansa" compreende o segmento Gli Pro Gli juntamente com os 2 a 8 aminoácidos que delimitam um ou ambos os lados deste segmento em qualquer variante de HIV. Os aminoácidos que delimitam o segmento conservado podem ser quaisquer dos 20 aminoácidos naturais em qualquer ordem. Se bem que a sequência de aminoácidos do principal domínio de neutralização varie entre diferentes isolados de HIV-1, a conservação em posições particulares, por exemplo na ponta da ansa, sugere que certos aminoácidos nestas posições são necessários às funções do vírus.

EXEMPLO 24

Sequência do principal domínio de neutralização (PNDs) de isolados de HIV-1 seleccionados ao acaso

Obtiveram-se sequências dos principais domínios de neutralização (PNDs) de isolados de campo ao acaso de modo a determinar o grau de heterogeneidade dentro desta região da proteína do invólucro. Linfócitos do sangue periférico (PBLs) de doadores infectados com HIV-1 seleccionados ao acaso foram cocultivados com PBLs de doadores infectados ou os vários isolados virais foram adoptados a linhas celulares CD4. Extraíu-se DNA destas células infectadas e uma região de 240 pares de bases codificadora do PND foi amplificado por reacção de cadeias com polimerase usando iniciadores oligonucleotídicos que hibridam com regiões conservadas usando iniciadores oligonucleotídicos que hibridam com regiões conservadas delimitantes. Este produto foi clonado em pUC19 e a sequência do PND de um ou mais clones de cada isolado original forma determinadas. Devido à heterogeneidade da população viral dentro de um indivíduo infectado quando duas ou mais sequências foram obtidas a partir de uma reacção PCR, estas sequências por vezes diferirem.

Os resultados obtidos a partir de aproximadamente 100 indivíduos (alguns infectados com uma população heterogénea de vírus) foram avaliadas juntamente com a informação da sequência de HIV anteriormente obtida. A Tabela 9 mostra 138 sequências PND de isolados de HIV. Estas sequências indicam que, apesar da conhecida e frequentemente citada variabilidade da sequência de aminoácidos da proteína do invólucro de HIV, existe de facto um elevado grau de conservação na região PND imunologicamente crítica, particularmente na região do centro do PND. Especificamente, a sequência GLI-Pro-Gli na "ponta da ansa" ocorre em cerca de 90% dos variantes. Ainda, outros aminoácidos em certas posições de cada um dos lados de G-P-G são também altamente conservados. A tabela 10 mostra a frequência de ocorrência dos vários aminoácidos em cada posição no PND. Além da conservação muito forte das glicinas delimitadas da prolina central, existe forte conservação em várias outras posições (e.g., R em X_{12} , P em X_{11} ,



G em Y_{11} , R em Y_{14} e A em Y_{16}).

Na Tabela 11 está apresentada uma comparação da frequência relativa de variações de um segmento de 17 aminoácidos centrados à volta da sequência G-P-G. Nesta tabela, a sequência que reflete os aminoácidos que ocorrem mais frequentemente em cada posição está apresentada em primeiro lugar. Os traços indicam identidade com a sequência consensus. As restantes sequências estão ordenadas de 2 a 138, de acordo com a sua homologia relativamente à sequência consensus. Assim, as sequências no topo da tabela apresentam maior homologia com a sequência consensus. As sequências para o fundo da tabela apresentam menos homologia. Por exemplo, as sequências de aminoácidos dos isolados III_B e LAV-BRU ocorrem nas posições 92 e 93, respectivamente, nesta tabela. Isto indica que estes isolados têm apenas homologia limitada com a sequência consensus. A presente investigação mostra que os vírus HIV tais como IIIB e LAV-BRU tendo o dipeptídeo Gln-Arg (Q-R) à esquerda da sequência Gli-Pro-Gli são relativamente invulgares. Ao contrário, a sequência tipo MN nesta região (... I H I G P G ...) é a mais comum. A presente investigação mostra que os principais domínios de neutralização de outras variantes normalmente estudadas compreendem sequências relativamente invulgares.

Se bem que o presente invento inclua descoberta de certas regiões altamente conservadas no principal domínio de neutralização, existe algum grau de variabilidade nesta região entre os vários isolados. Esta variabilidade inclui amino-ácidos que "faltam" ou que "estão a mais" em certos pontos na sequência. Certamente os aminoácidos que "faltam" ou que "estão a mais" podem causar dificuldade na elaboração das tabelas que mostram as sequências. No entanto, estes aminoácidos que "faltam" ou "estão a mais" colocam dificuldades em termos de localização de regiões altamente conservadas que são críticas para o presente invento. A Tabela 9 mostra uma representação das 138 sequências PND. A Tabela 11

usa uma representação ligeiramente diferente para mostrar as mesmas sequências PND. A discussão da conservação da sequência pode provavelmente ser melhor visualizar por referência à representação mostrada na Tabela 11. No entanto, deve-se notar que a existência de mais do que um meio de representar estas sequências não comprometem a capacidade dos familiarizados com a matéria em localizarem as sequências ou as regiões conservadas.

Com a descoberta de sequências de aminoácidos que ocorrem com maior frequência, é possível, pela primeira vez desenvolver composições profiláticas ou terapêuticas que possam induzir e/ou ligar-se a anticorpos neutralizantes contra uma larga gama de variantes de HIV. A fórmula generalizada para tal composição pode ser como se segue:

$$axGzGyb$$

onde x é 0 a 13 aminoácidos de comprimento;

y é 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e

z é P, A, S, Q ou L; e

a ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; a ou b individualmente pode compreender qualquer um dos seguintes; cisteínas, uma proteína ou outra fracção capaz de aumentar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal, um peptídeo capaz de estimular células T ou um estimulante da resposta imune em geral.

Posterior análise dos padrões de sequências comuns revela certos padrões específicos que são muito comuns entre isolados de HIV. Na tabela 12 e Figura 1 estão apresentados exemplos destas sequências comuns. Estes padrões comuns, que são conhecidos apenas como resultado de

pesquisa e descobertas aqui descritas, podem ser usadas para fazer composições farmacêuticas e de diagnóstico que podem ser usados com uma larga gama de isolados do HIV. Isto, certamente pode ser de importância crítica, dado o largo número de variantes de HIV de que agora se conhece a existência.

A Tabela 12 é uma compilação dos padrões de sequências comuns que ocorrem na região do topo da ansa. Por exemplo, aproximadamente 60% dos isolados de HIV contêm a sequência central IaIGPGR (a representa vários resíduos diferentes), aproximadamente 50% contêm a sequência IGPGR e aproximadamente 40% contem GPGRF. Quando um resíduo His está presente na posição a em IaIGPGR, esta sequência ocorre em aproximadamente 30% dos isolados de HIV. Uma composição de vacina compreendendo uma mistura de peptídeos tendo a sequência IaIGPGR em que todos as possíveis substituições de a estão presentes, é capaz de induzir anticorpos que neutralizam uma grande parte de variantes de HIV. De preferência, para usar como imunogénios, os peptídeos são ligados a proteínas veículo ou adjuvantes como descrito no Exemplo 21.

Como se mostra na Figura 1, os padrões de sequências mais comuns são também aparentes dentro do segmento de 17 aminoácidos. As sequências que foram isoladas 4 ou mais vezes estão em evidência. Estas sequências que ocorrem mais frequentemente podem ser usados para formular vacinas que induzem uma resposta neutralizante alargada. Por exemplo, uma mistura potencial deverá conter peptídeos de cada um dos oito grupos representados. Como alternativas, as sequências peptídicas podem estar presentes como um polipeptídeo híbrido contendo o principal domínio de neutralização de dois ou mais destes grupos. De preferência, tal mistura conterá peptídeos que serão capazes de induzir anticorpos que neutralizam pelo menos 70% e ainda mais preferido 90% das variantes de HIV.

Os antígenos do presente invento podem ser identificados pela sua capacidade para induzir anti-

corpos que se ligam a certas sequências de aminoácidos. Por exemplo, compostos antigénicos particularmente vantajosos induzirão anticorpos que se ligam a sequências comuns de aminoácidos tais como G-P-G-R-A-F, I-G-P-G-R-A-F, I-G-P-G-R-A, I-a-I-G-P-G-R, I-a-I-G-P-G-R-A e I-a-IGP-G-R-A-F, onde a é qualquer um de 20 aminoácidos.

De Tabela 10 pode-se ver que um polipeptídeo representando a ocorrência de aminoácidos em todas as variantes pode ser representado como se segue:

$x_{13}x_{12}x_{11}x_{10}x_9x_8x_7x_6x_5x_4x_3x_2x_1GzGy_2y_3y_4y_5y_6y_7y_8y_9y_{10}y_{11}y_{12}$
 $y_{13}y_{14}y_{15}y_{16}y_{17}$, em que

x_1 é I, R, M, IQR, V, L, K, F, S, G, Y, SRG, ou YQR;

x_2 é H, R, Y, T, S, P, F, N, A, K, G, ou V;

x_3 é I, L, M, T, V, E, G, F, ou Y;

x_4 é R, S, G, H, A, K, ou não presente;

x_5 é K, R, I, N, Q, A, IR, RQ, ou não presente;

x_6 é R, K, S, I, P, Q, E, G, ou T;

x_7 é T, K, V, I, A, R, P, ou E;

x_8 é N, NV, Y, KI, I, T, DK, H, ou K;

x_9 é N, S, K, E, Y, D, I ou Q;

x_{10} é N, Y, S, D, G, ou H;

x_{11} é P;

x_{12} é R, I, ou K;

x_{13} T, I, M ou A;

z é P, A, Q, S, ou L;

y_1 é R, K, Q, G, S, ou T;

y_2 é A, V, N, R, K, T, S, F, P, ou W;

- Y₃ é F, I, V, L, W, Y, G, S, ou T;
Y₄ é Y, V, H, L, F, S, I, T, M, R, VH, ou FT;
Y₅ é T, A, V, Q, H, I, S, Y, ou não presente;
Y₆ é T, R, I, Q, A, M, ou não presente;
Y₇ é G, E, K, R, T, D, Q, A, H, N, P, ou não presente;
Y₈ é R, Q, E, K, D, N, A, G, S, I, ou não presente;
Y₉ é I, V, R, N, G, ou não presente;
Y₁₀ I, T, V, K, M, R, L, S, E, Q, A, ou não presente;
Y₁₁ é G, R, E, K, H, ou não presente;
Y₁₂ é D, N, I, R, T, S, ou não presente;
Y₁₃ é I, M, ME, L, ou não presente;
Y₁₄ é R, G, K, S, E, ou não presente;
Y₁₅ é Q, K, ou R;
Y₁₆ é A; e
Y₁₇ é H, Y, R, ou Q.

Anticorpos monoclonais e/ou policlonais com larga actividade de neutralização podem ser gerados usando as sequências polipeptídicas que mais frequentemente ocorrem para usar em composições profilácticas ou terapêuticas. As sequências que mais frequentemente ocorrem aqui descritas podem ser usadas como os outros peptídeos descritos neste pedido. Por exemplo, estes peptídeos podem ser modificados para proporcionarem estimulação de linfócitos T, estimulação imune em geral, para aumentar a imunogenicidade ou solubilidade ou para reduzir a toxicidade. Os peptídeos podem também ser modificados através da adição de resíduos de cisteína adicional(ais) ou por conjugação a uma proteína veículo adjuvante espaçador e/ou ligante. Os peptídeos podem ser fundidos com outros epítomos de HIV para produzir um polipeptídeo de multi-epítomos que poderá ser útil com um número mesmo ainda maior

de variantes de HIV. Também, os peptídeos podem ser circularizados por ligação entre os resíduos de cisteína. Os resíduos de cisteína usados para fazer tais peptídeos circularizados poderão ser os resíduos cisteína naturais nos extremos do principal domínio de neutralização, ou os resíduos cisteína podem ser adicionados aos extremos terminais aos peptídeos.

Em adição as composições de vacinas podem incluir peptídeos contendo epítomos de células T auxiliares ("helper") em combinação com fragmentos proteicos contendo o principal domínio de neutralização. Vários destes epítomos foram mapeados dentro do envólucro de HIV e encontrou-se que estas regiões estimulam a proliferação e libertação de linfoquinas pelos linfócitos. A colocação de ambos os epítomos numa vacina pode resultar na estimulação das respostas imunes humoral e celular.

EXEMPLO 25

Construção e clonagem de genes de múltiplos epítomos

Pode-se construir genes sintéticos que codificam proteínas compreendendo os epítomos neutralizantes de mais de um isolado de HIV. O gene sintético aqui exemplificado compreende um arranjo em tandem de sequências de DNA codificadores de epítomos neutralizantes de isolados de HIV IIIB, RF, SC, MN e WMJ1. Cada domínio codificador de epítomos dentro do gene foi projectado para codificar os 11 aminoácidos centradas na sequência comum Gli-Pro-Gli na ponta da ansa para cada um dos isolados. Assim, o gene de múltiplos epítomos continha 5 regiões codificadoras diferentes, cada uma das quais

codificando um epítopo de neutralização de um isolado diferente. Para esta construção particular, o epítopo que foi escolhido para cada um dos 5 isolados consistiu na sequência Gli-Pro-Gli juntamente com os 4 aminoácidos de cada um dos laços da sequência Gli-Pro-Gli de cada um dos 5 isolados. Neste gene de múltiplos epítopos poderão ser incluídos domínios codificadores de outros epítopos de neutralização destes isolados. Também podem ser usados genes codificadores de epítopos de neutralização de outros isolados.

Construíram-se genes de tal modo que os domínios foram ligados por sequências de DNA codificadoras de resíduos de glicina. A composição ou comprimento da sequência de ligação pode variar mas de preferência é uma sequência que ela própria não é imunogénica. A sequência de DNA do gene sintético aqui descrito foi projectada de tal modo que tais sítios de restrição foram codificados em ambos os extremos do fragmento para facilitar a clonagem no vector ou, como alternativa, para permitir a construção de gene de múltiplos epítopos mais longos por ligação de 2 ou mais genes mais curtos (Figura 2). Em adição, um resíduo de metionina foi codificado no extremo 5' do gene para facilitar a clivagem quando produzido como parte de uma proteína de fusão.

A Figura 3, descreve os passos na construção do gene de múltiplos epítopos aqui descrito. A sequência de aminoácidos codificada por este gene está apresentada na Tabela 13. As fracções desta sequência de aminoácidos que correspondem a cada um dos 5 isolados estão identificados na Tabela 13.

Primeiro construíram-se subfragmentos de cadeia dupla de todo o gene começando com oligómeros sintéticos de cadeia simples destinados a codificar epítopos de neutralização em tendem e ligando as sequências de aminoácidos. Pode ser usado qualquer número de subfragmentos, Nesta experiência o gene foi dividido em duas fracções, mas podem ser

usados três, quatro ou mais fracções. Sintetizaram-se quatro oligómeros de cadeia simples entre 67 e 68 nucleotídeos de comprimento (HEO-1, HEO-2, HEO-3 e HEO-4) (Figura 3). Os oligómeros foram projectados aos pares (HEO-1 e 2; HEO-3 e 4) como cadeias opostas e adjacentes dos subfragmentos de cadeia dupla tendo 10 (HEO-1 + 2) ou (HEO-3 + 4) bases de sobreposição complementar. Os oligómeros de cada par foram misturados e aquecidos a 65°C durante 5 minutos, depois incubados a 37°C durante 1 hora para emparelhar.

Após emparelhamento, as cadeias complementares de cada par foram completadas ("preenchidas") usando Sequenase (U.S. Biochem) e os quatro trifosfatos de desoxinucleotídeos. Esta reacção foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente, aquecida a 65°C durante 3 minutos e depois incubado durante mais uma hora a 37°C com Sequenase fresca. Os fragmentos de cadeia dupla de 141 (HEO-1+2) e 126 (HEO-3+4) pares de bases foram gerados representados subfragmentos adjacentes do gene de múltiplos epítomos. HEO-1+2 compreende as sequências codificadores de 3 epítomos mais aminoácidos adaptadores adjacentes; HEO-3+4 estende-se desde o quarto epítomo até ao fim do gene.

Após a reacção de preenchimento, as amostras foram extraídas com fenol/clorofórmio e precipitadas com etanol por processos convencionais. Os DNAs de cadeia dupla resultantes foram digeridos com HindIII (HEO-1+2) ou SacI(HEO-3+4) e purificado num gel de 3% de agarose NuSieve. Os fragmentos purificados foram ligados com pUC10 digerido com HindIII + SacI (New England Biolabs) numa ligação de 3 componentes e usados para transformar células E.coli. JM105. A presença de um fragmento de 256 pares de bases em pUC19 codificando o gene de múltiplos epítomos completo, foi confirmado por análise de restrição e sequenciação de DNA. O plasmídeo resultante foi designado PUC/MEP-1.

A inserção MEP-1 foi removida de PUC/MEP-1 e reclonada em pREv2.1 digerido com HindIII + SacI para um elevado nível de expressão de uma proteína de fusão constituída por uma fracção condutora do gene BG de E.coli fundida com a proteína de múltiplos epítomos. O plasmídeo resultante, designado pMEP-1-8342, foi usado para transformar E.coli estirpe SG20251 e a proteína de fracção de múltiplos epítomos de 12,9kd foi identificada por coloração com azul coomassie ou análise de transferências Western usando uma sonda seleccionada de anti-soros contra peptideos da ponta da ansa de cada um dos 5 isolados de HIV. A proteína de fusão pode ser usada intacta ou, como alternativa, a fracção condutora pode ser clivada com brometo de cianogénio que cliva no lado cabonilo de resíduos de metionina. A sequência de aminoácidos da proteína de fusão está apresentada na Tabela 13A.

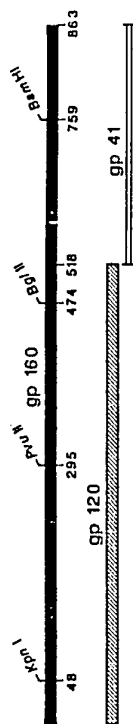
O peptídeo de múltiplos epítomos pode ser purificado a partir de células recombinantes por métodos descritos atrás.

Podem ser construídos outros genes sintéticos que codificam epítomos de neutralização em tandem de qualquer número de diferentes isolados de HIV usando o processo descrito atrás. Em adição podem ser feitas variações ao processo descrito as quais estão incluídas no presente invento. Por exemplo, podem variar e pode haver variação no comprimento de epítomos individuais dentro de um único gene. Ainda, o número de epítomos de neutralização dentro de um gene de múltiplos epítomos pode variar e a composição ou o comprimento das sequências de aminoácidos dos apítomos ou as sequências de ligação podem variar relativamente ao exemplo que aqui foi descrito.

Deve-se entender que os exemplos e realização aqui descritos têm apenas fins ilustrativos na matéria e que várias modificações ou alterações poderão ser sugeridas pelos entendidos na matéria e devem ser incluídos no

espírito deste pedido de patente e no âmbito das reivindicações apenas.

Este trabalho foi suportado em parte pelo contrato número N01-AI-62558 concedida à Repligen Corporation pelo National Institute of Allergy and Infections Disease (NIAID).



III _B (BH10)	III _B (BH10)
RF	RF
MN	MN
SC	SC
WMJ-2	WMJ-2
LAV-MAL	LAV-MAL
SF-2	SF-2
NY5	NY5
Z3	Z3
WMJ1	WMJ1
WMJ3	WMJ3
Z6	Z6
LAVELI	LAVELI
CDC451	CDC451
CDC42	CDC42
BAL	BAL
HIV-2	HIV-2

TABELA 1

TABELA 2

LeuAsnGlnSerValGluIleAsnCysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLys
SerIleArgIleGlnArgGlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIle
GlyAsnMetArgGlnAlaHisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAsnThr

TABELA 2A

CTGAACCAATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCCAACAACAATACAAGAAAA
AGTATCCGTATCCAGAGAGGACCGAGGAGGCATTTGTTACAATAGGAAAAATA
GGAAATATGAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAATGGAATAACACTTT

TABELA 2B

MetLeuArgProValGluThrProThrArgGluIleLysLysLeuAspGlyLeu
TrpAlaPheSerLeuAspArgGluArgValAlaAspLeuAsnGlnSerValGlu
IleAsnCysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLysSerIleArgIleGlnArg
GlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGlyAsnMetArgGlnAla
HisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAsnThrLeuGlyAlaArgIleLeu
GluAspGluArgAlaSer

TABELA 2C

ATGTTACGTCTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAATCAAAAACTGGACGGCCTG
TGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAACGCGTGGCCGATCTGAACCAATCTGTAGAA
ATTAATTGTACAAGACCCCAACAACAATACAAGAAAAAGTATCCGTATCCAGAGA
GGACCAGGGAGAGCATTTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATGAGACAAGCA
CATTGTAACATTAGTAGAGCAAATGGAATAACACTTTGGGAGCTCGAATTCTT
GAAGACGAAAGGGCCTCG

TABELA 3

LeuAsnGlnSerValGluIleAsnCysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLys
SerIleArgIleGlnArgGlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIle
GlyAsnMetArgGlnAlaHisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAsnThr
LeuLysGlnIleAspSerLysLeuArgGluGlnPheGlyAsnAsnLysThrIle
IlePheLysGlnSerSerGlyGlyAspProGluIleValThrHisSerPheAsn
CysGlyGlyGluPhePheTyrCysAsnSerThrGlnLeuPheAsnSer

TABELA 3A

CTGAACCAATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAA
AGTATCCGTATCCAGAGAGGACCAGGGAGAGCATTGTGTTACAATAGGAAAAATA
GGAAATATGAGACAAGCACATTGTAACTTAGTAGAGCAAAATGGAATAACACT
TTAAACAGATAGATAGCAAATTAAGAGAACAATTTGGAAATAATAAAACAATA
ATCTTTAAGCAGTCCTCAGGAGGGGACCCAGAAATTGTAAACGCACAGTTTTAAT
TGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGTAATTCAACACAACACTGTTTAATAGT

TABELA 3B

MetLeuArgProValGluThrProThrArgGluIleLysLysLeuAspGlyLeu
 TrpAlaPheSerLeuAspArgGluArgValAlaAspLeuAsnGlnSerValGlu
 IleAsnCysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLysSerIleArgIleGlnArg
 GlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGlyAsnMetArgGlnAla
 HisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAsnThrLeuLysGlnIleAspSer
 LysLeuArgGluGlnPheGlyAsnAsnLysThrIleIlePheLysGlnSerSer
 GlyGlyAspProGluIleValThrHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhePhe
 TyrCysAsnSerThrGlnLeuPheAsnSerGlySerSerAsnSer

TABELA 3C

ATGTTACGTCTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTGGACGGCCTG
 TGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAACGCGTGGCCGATCTGAACCAATCTGTAGAA
 ATTAATTGTACAAGACCCCAACAACAATACAAGAAAAAGTATCCGTATCCAGAGA
 GGACCAGGGAGAGCATTGTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATGAGACAAGCA
 CATTGTACACTTACTAGAGCAAAATGGAATAACACTTTAAACAGATAGATAGC
 AAATTAAGAGAACAAATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTTTAAGCAGTCCTCA
 GGAGGGGACCCAGAAATTGTAACGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTTC
 TACTGTAATTCAACACAACCTGTTTAATAGTGGGAGCTCGAATTCT

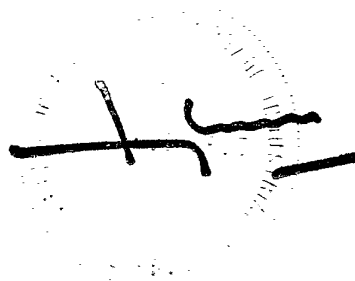


TABELA 4

LeuAsnAlaSerValGlnIleAsnCysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLys
 SerIleThrLysGlyProGlyArgValIleTyrAlaThrGlyGlnIleIleGly
 AspIleArgLysAlaHisCysAsnLeuSerArgAlaGlnTrpAsnAsnThrLeu
 LysGlnValValThrLysLeuArgGluGlnPheAspAsnLysThrIleValPhe
 ThrSerSerSerGlyGlyAspProGluIleValLeuHisSerPheAsnCysGly
 GlyGluPhePheTyrCysAsnThrThrGlnLeuPheAsnSerThrTrpAsnSer
 ThrGluGlySerAsnAsnThrGlyGlyAsnAspThrIleThrLeuProCysArg
 IleLysGlnIleValAsnMetTrpGlnGluValGlyLysAlaMetTyrAlaPro
 ProIleSerGlyGlnIleLysCysIleSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThr
 ArgAspGlyGlyGluAspThrThrAsnThrThr

TABELA 4A

CTGAATGCATCTGTACAAATTAATTGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAA
 GACTTACGTAGACATGTTTAATTAACATGTTCTGGGTTGTTGTTATGTTCTTTT
 AGTATACTAAGGGACCGGGAGAGTAATTTATGCAACAGGACAAATAATAGGA
 TCAATATTGATTCCCTGGTCCCTCTCATTAAATACGTTGTCTCTGTTTATTATCCT
 GATATAAGAAAAGCACATTGTAACCTTAGTAGAGCACAATGGAATAACACTTTA
 CTATATTTCTTTTCTGTGAACATTGGAATCATCTCGTGTACCTTATTGTGAAT
 AAACAGGTAGTTACAAAATTAAGAGAACAAATTTGACAATAAAACAATAGTCTTT
 TTTGTCCATCAATGTTTTAATTCTCTTGTGTTAACTGTTATTTTGTATCAGAAA
 ACCTCATCCTCAGGAGGGGACCCAGAAATTGTACTTCACAGTTTTAATTGTGGA
 TGCAGTAGGAGTCTCCCTGGGCTTTAACATGAAGTGTCAAAATTAACACCT
 GGGGAATTTTTCTACTGTAATACAACACAACACTGTTTAATAGTACTTGGGAATAGT
 CCCCTTAAAAAGATGACATTATGTTGTGTTGACAAATTATCATGAACCTTATCA
 ACTGAAGGGTCAAATAACACTGGAGGAAATGACACAATCACACTCCCATGCAGA
 TGACTTCCAGTTTATTGTGACCTCCTTTACTGTGTTAGTGTGAGGGTACGTCT
 ATAAACAAATTGTAAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCT
 TATTTTGTTTAACATTTGTACACCGTCTTCATCCTTTTCGTTACATACGGGGA
 CCCATCAGTGGACAAATTAATGTATATCAAATATTACAGGGCTACTATTAACA
 GGGTAGTCACCTGTTTAATTTACATATAGTTTATAATGTCCCGATGATAATTGT
 AGAGATGGGGGTGAAGATACAACATAACTACTACAGA
 TCTCTACCCCACTTCTATGTTGATTATGATGTCTCTAG

TABELA 4B

MetLeuArgProValGluThrProThrArgGluIleLysLysLeuAspGlyLeu
TrpAlaPheSerLeuAspArgGluArgValAlaAspLeuAsnAlaSerValGln
IleAsnCysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLysSerIleThrLysGlyPro
GlyArgValIleTyrAlaThrGlyGlnIleIleGlyAspIleArgLysAlaHis
CysAsnLeuSerArgAlaGlnTrpAsnAsnThrLeuLysGlnValValThrLys
LeuArgGluGlnPheAspAsnLysThrIleValPheThrSerSerSerGlyGly
AspProGluIleValLeuHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhePheTyrCys
AsnThrThrGlnLeuPheAsnSerThrTrpAsnSerThrGluGlySerAsnAsn
ThrGlyGlyAsnAspThrIleThrLeuProCysArgIleLysGlnIleValAsn
MetTrpGlnGluValGlyLysAlaMetTyrAlaProProIleSerGlyGlnIle
LysCysIleSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyGluAsp
ThrThrAsnThrThrGluIleArgArgGlnAlaSerArgGluLeuGluPheLeu
LysThrLysGlyProArgAspThrProIlePheIleGly

TABELA 4C

ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTGGACGGCCTG
TGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAACGCGTGGCCGATCTGAATGCATCTGTACAA
ATTAATTGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAAGTATAACTAAGGGACCA
GGGAGAGTAATTTATGCAACAGGACAAATAATAGGAGATATAAGAAAAGCACAT
TGTAACCTTAGTAGAGCACAATGGAATAACACTTTTAAACAGGTAGTTACAAAA
TTAAGAGAACAATTTGACAATAAAACAATAGTCTTTACGTCATCCTCAGGAGGG
GACCCAGAAATTGTACTTCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGT
AATACAACACAACCTGTTTAAATAGTACTTGGAATAGTACTGAAGGGTCAAATAAC
ACTGGAGGAAATGACACAATCACACTCCCATGCAGAATAAAACAAATTGTAAAC
ATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCTCCCATCAGTGGACAAATT
AAATGTATATCAAATATTACAGGGCTACTATTAACAAGAGATGGGGGTGAAGAT
ACAACTAATACTACAGAGATCCGTCGACAAGCTTCCCGGGAGCTGGAATTCTTG
AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACTCCTATTTTTATAGGT

TABELA 5

GluAsnPheThrAspAsnAlaLysThrIleIleValHisLeuAsnGlu
SerValGlnIleAsnCysThrArgProAsnTyrAsnLysArgLysArgIleHis
IleGlyProGlyArgAlaPheTyrThrThrLysAsnIleIleGlyThrIleArg
GlnAlaHisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAspThrLeuArgGlnIle
ValSerLysLeuLysGluGlnPheLysAsnLysThrIleValPheAsnGlnSer
SerGlyGlyAspProGluIleValMetHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhe
PheTyrCysAsnThrSerProLeuPheAsnSerThrCysLysIleLysGlnIle
IleAsnMetTrpGlnGluValGlyLysAlaMetTyrAlaProProIleGluGly
GlnIleArgCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGly
LysAspThrAspThrAsnAspThr

TABELA 5A

GATCTGAAAATTTACAGACAATGCTAAAACCATATAGTACACCTGAATGAA
ACTTTTAAAGTGCTGTTACGATTTTGGTATTATCATGTGGACTTACTT
TCTGTACAAATTAATTGTACAAGACCCAACTACAATAAAAGAAAAAGGATACAT
AGACATGTTTAAATTAACATGTTCTGGGTTGATGTTATTTTCTTTTCTATGTA
ATAGGACACAGGGAGAGCATTATATACAACAAAAATATAATAGGAACTATAAGA
TATCCTGGTCCCTCTCGTAAATATGTTGTTTTTATATTATCCTTGATATTCT
CAAGCACATTGTAACTTAGTAGAGCAAAATGGAATGACACTTTAAGACAGATA
GTTCTGTAACTATTGTAATCATCTCGTTTTACCTTACTGTGAAATTCTGTCTAT
GTTAGCAAATTAAGAAACAATTTAAGAAATAAACAATAGTCTTTAATCAATCC
CAATCGTTTAAATTTCTTGTAAATTCTTATTTTGTATCAGAAATTAGTTAGG
TCAGGAGGGGACCCAGAAATGTAAATGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTT
AGTCTCTCCCTGGGTCTTTAATATTACGTGTCAAAATTAACACCTCCCTTAA
TTCTACTGTAAATACATCACCCTGTTTAAATAGTACTTGCAAAATAAAACAATT
AAGATGACATTATGTAGTGGTGACAAATTATCATGAACGTTTTATTTTGTTHA
ATAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAGCAATGTATGCCCTCCCATTTGAAGGA
TATTTGTACACCGTCCCTTCATCTTTTCTGTTACATACGGGGAGGGTAACCTCT
CAATTAGATGTTTCATCAAATATTACAGGGCTACTATTAACAAGAGATGGTGGT
GTTTAACTACAAGTAGTTTATAATGTCCCGATGATAATTGTTCTCTACCACCA
AAGGACACGGACACGAACGACACCGA
TTCCTGTGCTGTGCTTGTGTGGCTCTAG

TABELA 5B

MetLeuArgProValGluThrProThrArgGluIleLysLysLeuAspGlyLeu
 TrpAlaPheSerLeuAspArgGluArgValAlaAspIleIleAspGlySerGlu
 AsnPheThrAspAsnAlaLysThrIleIleValHisLeuAsnGluSerValGln
 IleAsnCysThrArgProAsnTyrAsnLysArgLysArgIleHisIleGlyPro
 GlyArgAlaPheTyrThrThrLysAsnIleIleGlyThrIleArgGlnAlaHis
 CysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAspThrLeuArgGlnIleValSerLys
 LeuLysGluGlnPheLysAsnLysThrIleValPheAsnGlnSerSerGlyGly
 AspProGluIleValMetHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhePheTyrCys
 AsnThrSerProLeuPheAsnSerThrCysLysIleLysGlnIleIleAsnMet
 TrpGlnGluValGlyLysAlaMetTyrAlaProProIleGluGlyGlnIleArg
 CysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyLysAspThr
 AspThrAsnAspThrGluIleArgArgGlnAlaSerArgGluLeuGluPheLeu
 LysThrLysGlyProArgAspThrProIlePheIleGly

TABELA 5C

ATGTTACGTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTGGACGGCCTG
TGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAACGCGTGGCCGATATCATCGATGGATCTGAA
AATTTACAGACAATGCTAAAACDATAATAGTACACCTGAATGAATCTGTACAA
ATTAATTGTACAAGACCCCACTACAATAAAAGAAAAAGGATACATATAGGACCA
GGGAGAGCATT TTTATACAACAAAAATATAATAGGAACTATAAGACAAGCACAT
TGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAATGACACTTTAAGACAGATAGTTAGCAA
TTAAAAGAACAAATTTAAGAATAAAACAATAGTCTTTAATCAATCCTCAGGAGGG
GACCCAGAAATTGTAATGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGT
AATACATCACCCTGTTTAATAGTACTTGCAAAATAAAACAAATTATAAACATG
TGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCTCCCATTTGAAGGACAAATTAGA
TGTTTCATCAAATATTACAGGGCTACTATTAACAAGAGATGGTGGTAAGGACACG
GACACGAACGACACCGAGATCCGTGACAAGCTTCCCGGGAGCTGGAATTCTTG
AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACTCCTATTTTTATAGGT

TABELA 6

LeuLysGluAlaValGluIleAsnCysThrArgProAsnAsnAsnThrThrArg
SerIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyrAlaThrGlyAspIleIleGly
AspIleArgGlnAlaHisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAsnThrLeu
LysGlnIleValIleLysLeuArgAspGlnPheGluAsnLysThrIleIlePhe
AsnArgSerSerGlyGlyAspProGluIleValMetHisSerPheAsnCysGly
GlyGluPhePheTyrCysAsnSerThrGlnLeuPheSerSerThrTrpAsnGly
ThrGluGlySerAsnAsnThrGlyGlyAsnAspThrIleThrLeuProCysArg
IleLysGluIleIleAsnMetTrpGlnGluValGlyLysAlaMetTyrAlaPro
ProIleLysGlyGlnValLysCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThr
ArgAspGlyGlyAsnSerLysAsnGlySerLysAsnThr

TABELA 6A

CTGAAAGAGCTGTAGAAATTAATTGTACAAGGCCCAACAACAATACAACAAGA
GACTTTCTTCGACATCTTTAATTAACATGTTCCGGGTTGTTGTTATGTTGTTCT
AGTATACATATAGGACCAGGGAGAGCATTATGCAACAGGAGACATAATAGGA
TCATATGTATATCCTGGTCCCTCTCGTAAATACGTTGTCCTCTGTATTATCCT
GATATAAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAAATAACACTTTA
CTATATTCTGTTGTTGTAACATTGTAATCATCTCGTTTTACCTTATTGTGAAT
AAACAGATAGTTATAAAATTAAGAGACCAATTTGAGAATAAAACAATAATCTTT
TTTGTCTATCAATATTTTAATTCTCTGGTTAAACTCTTATTTTGTATTAGAAA
AATCGATCCTCAGGAGGAGACCCAGAAATTGTAATGCACAGTTTTAATTGTGGA
TTAGCTAGGAGTCCTCCTCTGGGTCTTTAACATTACGTGTCAAATTAACACCT
GGGGAATTTTTCTACTGTAATTCAACACAACCTGTTTAGTAGTACTTGGAAATGGT
CCCCTTAAAAAGATGACATTAAGTTGTGTTGACAAATCATCATGAACCTTACCA
ACTGAAGGGTCAAATAACACTGGAGGAAATGACACAATCACCTCCCATGCAGA
TGACTTCCAGTTTATTGTGACCTCCTTTACTGTGTTAGTGGGAGGGTACGTCT
ATAAAGAAATTATAAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCTT
TATTTCTTTAATATTTGTACACCGTCCTTCATCCTTTTCGTTACATACGGGGA
CCCATCAAAGGACAAGTTAAATGTTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAAACA
GGGTAGTTTCTGTTCAATTTACAAGTAGTTTATAATGTCCCGACGATAATTGT
AGAGATGGTGGTAATAGCAAGAATGGTAGCAAGAATACAGA
TCTCTACCACCATTTATCGTTCTTACCATCGTTCTTATGTCTCTAG

TABELA 6B

MetLeuArgProValGluThrProThrArgGluIleLysLysLeuAspGlyLeu
 TrpAlaPheSerLeuAspArgGluArgValAlaAspLeuLysGluAlaValGlu
 IleAsnCysThrArgProAsnAsnAsnThrThrArgSerIleHisIleGlyPro
 GlyArgAlaPheTyrAlaThrGlyAspIleIleGlyAspIleArgGlnAlaHis
 CysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAsnThrLeuLysGlnIleValIleLys
 LeuArgAspGlnPheGluAsnLysThrIleIlePheAsnArgSerSerGlyGly
 AspProGluIleValMetHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhePheTyrCys
 AsnSerThrGlnLeuPheSerSerThrTrpAsnGlyThrGluGlySerAsnAsn
 ThrGlyGlyAsnAspThrIleThrLeuProCysArgIleLysGluIleIleAsn
 MetTrpGlnGluValGlyLysAlaMetTyrAlaProProIleLysGlyGlnVal
 LysCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyAsnSer
 LysAsnGlySerLysAsnThrGluIleArgArgGlnAlaSerArgGluLeuGlu
 PheLeuLysThrLysGlyProArgAspThrProIlePheIleGly

TABELA 6C

ATGTTACGTCTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTGGACGGCCTG
TGGGCATTCAGTCTGGATCGCGAACGCGTGGCCGATCTGAAAGAAGCTGTAGAA
ATTAATTGTACAAGGCCCAACAACAATACAACAAGAAGTATACATATAGGACCA
GGGAGAGCATTTTATGCAACAGGAGACATAATAGGAGATATAAGACAAGCACAT
TGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAATAACACTTTAAACAGATAGTTATAAAA
TTAAGAGACCAATTTGAGAATAAAACAATAATCTTTAATCGATCCTCAGGAGGA
GACCCAGAAATTGTAATGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGT
AATTCAACACAACCTGTTTAGTAGTACTTGGAATGGTACTGAAGGGTCAAATAAC
ACTGGAGGAAATGACACAATCACCTCCCATGCAGAATAAAGAAATTATAAAC
ATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCTCCCATCAAAGGACAAGTT
AAATGTTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAGC
AAGAATGGTAGCAAGAATACAGAGATCCGTGACAAGCTTCCCGGGAGCTGGAA
TTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACTCCTATTTTTATAGET

TABELA 7

LeuAsnGluSerValGluIleAsnCysThrArgProTyrAsnAsnValArgArg
 SerLeuSerIleGlyProGlyArgAlaPheArgThrArgGluIleIleGlyIle
 IleArgGlnAlaHisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAsnThrLeuLys
 GlnIleValGluLysLeuArgGluGlnPheLysAsnLysThrIleValPheAsn
 HisSerSerGlyGlyAspProGluIleValThrHisSerPheAsnCysGlyGly
 GluPhePheTyrCysAsnSerThrGlnLeuPheAsnSerThrTrpAsnGlyThr
 AspIleLysGlyAspAsnLysAsnSerThrLeuIleThrLeuProCysArgIle
 LysGlnIleIleAsnMetTrpGlnGlyValGlyLysAlaMetTyrAlaProPro
 IleGlnGlyGlnIleArgCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArg
 AspGlyGlyAsnSerSerSerArgGlu

TABELA 7A

CTGAATGAATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCCTACAACAATGTAAGAAGA
 GACTTACTTAGACATCTTTAATTAACATGTTCTGGGATGTTGTTACATTCTTCT
 AGTCTATCTATAGGACCAGGGAGAGCATTTCGTACAAGAGAAATAATAGGAATT
 TCAGATAGATATCCTGGTCCCTCTCGTAAAGCATGTTCTCTTTATTATCCTTAA
 ATAAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAATAACACTTTAAAA
 TATTCTGTTCTGTAAACATTGTAATCATCTCGTTTACCTTATTGTGAATTTT
 CAGATAGTTGAGAAATTAAGAGAACAAATTTAAGAAATAAAACAATAGTCTTTAAT
 GTCTATCAACTCTTTAATTCTCTTGTTAAATTCTTATTTTGTATCAGAAATTA
 CATTCTCAGGAGGGGACCCAGAAATTGTAACGCACAGTTTTAATTGTGGAGGG
 GTAAGGAGTCCTCCCTGGGTCTTTAACATTGCGTGTCAAATTAACACCTCCC
 GAATTTTTCTACTGTAATTCAACACAACCTGTTTAATAGTACTTGGAATGGTACT
 CTTAAAAAGATGACATTAAGTTGTGTTGACAAATTATCATGAACCTTACCATGA
 GACATTAAAGGAGATAATAAAATAGCACACTCATCACACTCCCATGCAGAATA
 CTGTAATTTCTCTATTATTTTTATCGTGTGAGTAGTGTGAGGGTACGTCTTAT
 AAACAAATTATAAACATGTGGCAGGGAGTAGGCCAAAGCAATGTATGCCCTCCC
 TTTGTTTAAATTTGTACACCGTCCCTCATCCGTTTCTGTTACATACGGGGAGGG
 ATCCAAGGACAAATTAGATGTTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGA
 TAGGTTCTCTGTTTAAATCTACAAGTAGTTTATAATGTCCCGACGATAATTGTTCT
 GATGGTGGTAATAGCAGCAGCAGGGGAAGA
 CTACCACCATTAATCGTCGTGTCGTCCTTCTCTAG

TABELA 7B

MetLeuArgProValGluThrProThrArgGluIleLysLysLeuAspGlyLeu
 TrpAlaPheSerLeuAspArgGluArgValAlaAspLeuAsnGluSerValGlu
 IleAsnCysThrArgProTyrAsnAsnValArgArgSerLeuSerIleGlyPro
 GlyArgAlaPheArgThrArgGluIleIleGlyIleIleArgGlnAlaHisCys
 AsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAsnThrLeuLysGlnIleValGluLysLeu
 ArgGluGlnPheLysAsnLysThrIleValPheAsnHisSerSerGlyGlyAsp
 ProGluIleValThrHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhePheTyrCysAsn
 SerThrGlnLeuPheAsnSerThrTrpAsnGlyThrAspIleLysGlyAspAsn
 LysAsnSerThrLeuIleThrLeuProCysArgIleLysGlnIleIleAsnMet
 TrpGlnGlyValGlyLysAlaMetTyrAlaProProIleGlnGlyGlnIleArg
 CysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyAsnSerSer
 SerArgGluGluIleArgArgGlnAlaSerArgGluLeuGluPheLeuLysThr
 LysGlyProArgAspThrProIlePheIleGly

TABELA 7C

ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTGGACGGCCTG
TGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAACGCGTGCGCGATCTGAATGAATCTGTAGAA
ATTAATTGTACAAGACCCTACAACAATGTAGAAGAAGTCTATCTATAGGACCA
GGGAGAGCATTTCGTACAAGAGAAATAATAGGAATTATAAGACAAGCACATTGT
AACATTAGTAGAGCAAAATGGAATAACACTTTAAACAGATAGTTGAGAAATTA
AGAGAACAAATTTAAGAATAAAACAATAGTCTTTAATCATTCCCTCAGGAGGGGAC
CCAGAAATTGTAACGCACAGTTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGTAAT
TCAACACAACCTGTTTAATAGTACTTGGAATGGTACTGACATTAAAGGAGATAAT
AAAAATAGCACACTCATCACACTCCCATGCAGAATAAAACAAATTATAAACATG
TGGCAGGGAGTAGGCAAAGCAATGTATGCCCTCCCATCCAAGGACAAATTAGA
TGTTTCATCAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAGCAGC
AGCAGGGAAGAGATCCGTGACAAGCTTCCCGGGAGCTGGAATTCTTGAAGACG
AAAGGGCCTCGTGATACTCCTATTTTTATAGGT

TABELA 8

5' CTGAACCAATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCAAC
 GACTTGGTTAGACATCTTTAATTAACATGTTCTGGGTTG

AAACAATACAAGAAAAAGTATCCGTATCCAGAGAGGACCAGGGAGAGCATTGTGTT
 TTGTTATGTTCTTTTTTCATAGGCATAGGTCTCTCCTGGTCCCTCTCGTAAACAA

ACAATAGGAAAAATAGGAAATATGAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCA
 TGTTATCCTTTTTATCCTTTATACTCTGTTCTGTGTAACATTGTAATCATCTCGT

AAATGGATAACACTTTAAAAACAGATAGATAGCAAATTAAGAGAACAATTTGGA
 TTTACCTTATTGTGAAATTTTGTCTATCTATCGTTTAATTCTCTTGTTAAACCT

AAATAAAAAACAATAATCTTTAAGCAGTCCTCAGGAGGGGACCCAGAAATTGTA
 TTATTATTTTGTATTAGAAATTCGTCAGGAGTCCTCCCCTGGGTCTTTAACAT

ACGCACAGTTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTCTACTGTAATTCAACACAACCTG
 TCGTGTCAAAATTAACACCTCCCCTTAAAAAGATGACATTAAGTTGTGTTGAC

TTTAATAGTACTTGGTTTAATAGTACTTGGAGTACTAAAGGGTCAAATAACACT
 AAATTATCATGAACCAAATTATCATGAACCTCATGATTCCCAGTTTATTGTGA

GAAGGAAGTGACACAATCACCTCCCATGCAGAATAAAACAAATTATAAACATG
 CTCCTTCACTGTGTTAGTGGGAGGGTACGTCTTATTTGTTTAATATTTGTAC

TGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCCCTCCCATCAGTGGACAAATTAGA
 ACCGTCCTTCATCCTTTTCGTTACATACGGGGAGGGTAGTCACCTGTTTAATCT

TGTTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAGCAC
 ACAAGTAGTTTATAATGTCCCGACGATAATTGTTCTCTACCACCATTATCGTTG

AATGAGTCCGA 3'
 TTAATCAGGCTCTAG

TABELA 9

EE1-707-1	CTRPNWY	TRK	RIHI	GPGRIFY	TTGQVIGRI	RQAQC
MN	CTRPNYN	KRK	RIHI	GPGRIFY	TTKNIIGTI	RQAHC
EE1-708-1	CTRPNWY	TRK	RIHI	GPGRIFY	TTGQVIGRI	RQAQC
KW4-4-1	CTRPNWY	TRK	RIHI	GPGRIFY	TMGQIIGDI	RKAHC
JH3	CTRPSKT	TRK	RIHI	GPGRIFY	ATGDIAGDL	RQAHC
WMJ3	CTRPNDI	ARR	RIHI	GPGRIFY	T GKIIGNI	RQAHC
BAL	CTRPNWY	TRK	SIHI	GPGRIFY	TTGEIIGDI	RQAHC
EE3-7-3	CTIPWNN	TRK	SIHI	GPGRIFY	TTGEIIGDI	RQAHC
KW4-6-1	CTRPNWY	TRK	SIHI	GPGRIFY	TTGEIIGDI	RQAHC
EE3-4-3	CTRPNWY	TRK	SIHI	GPGRIFY	TTGEIIGDI	RQAHC
EE7-3-1	CTRPNWY	TRK	SIHI	GPGRIFY	TTGEIIGNI	RQAHC
EE7-15-3	CTRPNWY	TRK	SIHI	GPGRIFY	TTGEIIGDI	RQAYC
EE7-24-1	CTRPNWY	TRK	SIHI	GPGRIFY	TTGEIIGDI	RQAHC
LEG-4-1	CTRPNWY	TRK	SIHI	GPGRIFY	ATGAIIGDI	RQAHC
JG1	CTRPNWY	TRK	SIHI	GPGRIFY	ATGDIIGDI	RQAHC
DD3-1	CTRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	ATGDIIGDI	RQAHC
DD7-1	CTRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	ATGDIIGDI	RQAHC
EE1-330-1	CIRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	ATGDIIGDI	RQAHC
SC	CTRPNWY	TTR	SIHI	GPGRIFY	ATGDIIGDI	RQAHC
DD10-1	CTRPNWYVRRR	HIHI		GPGRIFY	TGEIRGNI	RQAHC
WMJ1.5	CTRPNWYVRRR	HIHI		GPGRIFY	GEIRGNI	RQAHC
KW3-2-2	CIRPHNTI	RR	RIHI	GPGRIFY	TTRGIQGD	RQAYC
DD4-1	CTRPSNV	RN	RIHI	GPGRIFY	TTKRITGDM	RQARC
AFL30-4-1	CTRPSNV	RN	RIHI	GPGRIFY	TTKRITGDM	RQARC
KW2-1-1	CTRPSNV	RN	RIHI	GPGRIFY	TTKRITGDM	RQARC
KW2-9-1	CTRPSNV	RN	RIHI	GPGRIFY	TTKRITGDM	RQARC
EE6-4-4	CTRPSNV	RN	RIHI	GPGRIFY	TTKRITGDM	RQARC
EE7-20-3	XTRPSNV	RN	RIHI	GPGRIFY	TTKRITGDM	RQARC
RJS426	CTRPNKK	RIRHMH		GPGRIFY	ATG GMGDI	RQAHC
KW4-13-1	CTRPNKIPR	HFHI		GPGRIFY	ATGGIEGDI	RKARC
AFL30-6-2	XXRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	ATGDIIGDI	RQAHC
KW2-8-2	XTRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	TTGRIVGDI	RQAHC
TM5-16-1	CTRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	TTGRIVGDI	RQAHC
KW2-8-1	CTRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	TTGRIVGDI	RQAHC
EE5-6-1	CTRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	TTGRIVGDI	RQAHC
EE6-3-5	XTRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	TTGRIVGDI	RQAHC
TM5-8-1	CTRPNWY	TRK	GIHI	GPGRIFY	TARRIIGDI	RQAHC
TM5-12-1	CIRPNIN	TGK	RIFI	GPGRIFY	TTGAIKGNI	RQAHC
EE5-3-2	XTRPNWY	TRK	SIFI	GPGRIFY	TTGEIIGDI	RQAHC
EE3-2-4	XXXPSNN	TRK	SIFI	GPGRIFY	ATGDIIGNI	RQAHC
WH331	XXXXXXX	XRK	SIFI	GPGRIFY	ATGEIIGDI	RQAHC
EE1-279-1	CTRPNWY	TRK	RISI	GPGRIFY	ATRQIVGDI	RQAHC
EE3-5-1	CMRPNWY	TRK	SINI	GPGRIFY	TTGQIIGDI	RQAHC
WH721	XXXXNNN	TRK	SINI	GPGRIFY	ARGEIIGDI	RRAXX
KW4-3-2	CTRPNWY	TRK	SIAI	GPGRIFY	ATTRIIGDI	RQAHC
TM4-11-1	CTRPNWY	TRK	RIYI	GPGRIFY	ARQQIIGDI	RQAHC
TM5-13-1	CTRPNWY	TRK	RIYI	GPGRIFY	ARQQVIGDI	RQAHC
SF2	CTRPNWY	TRK	SIYI	GPGRIFY	TTGRIIGDI	RKAHC
SF4	CTRPNWY	TRK	SIYI	GPGRIFY	TTGRIIGDI	RKAHC
Z321	CMRPNWY	TRK	SISI	GPGRIFY	ATGDIIGDI	RQAHC
WMJ2	CTRPNWY	RR	SLSI	GPGRIFY	YRE IIGII	RQAHC
EE6-1-1	CTRPNWY	TRK	RIKI	GPGRIFY	TTKQIIGDI	RQAYC
KW4-10-1	CTRPNWY	TRK	GIYI	GPGRIFY	TTEKIIGDI	RRACH
TM5-7-1	CTRPNWY	TRK	GIYI	GPGRIFY	TTEKIIGDI	RRACH
EE7-15-1	CTRPNWY	TRK	GIRI	GPGRIFY	TAQRIIGDI	RQAHC

TABELA 9 (Cont.)

DD-3-3	CTRPNNN	TKK	GIRI	GPGRVY	TARRIIGDI	RQAHG
AFL30-5-3	CTRPNNN	TRK	GIRI	GPGRVY	ATARRIIGDI	RQAHG
KW3-9-2	CIRPNNN	TRK	RIGI	GPGRVY	QQ ENIGDI	RQAHG
JG2	CTRPNNN	TRK	SINI	GPGRVY	ATGQIIGNI	RQAHG
EE3-5-2	CTRPNNN	TRK	SINI	GPGRVY	TTGQIIGDI	RQAHG
AFL30-1-3	XTRPNNN	TSR	GIRI	GPGRVY	ATERIIGDI	RQAHG
AFL30-3-1	CTRPNNN	TSR	GIRI	GPGRVY	ATERIIGDI	RQAHG
KW2-2-2	CTRPNNN	TSR	GIRI	GPGRVY	ATERIIGDI	RQAHG
EE5-3-3	XTRPNNN	TSR	GIRI	GPGRVY	ATERIIGDI	RQAHG
EE5-6-3	CTRPNNN	TSR	GIRI	GPGRVY	ATERIIGDI	RQAHG
EE5-10-3	CTRPNNN	TSR	GIRI	GPGRVY	ATERIIGDI	RQAHG
EE5-11-3	CTRPNNN	TSR	GIRI	GPGRVY	ATERIIGDI	RQAHG
EE7-24-3	CTRPNNN	TSR	GIRI	GPGRVY	ATERIIGDI	RQAHG
KW4-3-1	CTRPNNN	TKR	GIRI	GPGRVY	ATDRIIGDI	RQAHG
KW4-2-2	CTRPNNN	TKR	GIRI	GPGRVY	QQTTRIIGDI	RQAHG
WH425	XXXXNNN	TRR	SISI	GPGRVY	TTGAIIGSI	RQAXX
WH718	XXXXXXXX	XSK	SISI	GPGRVY	QQEEVIGDI	XXXXX
WH244	XXXXNNKIKIR	RIHI		GPGRVY	TTK IGDI	RQAYC
EE3-6-2	CTRPNNN	TRK	GIHI	GPGRVY	ATGAIIGDI	RQAHG
EE6-3-1	CTRPNNN	TKK	GIHI	GPGRVY	TRTKIIGDI	RQAHG
DD9-1	CTRPNNN	TRR	SIHI	GPGRVY	TPGRWSVHTTGEIVGDI	RQAHG
TM5-11-1	CTRPNNN	TQK	RITI	GPGRVY	TTGKIVGDI	RQAHG
EE5-10-5	CTRPNNN	TRK	GIFI	GPGRVY	TTGNIIGDI	RKAHC
EE5-11-1	CTRPNNN	TRK	GIFI	GPGRVY	TTGNIIGDI	RKAHC
EE5-14-1	CTRPNNN	TRK	GIFI	GPGRVY	TTGNIIGDI	RKAHC
KW2-6-1	CTRPNNN	TRK	GIFI	GPGRVY	TTGNIIGDI	RKAHC
DD5-1	XXXXNNN	TRA	RLSI	GPGRVY	ATRNIIVGDI	RQAHG
TM4-7-3	CIRPNNN	TRK	AMSI	GPGRVY	TRNKIIGDI	RQAHG
NY5	CTRPNNN	TKK	GIAI	GPGRVY	AREKIIGDI	RQAHG
AFL30-11-1	CTRPNNN	TKK	SLYI	GPGRVY	VTKAITGDI	RQAHG
AFL30-12-1	CTRPNNN	TKR	SLYI	GPGRVY	VTKAITGDI	RQAHG
KW4-12-1	CTRPNNN	TKQ	SLYI	GPGRVY	VTKAITGDI	RQAHG
KW4-12-2	CTRPNNN	TKR	SLYI	GPGRVY	VTKAITGDI	RQAHG
KW4-7-1	CTRPNNN	TRK	GIHM	GPGRVY	TQENI GDI	RQARC
KW4-7-2	CTRPNNN	TRK	GIHM	GPGRVY	TQENI GDI	RQAHG
KW3-6-1	CIRPNNI	TRR	SMSM	GPGRVY	ATRQIIGDI	RKAHC
IIIB (BH10)	CTRPNNN	TRK	SIRIQRGPGRVY	TIGK	IGNM	RQAHG
LAV-BRU	CTRPNNN	TRK	SIHIQRGPGRVY	TIGK	IGNM	RQAHG
EE5-10-1	CTRPNNN	TRK	SIRIQRGPGRVY	TIGK	IXNM	RQAHG
EE7-3-3	CTRPNNN	TRK	SIRIQRGPGRVY	TIGK	IGNM	RQAHG
EE7-6-2	CTRPNNN	TRK	SIRIQRGPGRVY	TIGK	IGNM	RQAHG
KW2-1-3	CTRPNNN	TRK	RIRIQRGPGRVY	TIGK	IGNMEEQAHG	
EE3-6-1	CTRPNNN	TRK	RIRIQRGPGRVY	TIGK	IGNM	RQAHG
EE7-15-2	CTRPNNN	TRK	KIRIQRGPGRVY	TIGK	IRNM	RQAHG
EE5-3-1	CTRPNNN	TRK	KIRIQRGPGRVY	TIGK	IRNM	RQAHG
TM4-14-2	CTRPNNN	TRK	KIVSRGGPGRVY	TIGK	IRNM	RQAHG
KW3-6-2	CTRPNNN	TRR	GIRV	GPGRVY	STDKIIGDI	RQAHG
RF' TM3-8-1	CTRPNNN	TRK	RITK	GPGRVY	ATGQIIGDI	RKAHC
RF	CTRPNNN	TRK	SITK	GPGRVY	ATGQIIGDI	RKAHC
EE7-20-1	CTRPNNH	TEK	RITL	GPGRVY	TTGRIIGDI	RRAHG
CDC451	CTRPNNH	TRK	RVTL	GPGRVY	TTGEILGNI	RQAHG
TM3-9-4	CTRPNNN	TRK	RVTM	GPGRVY	TTGEIVGDI	RQAHG
EE1-706-1	CTRPNNN	TRK	RITM	GPGRVY	TTGQIIGNI	RQAHG
EE1-706-2	CTRPNNN	TRK	RITM	GPGRVY	TAGQIIGNI	RQAHG
BRVA	CTRPNNN	TRK	RITM	GPGRVY	TTGQIIGDI	RRAHG

TABELA 9 (cont.)

KW2-1-2	CTRPNNN TRK RITM	GPGRVYY TTQIIGNI	RQAHG
EE1-317-1	CTRPNNN TRK GIHI	GPGT FY TTGEIIGDI	RQAHG
SF170	CTRPNNN TRK SGTI	GPGQAFY ATGDIIGDI	RQAYC
KW2-6-2	CTRPNNN TRK GIFI	GPGKNIY TTENIIGDI	RKAHC
Z3	CTRPGSDKKIRQSIRI	GPGKVFY AKGGITG	QAHG
EE3-6-1	CIRPNNN TRK SIPM	GPGKAFY ATGEIIGDI	RQAHG
KW4-8-1	CTRPNNN TRK SIPM	GPGKAFY TTGDIIGDI	RQAHG
KW4-8-3	CTRPNNN TRK SIPM	GPGKAFY ATGDIIGDI	RQAHG
TM4-14-1	CTRPNNV ARR GIRV	GPGSATY TAPSIADI	SQAHG
KW2-2-1	CTRPNNN TEK ESYQ	RGPGGAFV TIGK IGNM	RQAHG
LAV-MAL	CTRPGNN TRR GIHF	GPGQALY TTGIVIGDI	RRAYC
EE1-317-2	CTRPNNN IRK RITR	GPGKVIY ATGQIIGDI	RKAHC
EE1-707-2	CTRPNNN IRK RITR	GPGKVIY ATGQIIGDI	RKAHC
SF33	CTRPNNN RRR RITS	GPGKVLY TTGEIIGDI	RKAYC
EE7-21-3	CTRPNNN TRR RIHI	GPRAFY TTGQVIGRI	RQAQC
TM4-14-3	CTRPNNV AKR GIRV	EPGKAIL ATKKIENI	KRAHY
~~EE7-6-1~~	CTRPGNN TRR SISI	RPERAFFTTGQVIGDI	RQAHG
DD1-1	CTRPNNN TRK SIRI	GAGRAIY ATARIIGDI	RQAHG
AFL30-5-1	CTRPNNN TRK SIRI	GAGRAIY ATERIIGDI	RQAHG
EE7-21-1	CTRPNNN TRK SIRY	GAGRAIY ATARIIGDI	RQAHG
TM4-13-2	CIRPNNN TKR AIYI	GQGRAIH TTDRIIGDI	RQAHG
TM4-13-3	CTRPNNN TKR AIYI	GQGRAIH TTDRIIGDI	RQAHG
TM3-7-1	XIRPNNN TRK GIYV	GSGRAVY TRDKIMGDI	RQAHG
AFL30-9-1	CIRPNNN TRK GIYV	GSGRKVY TRHKIIGDI	RQAHG
AFL30-9-2	CIRPNNN TRK GIYV	GSGRKVY TRQKIIGDI	RQAHG
LAVELI	CARPYON TRQ RTPI	GLGQSLY TTRSRIS II	GQAHG
JY1	CTRPDNKITRQ STPI	GLGQALY TTR IKGDI	RQAYC
Z6	CTRPYKN TRQ STPI	GLGQALY TTRGRTKII	GQAHG

TABELA 10

X ₁₃	X ₁₂	X ₁₁	X ₁₀	X ₉	X ₈	X ₇	X ₆	X ₅	X ₄	X ₃	X ₂	X ₁
T 115	R 129	P 132	N 115	N 121	N 118	T 113	R 103	K 90	R 37	I 120	H 47	I 100
I 11	I 1	Y 10	Y 10	S 7	NV 2	K 3	K 18	R 34	S 47	L 6	R 28	R 2
M 3	K 1	S 4	K 2	K 2	Y 4	V 7	S 9	I 1	G 43	M 3	Y 15	M 11
A 1		D 3	E 2	E 2	KI 3	I 3	I 2	N 6	H 4	T 3	T 14	V 6
		G 3	Y 1	Y 1	I 2	A 5	P 1	Q 4	A 3	V 2	S 10	IQR 9
		H 1	D 1	D 1	T 2	R 3	Q 1	A 1	K 3	G 1	P 10	L 2
			I 1	DK 1	E 1	E 1	E 2	IR 1		F 1	F 5	K 2
			Q 1	H 1	P 1	G 1	RQ 1			Y 1	N 4	F 1
				K 1		T 1				E 1	A 2	S 1
										K 1	G 1	G 1
										G 1	Y 1	Y 1
										V 1	SRG 1	SRG 1
											YQR 1	YQR 1

Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y ₁₄	Y ₁₅	Y ₁₆	Y ₁₇
R 121	A 104	F 75	Y 94	T 81	T 102	G 78	R 34	I 115	I 105	G 130	D 106	I 119	R 131	Q 115	A 137	H 116
K 9	V 14	I 25	V 13	A 44	R 11	E 17	K 23	V 7	T 12	R 3	N 23	M 16	G 2	K 16		Y 8
Q 5	N 5	V 15	H 14	V 4	I 11	K 14	Q 20	R 2	V 7	E 1	I 3	ME 1	K 1	R 6		R 8
G 1	R 4	L 8	L 8	Q 3	Q 5	R 10	E 20	N 1	K 2	K 1	R 3	L 1	S 1			Q 3
S 1	K 4	W 5	F 1	H 1	A 5	T 3	D 13	G 1	M 2	A 1	T 1		E 1			
T 1	T 2	Y 5	S 2	I 1	M 1	D 5	N 9		R 2		S 1					
	S 2	G 1	I 1	S 1		Q 4	A 8		L 1							
	F 1	S 1	T 1	Y 2		A 3	G 4		S 1							
	P 1	T 1	M 1			H 1	S 2		E 1							
	W 1		R 1			N 1	I 1		Q 1							
			VH 1			P 1			A 1							

FT 1

1

ROLE	NAME	FAKRNHICPGRAFYTTG	TYPE(S)/TOTAL	MISMATCHES (S TO 1)
CE1-101-1	TAKALBI	SPC RAFFYTTG	C (1/3)	0
RM	RM	-----A	A (3/3), P	0
CE1-108-1	-----B	-----B	C (1/3)	0
RM4-4-1	-----B	-----B	C (1/3)	0
JE1	-----B	-----B	P	0
RMJ3	A-----	-----GE	P	0
MAL	-----B	-----B	P	0
EE3-1-3	-----B	-----B	C (1/3)	0
RM4-4-1	-----B	-----B	C (1/3)	0
EE3-4-1	-----B	-----B	C (1/3)	0
EE7-1-1	-----B	-----B	C (1/3)	0
EE7-11-3	-----B	-----B	C (1/3)	0
EE7-14-1	-----B	-----B	C (1/3)	0
EE4-4-1	-----B	-----B	P (1/3)	0
JE1	-----B	-----A-Q	P	0
DO3-1	-----B	-----A	A (1/3)	0
DO7-1	-----B	-----A	A (1/3)	0
EE1-130-1	-----B	-----A	C (1/3)	0
SC	-----B	-----A	P	0
DO10-1	B-A-----	-----GE	A (3/3)	0
RMJ5	B-A-----	-----GE	P	0
RMJ-2	-----B	-----B	C (1/3)	0
DO4-1	-----B	-----B	A (1/3)	0
AF130-4-1	-----B	-----B	A (1/3)	0
RMJ-1-1	-----B	-----B	C (1/3)	0
RMJ-8-1	-----B	-----B	C (1/3)	0
EE4-4-1	-----B	-----B	C (1/3)	0
TH10-10	-----B	-----B	C (1/3)	0
ALJ418	-----B	-----B	P	0
RM4-13-1	EPABF	-----A	C (1/3)	0
AF130-6-2	-----C	-----A	A (4/6)	1
RMJ-8-2	-----C	-----A	C (1/3)	1
TH10-16-1	-----C	-----V	A (1/3)	1
RMJ-8-2	A-----	-----V	C (1/3)	1
EE3-4-1	A-----	-----V	C (1/3)	1
EE4-3-3	-----B	-----B	C (1/3)	1
TH10-8-1	-----B	-----B	A (1/3)	1
TH10-13-1	-----B	-----B	A (1/3)	1
EE3-3-3	-----B	-----B	C (1/3)	1
WE13	X-----	-----A	C (1/3)	1
EE1-278-1	-----S	-----B	C (1/3)	1
EE3-3-1	-----B	-----B	C (1/3)	1
WE13	-----B	-----A	C (1/3)	1
RM4-3-2	-----B	-----B	C (1/3)	1
TH10-11-1	-----T	-----A	A (1/3)	1
ST2	-----T	-----A	A (1/3)	1
ST4	-----T	-----B	P	1
LJ21	-----B	-----B	P	1
RMJ2	V-----	-----B	P	2
EE4-1-1	-----B	-----B	C (1/3)	1
RM4-10-1	-----B	-----B	C (1/3)	2
TH10-7-1	-----B	-----B	A (1/3)	2
EE7-15-1	-----B	-----B	C (1/3)	2
DO3-3	-----B	-----B	A (1/3)	2
AF130-5-3	-----B	-----B	A (1/3)	2
RMJ-8-2	-----B	-----B	C (1/3)	2
JE2	-----B	-----B	P	2
EE3-5-2	-----B	-----B	C (1/3)	2
AF130-1-3	-----B	-----B	A (1/3)	2
AF130-3-1	-----B	-----B	A (1/3)	2
RMJ-2-2	-----B	-----B	C (1/3)	2
EE3-3-3	-----B	-----B	C (1/3)	2
EE3-6-3	-----B	-----B	C (1/3)	2
EE3-10-3	-----B	-----B	C (1/3)	2
EE3-11-3	-----B	-----B	C (1/3)	2
EE7-24-3	-----B	-----B	C (1/3)	2
RM4-3-1	-----B	-----B	C (1/3)	2
RMJ-2-2	-----B	-----B	C (1/3)	2
RMJ4	-----B	-----B	C (1/3)	2
WE10	-----B	-----B	C (1/3)	2
WE14	-----B	-----B	C (1/3)	2
EE3-6-2	-----B	-----B	C (1/3)	2
EE3-3-1	-----B	-----B	C (1/3)	2
DO3-1	-----B	-----B	A (1/3)	2
TH10-11-1	-----B	-----B	A (1/3)	2
EE3-10-5	-----B	-----B	C (1/3)	2
EE3-11-1	-----B	-----B	C (1/3)	2
EE3-14-1	-----B	-----B	C (1/3)	2
RMJ-1-1	-----B	-----B	C (1/3)	2
DO3-1	-----B	-----B	A (1/3)	2
TH10-7-3	-----B	-----B	A (1/3)	2
MTS	-----B	-----B	P	3
AF130-11-1	-----B	-----B	A (1/3)	3
AF130-12-1	-----B	-----B	A (1/3)	3
RM4-12-1	-----B	-----B	C (1/3)	3
RM4-1-1	-----B	-----B	C (1/3)	3
RM4-7-2	-----B	-----B	C (1/3)	3
RMJ-1-1	-----B	-----B	C (1/3)	3
EE3-10-1	-----B	-----B	C (1/3)	3
EE3-10-1	-----B	-----B	C (1/3)	3
EE3-10-1	-----B	-----B	C (1/3)	3

TABELA 12

PADRÕES DE SEQUÊNCIA COMUNS

IaIGPGR	60
IaIGPGRA	50
IaIGPGRAF	32
IGPGRA	52
GPGRAF	40
IGPGRAF	35
IGPGRaaY	31

IIIB

MetThrArgIleGlnArgGlyProGlyArgAlaPheVal GlyGlyGlyGly -

RF

SerIleThrArgGlyProGlyArgValIleTyr GlyGlyGlyGly -

MN

ArgIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

SC

SerIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

WMJ1

HisIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

LeuSerIleCys

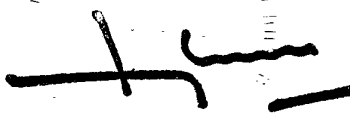


TABELA 13A

E.coli BG

MetLeuArgProValGluThrProThrArgGluIleLysLysLeuAspGlyLeuTrp -
 AlaPheSerLeuAspArgGluArgValValArgTyrHisArgTrpIleArgGlnAlaSer -

IIIB

MetThrArgIleGlnArgGlyProGlyArgAlaPheVal GlyGlyGlyGly -

RF

SerIleThrArgGlyProGlyArgValIleTyr GlyGlyGlyGly -

MN

ArgIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

SC

SerIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

WMJ1

HisIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

LeuSerIleCys

REIVINDICAÇÕES:

1a. - Processo para a produção de um composto possuindo a capacidade de se suscitar e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, caracterizado por se incorporar no referido composto uma sequência de aminoácidos que:

a) é o domínio de neutralização principal de uma variante de HIV;

b) é uma porção do domínio de neutralização principal de uma variante de HIV; ou

c) é equivalente a um domínio de neutralização principal ou a uma sua porção.

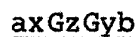
2a. - Processo para a produção de um composto que não a proteína do invólucro do HIV que existe naturalmente, possuindo o referido composto a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, caracterizado por se incluir no referido composto o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se modificar o referido composto mediante a adição de uma ou mais das seguintes frações; cisteína, uma proteína ou outra fração capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

4a. - Processo para a produção de um composto possuindo a capacidade de induzir e/ou de se li-

gar com anticorpos neutralizantes, caracterizado por se incorporar no referido composto essencialmente os aminoácidos compreendidos entre os resíduo de cisteína que ocorrem nas, ou à volta das, posições 296 a 331 da proteína do invólucro duma variante de HIV.

5a. - Processo de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por se produzir um composto possuindo a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes de HIV, tendo o referido composto a fórmula



na qual

x tem um comprimento de 0 a 13 aminoácidos;

y tem um comprimento de 0 a 17 aminoácidos; e

z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a ou b, individualmente, podem compreender qualquer um dos seguintes: cisteína uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio neutralizante principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

6a. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o referido composto estar circularizado.

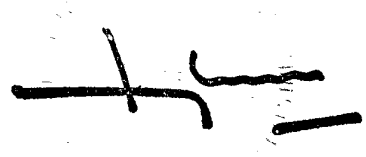
7a. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o referido composto compreender epítomos do domínio neutralizante principal de mais de uma variante de HIV.

8a. - Processo de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por se produzir polipeptídeo seleccionado do grupo constituído por

- (1) proteína de fusão de 10 Kd de HIV denominada Sub 1;
- (2) porção de proteína de HIV de Sub 1;
- (3) porção de proteína de HIV 18 Kd denominada Sub 2;
- (4) porção de proteína de HIV de Sub 2;
- (5) porção de proteína de HIV 27 Kd denominada PBl_{RF};
- (6) porção de proteína de HIV de PBl_{RF};
- (7) porção de proteína de HIV 28 Kd denominada PBl_{MN};
- (8) porção de proteína de HIV de PBl_{MN};
- (9) porção de proteína de HIV 26 Kd denominada PBl_{SC};
- (10) porção de proteína de HIV de PBl_{SC};
- (11) porção de proteína de HIV 26 Kd denominada PBl_{WMJ2};
- (12) porção de proteína de HIV de PBl_{WMJ2};
- (13) peptídeo III_B(BH10)-PND;
- (14) peptídeo RF-PND;
- (15) peptídeo MN-PND;
- (16) peptídeo SC-PND;
- (17) peptídeo WMJ-2-PND;
- (18) peptídeo LAV-MAL-PND;
- (19) peptídeo SF-2-PND;
- (20) peptídeo NY5-PND;

- (21) peptideo Z3-PND;
- (22) peptideo WMJ1-PND;
- (23) peptideo WMJ3-PND;
- (24) peptideo Z6-PND;
- (25) peptideo LAVELI-PND;
- (26) peptideo CDC451-PND;
- (27) peptideo CDC42-PND;
- (28) peptideo BAL-PND;
- (29) peptideo HIV-2-PND;
- (30) peptideo 135;
- (31) peptideo 136;
- (32) peptideo 139;
- (33) peptideo 141;
- (34) peptideo 142;
- (35) peptideo 143;
- (36) peptideo 131;
- (37) peptideo 132;
- (38) peptideo 134;
- (39) peptideo 339;
- (40) RP342 (WMJ2);
- (41) RP343 (SC);
- (42) RP60 (III_B);
- (43) RP335 (III_B);
- (44) RP337 (III_B);
- (45) RP77 (III_B);
- (46) RP83 (WMJ1);
- (47) RP79 (III_B);
- (48) RP57;

- 
- (49) RP55;
 - (50) RP75;
 - (51) RP56;
 - (52) RP59;
 - (53) RP73 (III_B,RF);
 - (54) RP74 (III_B,RF, MN, SC);
 - (55) RP80 (III_B,RF);
 - (56) RP81 (III_B,RF,WMJ1,MN);
 - (57) RP82 (WMJ1,MN);
 - (58) RP137(III_B,RF);
 - (59) RP140 (III_B,RF);
 - (60) peptideo 64(HIV-IIIB/HIV-RF/HIV-MN/HIV-SC);
 - (61) peptideo 338 (HIV-III_B/HIV-RF);
 - (62) peptideo 138;
 - (63) RP342;
 - (64) RP96;
 - (65) RP97;
 - (66) RP98;
 - (67) RP99;
 - (68) RP100;
 - (69) RP102;
 - (70) RP88;
 - (71) RP91;
 - (72) RP104;
 - (73) RP106;
 - (74) RP108;
 - (75) RP70;
 - (76) RP84;

- 
- (77) RP144;
 - (78) RP145;
 - (79) RP146;
 - (80) RP147;
 - (81) RP150;
 - (82) RP151;
 - (83) RP63;
 - (84) RP41;
 - (85) RP61;
 - (86) RP75;
 - (87) RP111;
 - (88) RP113;
 - (89) RP114;
 - (90) RP116;
 - (91) RP120;
 - (92) RP121c;
 - (93) RP122c;
 - (94) RP123c;

e suas modificações químicas.

9a. - Processo para a produção de sequência de DNA que codifica um polipeptídeo que não a proteína do invólucro de HIV que ocorre naturalmente, possuindo o referido polipeptídeo a capacidade de suscitar e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, caracterizado por o referido polipeptídeo incluir o domínio neutralizante principal,

ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

10a. - Processo para a produção de sequências de DNA de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o referido polipeptídeo ter a fórmula

axGzGyb

na qual

x tem um comprimento de 0 a 13 aminoácidos;

y tem um comprimento de 0 a 17 aminoácidos; e

z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b, individualmente, podem compreender qualquer um dos seguintes: cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

11a. - Processo para a produção de uma composição capaz de suscitar e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes para uma ampla gama de variantes de HIV, caracterizado por se incluir na referida composição compreender um ou mais compostos possuindo a fórmula seguinte:

axGzGyb

na qual

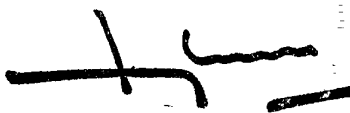
x tem um comprimento de 0 a 13 aminoácidos;

y tem um comprimento de 0 a 17 aminoácidos; e

z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b, individualmente, podem compreender qualquer um dos seguintes; cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

12a. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por se seleccionar x de:



$x(0) \equiv x$ não está presente

$x(1) \equiv x_1$

$x(2) \equiv x_2 x_1$

$x(3) \equiv x_3 x_2 x_1$

$x(4) \equiv x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(5) \equiv x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(6) \equiv x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(7) \equiv x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(8) \equiv x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(9) \equiv x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(10) \equiv x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(11) \equiv x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(12) \equiv x_{12} x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(13) \equiv x_{13} x_{12} x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

z é P, L, A, S, ou Q; e y é seleccionado de:

$y(0) \equiv y$ não está presente

$y(1) \equiv y_1$

$y(2) \equiv y_1 y_2$

$y(3) \equiv y_1 y_2 y_3$

$y(4) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4$

$y(5) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5$

$y(6) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6$

$y(7) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7$

$y(8) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8$

$y(9) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9$

$y(10) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10}$

$y(11) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11}$

$y(12) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12}$

$y(13) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13}$

$y(14) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14}$

$y(15) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15}$

$y(16) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15} y_{16}$

$y(17) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15} y_{16} y_{17}$

e na qual

- x_1 é I, R, M, IQR, V, L, K, F, S, G, Y, SRG, ou YQR;
- x_2 é H, R, Y, T, S, P, F, N, A, K, G, ou V;
- x_3 é I, L, M, T, V, E, G, F, ou Y;
- x_4 é R, S, G, H, A, K, ou não está presente
- x_5 é K, R, I, N, Q, A, IR, RQ, ou não está presente
- x_6 é R, K, S, I, P, Q, E, G, ou T;
- x_7 é T, K, V, I, A, R, P, ou E;
- x_8 é N, NV, Y, KI, I, T, DK, H, ou K;
- x_9 é N, S, K, E, Y, D, I, ou Q;
- x_{10} é N, Y, S, D, G, ou H;
- x_{11} é P;
- x_{12} é R, I, ou K;
- x_{13} é T, I, M, ou A;
- y_1 é R, K, Q, G, S, ou T;
- y_2 é A, V, N, R, K, T, S, F, P, ou W;
- y_3 é F, I, V, L, W, Y, G, S, ou T;
- y_4 é Y, V, H, L, F, S, I, T, M, R, VH, ou FT;
- y_5 é T, A, V, Q, H, I, S, Y, ou não está presente
- y_6 é T, R, I, Q, A, M, ou não está presente
- y_7 é G, E, K, R, T, D, Q, A, H, N, P, ou não está presente
- y_8 é R, Q, E, K, D, N, A, G, S, I, ou não está presente
- y_9 é I, V, R, N, G, ou não está presente
- y_{10} é I, T, V, K, M, R, L, S, E, Q, A, ou não está presente
- y_{11} é G, R, E, K, H, ou não está presente
- y_{12} é D, N, I, R, T, S, ou não está presente
- y_{13} é I, M, ME, L, ou não está presente
- y_{14} é R, G, K, S, E, ou não está presente
- y_{15} é Q, K, ou R;
- y_{16} é A; e
- y_{17} é H, Y, R, ou Q.

13a. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por

X_1 ser I;
Z ser P;
 Y_1 ser R; e
 Y_2 ser A.

14a. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por

X_1 ser I;
 X_3 ser I;
Z ser P; e
 Y_1 ser R.

15a. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por

Z ser P,
 Y_1 ser R;
 Y_2 ser A; e
 Y_3 ser F.

16a. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por

X_1 ser I;
 X_2 ser H;
 X_3 ser I;

X_4 ser R;
 X_5 ser K;
 X_6 ser R;
 X_7 ser T;
Z ser P;
 Y_1 ser R;
 Y_2 ser A;
 Y_3 ser F;
 Y_4 ser Y;
 Y_5 ser T;
 Y_6 ser T; e
 Y_7 ser G.

17a. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por se circularizar o referido composto.

18a. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a e/ou b compreenderem um peptídeo de um domínio de neutralização principal do HIV.

19a. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a referida fracção capaz de intensificar a imunogenicidade ser uma partícula viral, um microorganismo ou uma porção imunogénica deste.

20a. - Processo para a produção de composição profilática ou terapêutica caracterizado por se incluir na referida composição imunoglobulina, anticorpos mo-

noclonais e/ou anticorpos policlonais, gerados mediante a imunização de um animal adequado tal como um murganho, rato, cavalo, cabra, ser humano ou chimpanzé com um composto híbrido que compreende compostos em que os referidos polipeptídeos não são proteínas naturais do invólucro de HIV, possuindo os referidos polipeptídeos a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo os referidos polipeptídeos o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

21a. - Processo para a produção de uma composição profiláctica ou terapêutica caracterizado por se incluir na referida composição anticorpos gerados por imunização de um animal ou ser humano com pelo menos um composto compreendendo um domínio de neutralização principal de uma variante de HIV e por, seguidamente, imunização do referido animal ou ser humano com

(a) uma mistura compreendendo compostos, em que os referidos compostos não são proteínas naturais do invólucro de HIV possuindo os referidos compostos a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo os referidos compostos o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV; ou

(b) um composto híbrido compreendendo polipeptídeos, em que os referidos polipeptídeos não são proteínas do invólucro de HIV ocorrendo naturalmente, possuindo os referidos polipeptídeos a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo os referidos polipeptídeos o domínio de neutralizante principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

22a. - Processo para a produção de uma composição profiláctica ou terapêutica caracterizado por esta compreender um anticorpo obtido contra uma mistura compreendendo compostos, em que os referidos compostos não são proteínas do invólucro de HIV, mas possuem a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos, compreendendo cada um dos referidos compostos o domínio neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

23a. - Processo para a produção de uma composição profiláctica ou terapêutica, caracterizado por se induzir na referida composição um anticorpo obtido contra pelo menos um composto possuindo a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes de HIV, tendo o referido composto a fórmula



na qual

x tem um comprimento de 0 a 13 aminoácidos;

y tem um comprimento de 0 a 17 aminoácidos; e

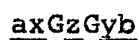
z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b, individualmente, podem compreender qualquer um dos seguintes; cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

24a. - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por a e/ou b compreenderem um

peptídeo de um domínio neutralizante principal de HIV.

25a. - Anticorpo, caracterizado por ser obtido contra um composto, tendo esse composto ter a fórmula



na qual

x tem um comprimento de 0 a 13 aminoácidos;

y tem um comprimento de 0 a 17 aminoácidos; e

z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b, individualmente, podem compreender qualquer um dos seguintes: cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

26a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por x ser seleccionado a partir de:

$x(0) \equiv x$ não está presente

$x(1) \equiv x_1$

$x(2) \equiv x_2 x_1$

$x(3) \equiv x_3 x_2 x_1$

$x(4) \equiv x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(5) \equiv x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(6) \equiv x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(7) \equiv x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(8) \equiv x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(9) \equiv x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(10) \equiv x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(11) \equiv x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(12) \equiv x_{12} x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(13) \equiv x_{13} x_{12} x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

z is P, L, A, S, ou Q; e y é seleccionado de:

$y(0) \equiv y$ não está presente

$y(1) \equiv y_1$

$y(2) \equiv y_1 y_2$

$y(3) \equiv y_1 y_2 y_3$

$y(4) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4$

$y(5) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5$

$y(6) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6$

$y(7) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7$

$y(8) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8$

$y(9) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9$

$y(10) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10}$

$y(11) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11}$

$y(12) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12}$

$y(13) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13}$

$y(14) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14}$

$y(15) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15}$

$y(16) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15} y_{16}$

$y(17) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15} y_{16} y_{17}$



e em que

- x_1 é I, R, M, IQR, V, L, K, F, S, G, Y, SRG, ou YQR;
 x_2 é H, R, Y, T, S, P, F, N, A, K, G, ou V;
 x_3 é I, L, M, T, V, E, G, F, ou Y;
 x_4 é R, S, G, H, A, K, ou não está presente
 x_5 é K, R, I, N, Q, A, IR, RQ, ou não está presente
 x_6 é R, K, S, I, P, Q, E, G, ou T;
 x_7 é T, K, V, I, A, R, P, ou E;
 x_8 é N, NV, Y, KI, I, T, DK, H, ou K;
 x_9 é N, S, K, E, Y, D, I, ou Q;
 x_{10} é N, Y, S, D, G, ou H;
 x_{11} é P;
 x_{12} é R, I, ou K;
 x_{13} é T, I, M ou A;
 y_1 é R, K, Q, G, S, ou T;

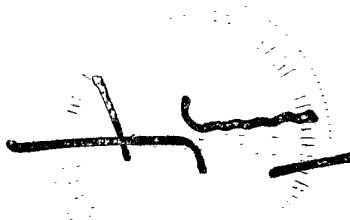
 y_2 é A, V, N, R, K, T, S, F, P, ou W;
 y_3 é F, I, V, L, W, Y, G, S, ou T;
 y_4 é Y, V, H, L, F, S, I, T, M, R, VH, ou FT;
 y_5 é T, A, V, Q, H, I, S, Y, ou não está presente
 y_6 é T, R, I, Q, A, M, ou não está presente
 y_7 é G, E, K, R, T, D, Q, A, H, N, P, ou não está presente
 y_8 é R, Q, E, K, D, N, A, G, S, I, ou não está presente
 y_9 é I, V, R, N, G, ou não está presente
 y_{10} é I, T, V, K, M, R, L, S, E, Q, A, ou não está presente
 y_{11} é G, R, E, K, H, ou não está presente
 y_{12} é D, N, I, R, T, S, ou não está presente
 y_{13} é I, M, ME, L, ou não está presente
 y_{14} é R, G, K, S, E, ou não está presente
 y_{15} é Q, K, ou R;
 y_{16} é A; e
 y_{17} é H, Y, R, ou Q.

27a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) ser(em) seleccionado(s) do grupo constituído por

- (a) a-Y-S-N-V-R-N-R-I-H-I-G-P-G-R-A-F-H-T-T-K-R-I-T-b;
- (b) a-N-N-N-T-S-R-G-I-R-I-G-P-G-R-A-I-L-A-T-E-R-I-I-b;
- (c) a-N-N-N-T-R-K-G-I-F-I-G-P-G-R-N-I-Y-T-T-G-N-I-I-b;
- (d) a-N-T-R-K-S-I-R-I-Q-R-G-P-G-R-A-F-V-T-I-G-K-I-G-b;
- (e) a-N-N-N-T-R-K-R-(I ou V)-T-M-G-P-G-R-V-(Y ou W)-Y-(X ou T)-(A ou T)-G-Q-I-I-b;
- (f) a-N-N-N-(I ou T)-R-K-(R ou S)-I-T-(R ou K)-G-P-G-(R ou K)-V-I-Y-A-T-G-Q-I-I-b;
- (g) a-N-N-N-T-R-K-G-I-Y-V-G-S-G-R-(A ou K)-V-T-T-R-(D ou H ou Q)-K-I-(I ou M)-b; e
- (h) a-T-R-Q-(R ou S)-T-P-I-G-L-G-Q-(A ou S)-L-Y-T-T-R-b.

28a. - Processo para a produção de uma vacina destinada a gerar uma ampla resposta imunológica, neutralizante caracterizado por se incluir na referida vacina compreender uma mistura compreendendo compostos, em que os referidos compostos não são proteínas naturais do invólucro de HIV ocorrendo naturalmente, mas possuem a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo os referidos compostos o domínio de neutralizante principal, ou um seu segmento, de variantes de HIV.

29a. - Processo para a produção de uma vacina destinada a gerar uma ampla resposta imunológica neutralizante, caracterizado por se incluir na referida vacina um composto híbrido que compreende polipeptídeos, em que os referidos polipeptídeos não são proteínas naturais do



invólucro de HIV que possuem a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo os referidos polipeptídeos o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

30a. - Processo para a produção de uma vacina caracterizada por se incluir na referida vacina pelo menos um composto possuindo a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes de HIV, tendo o referido composto a fórmula

axGzGyb

na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento;

y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e

z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b, individualmente, podem compreender qualquer um dos seguintes: cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

31a. - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por a referida vacina ser formulada com um adjuvante imunológico.

32a. - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por x ser escolhido de entre:

$x(0) \equiv x$ não está presente

$x(1) \equiv x_1$

$x(2) \equiv x_2 x_1$

$x(3) \equiv x_3 x_2 x_1$

$x(4) \equiv x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(5) \equiv x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(6) \equiv x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(7) \equiv x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(8) \equiv x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(9) \equiv x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(10) \equiv x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(11) \equiv x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(12) \equiv x_{12} x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

$x(13) \equiv x_{13} x_{12} x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$

z é P, L, A, S, ou Q e y é seleccionado de

$y(0) \equiv y$ não está presente

$y(1) \equiv y_1$

$y(2) \equiv y_1 y_2$

$y(3) \equiv y_1 y_2 y_3$

$y(4) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4$
 $y(5) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5$
 $y(6) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6$
 $y(7) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7$
 $y(8) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8$
 $y(9) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9$
 $y(10) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10}$
 $y(11) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11}$
 $y(12) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12}$
 $y(13) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13}$
 $y(14) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14}$
 $y(15) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15}$
 $y(16) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15} y_{16}$
 $y(17) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15} y_{16} y_{17}$

e em que

x_1 é I, R, M, IQR, V, L, K, F, S, G, Y, SRG, ou YQR;
 x_2 é H, R, Y, T, S, P, F, N, A, K, G, ou V;
 x_3 é I, L, M, T, V, E, G, F, ou Y;
 x_4 é R, S, G, H, A, K, ou não está presente
 x_5 é K, R, I, N, Q, A, IR, RQ, ou não está presente
 x_6 é R, K, S, I, P, Q, E, G, ou T;
 x_7 é T, K, V, I, A, R, P, ou E;
 x_8 é N, NV, Y, KI, I, T, DK, H, ou K;
 x_9 é N, S, K, E, Y, D, I, ou Q;
 x_{10} é N, Y, S, D, G, ou H;
 x_{11} é P;
 x_{12} é R, I, ou K;
 x_{13} é T, I, M ou A;
 y_1 é R, K, Q, G, S, or T;
 y_2 é A, V, N, R, K, T, S, F, P, ou W;
 y_3 é F, I, V, L, W, Y, G, S, ou T;
 y_4 é Y, V, H, L, F, S, I, T, M, R, VH, ou FT;
 y_5 é T, A, V, Q, H, I, S, Y,
 y_6 é T, R, I, Q, A, M,
 y_7 é G, E, K, R, T, D, Q, A, H, N, P,
 y_8 é R, Q, E, K, D, N, A, G, S, I,
 y_9 é I, V, R, N, G,

y_{10} é I, T, V, K, M, R, L, S, E, Q, A, ou não está presente
 y_{11} é G, R, E, K, H, ou não está presente
 y_{12} é D, N, I, R, T, S, ou não está presente
 y_{13} é I, M, ME, L, ou não está presente
 y_{14} é R, G, K, S, E, ou não está presente
 y_{15} é Q, K, ou R;
 y_{16} é A; e
 y_{17} é H, Y, R, ou Q.

33a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por x ser escolhido de entre:

x_1 é I;
 x_2 é H;
 x_3 é I;
 x_4 é R;
 x_5 é K;
 x_6 é R;
 x_7 é T;
 z é P;
 y_1 é R;
 y_2 é A;
 y_3 é F;
 y_4 é Y;
 y_5 é T;
 y_6 é T;
 y_7 é G.

34a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) ser(em) seleccionado(s) do grupo constituído por

- (a) a-Y-S-N-V-R-N-R-I-H-I-G-P-G-R-A-F-H-T-T-K-R-I-T-b;
- (b) a-N-N-N-T-S-R-G-I-R-I-G-P-G-R-A-I-L-A-T-E-R-I-I-b;
- (c) a-N-N-N-T-R-K-G-I-F-I-G-P-G-R-N-I-Y-T-T-G-N-I-I-b;
- (d) a-N-T-R-K-S-I-R-I-Q-R-G-P-G-R-A-F-V-T-I-G-K-I-G-b;
- (e) a-N-N-N-T-R-K-R-(I ou V)-T-M-G-P-G-R-V-(Y ou W)-Y-(X ou T)-(A ou T)-G-Q-I-I-b;
- (f) a-N-N-N-(I ou T)-R-K-(R ou S)-I-T-(R ou K)-G-I G-(R ou K)-V-I-Y-A-T-G-Q-I-I-b;
- (g) a-N-N-N-T-R-K-G-I-Y-V-G-S-G-R-(A ou K)-V-T-T-R-(D ou H ou Q)-K-I-(I M)-b;
- (h) a-T-R-Q-(R ou S)-T-P-I-G-L-G-Q-(A ou S)-L-Y-T-T-R-b.

35a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) ser(em) capaz(es) de introduzir anticorpos que se ligam à sequência G-P-G-R-A-F.

36a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) ser(em) capaz(es) de induzir anticorpos que se ligam à sequência I-G-P-G-R-A-F.

37a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) ser(em) capaz(es) de induzir anticorpos que se ligam à sequência I-G-P-G-R-A.

38a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) ser(em) capaz(es) de induzir anticorpos que se ligam à sequência i-a-i-G-P-G-R, na qual a é qualquer um dos 20 aminoácidos.

39a. - Processo de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por a ser H.

40a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o(s) referido(s) compostos ser(em) capaz(es) de induzir anticorpos que se ligam à sequência i-a-i-G-P-G-R-A, na qual a é qualquer um dos 20 aminoácidos.

41a. - Processo de acordo com a reivindicação 40 caracterizado por a ser H.

42a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) ser(em) capaz(es) de induzir anticorpos que se ligam à sequência i-a-i-G-P-G-R-A-F, na qual a é qualquer um dos 20 aminoácidos.

43a. - Processo de acordo com a reivindicação 40, caracterizado por a ser H.

44a. - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) estar(em) circularizados.

45a. - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) compreender(em) epítomos de mais de uma variante de HIV.

46a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por

X_1 ser i;
 Z ser P;
 Y_1 ser R; e
 Y_2 ser A.

47a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por

X_1 ser i;
 X_3 ser i;
 Z ser P; e
 Y_1 ser R.

48a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por

Z ser P
 Y_1 ser R
 Y_2 ser A
 Y_3 ser F.

49a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por x ser seleccionado do grupo constituído por x(5), x(6), x(7), x(8), x(9), x(10), e x(11) e y ser seleccionado de entre y(5), y(6), y(7), y(8), y(9), y(10), e y(11).

50a. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o referido composto ter a seguinte sequência de aminoácidos:

a-x₁₃-R-P-x₁₀-x₉-x₈-x₇-x₆-x₅-x₄-x₃-x₂-x₁-G-z-G-y₁-y₂-y₃-y₄-y₅-y₆-y₇-y₈-y₉-y₁₀-G-y₁₂-y₁₃-R-y₁₅-A-y₁₇-b.

51a. - Sistema para ser utilizado na detecção de anticorpo contra HIV num fluido biológico, caracterizado por compreender:

(a) um composto, em que esse composto não é uma proteína natural do invólucro de HIV, possuindo o referido composto a capacidade de suscitar e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo o referido composto o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV; e

(b) um meio de detecção dos complexos formados entre o referido anticorpo e o referido composto.

52a. - Sistema de acordo com a reivindicação 51, caracterizado por o referido composto ter a

a fórmula

$$\underline{x} \text{ G } \underline{z} \text{ G } \underline{y}$$

na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento,
y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e
z é P, A, S, Q ou L.

53a. - Sistema de acordo com a reivindicação 52, caracterizado por x ser seleccionado de

$x(0) \equiv x$ não está presente
 $x(1) \equiv x_1$
 $x(2) \equiv x_2 x_1$
 $x(3) \equiv x_3 x_2 x_1$
 $x(4) \equiv x_4 x_3 x_2 x_1$
 $x(5) \equiv x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$
 $x(6) \equiv x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$
 $x(7) \equiv x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$
 $x(8) \equiv x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$
 $x(9) \equiv x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$
 $x(10) \equiv x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$
 $x(11) \equiv x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$
 $x(12) \equiv x_{12} x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$
 $x(13) \equiv x_{13} x_{12} x_{11} x_{10} x_9 x_8 x_7 x_6 x_5 x_4 x_3 x_2 x_1$
 z é P, L, A, S ou Q; e y é seleccionado de:

$y(0) \equiv y$ não está presente

$y(1) \equiv y_1$

$y(2) \equiv y_1 y_2$

$y(3) \equiv y_1 y_2 y_3$

$y(4) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4$

$y(5) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5$

$y(6) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6$

$y(7) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7$

$y(8) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8$

$y(9) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9$

$y(10) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10}$

$y(11) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11}$

$y(12) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12}$

$y(13) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13}$

$y(14) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14}$

$y(15) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15}$

$y(16) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15} y_{16}$

$y(17) \equiv y_1 y_2 y_3 y_4 y_5 y_6 y_7 y_8 y_9 y_{10} y_{11} y_{12} y_{13} y_{14} y_{15} y_{16} y_{17}$

e em que

x_1 é I, R, M, IQR, V, L, K, F, S, G, Y, SRG, ou YQR;

x_2 é H, R, Y, T, S, P, F, N, A, K, G, or V;

x_3 é I, L, M, T, V, E, G, F, ou Y;

x_4 é R, S, G, H, A, K, não está presente

x_5 é K, R, I, N, Q, A, IR, RQ, ou não está presente

x_6 é R, K, S, I, P, Q, E, G, ou T;

x_7 é T, K, V, I, A, R, P, ou E;

x_8 é N, NV, Y, KI, I, T, DK, H, or K;

x_9 é N, S, K, E, Y, D, I, ou Q;



x_{10} é N, Y, S, D, G, or H;

x_{11} é P;

x_{12} é R, I, K;

x_{13} é T, I, M A;

y_1 é R, K, Q, G, S, T;

y_2 é A, V, N, R, K, T, S, F, P, W;

y_3 é F, I, V, L, W, Y, G, S, T;

y_4 é Y, V, H, L, F, S, I, T, M, R, VH, or FT;

y_5 é T, A, V, Q, H, I, S, Y, ou não está presente

y_6 é T, R, I, Q, A, M, ou não está presente

y_7 é G, E, K, R, T, D, Q, A, H, N, P, ou não está presente

y_8 é R, Q, E, K, D, N, A, G, S, I, ou não está presente

y_9 é I, V, R, N, G, ou não está presente

y_{10} é I, T, V, K, M, R, L, S, E, Q, A, ou não está presente

y_{11} é G, R, E, K, H, ou não está presente

y_{12} é D, N, I, R, T, S, ou não está presente

y_{13} é I, M, ME, L, ou não está presente

y_{14} é R, G, K, S, E, ou não está presente

y_{15} é Q, K, ou R;

y_{16} é A; e

y_{17} é H, Y, R, ou Q.



54a. - Sistema de acordo com a reivindicação 51, caracterizado por o(s) referido(s) composto(s) ser(em) seleccionado(s) do grupo constituído por

- (a) a-Y-S-N-V-R-N-R-I-H-I-G-P-G-R-A-F-H-T-T-K-R-I-T-b;
- (b) a-N-N-N-T-S-R-G-I-R-I-G-P-G-R-A-I-L-A-T-E-R-I-I-b;
- (c) a-N-N-N-T-R-K-G-I-F-I-G-P-G-R-N-I-Y-T-T-G-N-I-I-b;
- (d) a-N-T-R-K-S-I-R-I-Q-R-G-P-G-R-A-F-V-T-I-G-K-I-G-b;
- (e) a-N-N-N-T-R-K-R-(I ouV)-T-M-G-P-G-R-V-(Y ouW)-Y-(X ouT)-(A ouT)-G-Q-I-I-b;
- (f) a-N-N-N-(I ouT)-R-K-(R ouS)-I-T-(R ouK)-G-P-G-(R ouK)-V-I-Y-A-T-G-Q-I-I-b;
- (g) a-N-N-N-T-R-K-G-I-Y-V-G-S-G-R-(A ouK)-V-T-T-R-(D ouH ouQ)-K-I-(I ouM)-b;
- (h) a-T-R-Q-(R ouS)-T-P-I-G-L-G-Q-(A ouS)-L-Y-T-T-R-b.

55a. - Ensaio imunológico para detecção e/ou quantificação do anticorpo contra HIV num fluído, caracterizado por o referido ensaio utilizar pelo menos um composto, em que esse composto não é uma proteína natural do invólucro de HIV, possuindo o referido composto a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo o referido composto o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

56a. - Ensaio imunológico de acordo com a reivindicação 55, caracterizado por o referido composto ter a fórmula

x G z G y

na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento,

y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e

z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a ou b individualmente podem compreender qualquer um dos seguintes; cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

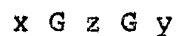
57a. - Processo para a preparação de anticorpos monoclonais ou policlonais neutralizantes, de larga gama de actividade, caracterizado por compreender a imunização com uma mistura que compreende compostos, em que esses compostos não são proteínas naturais do invólucro de HIV, tendo os referidos compostos a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, em que cada um dos referidos compostos compreende o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

58a. - Processo para a preparação de anticorpos monoclonais ou policlonais neutralizantes amplos, caracterizado por compreender a imunização com um composto híbrido que compreende polipeptídeos possuindo a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, em que cada um dos referidos polipeptídeos compreende o domínio neutralizante principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

59a. - Processo para a preparação de anticorpos neutralizantes de larga gama de actividade, caracterizada por compreender a imunização de um animal ou ser humano com pelo menos um composto compreendendo um domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV, seguida pela imunização do referido animal ou ser humano com

- (a) uma mistura compreendendo composto, em que esses compostos não são proteínas naturais do invólucro de HIV que, possuindo os referidos compostos a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes compreendendo os referidos compostos o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV; ou
- (b) um composto híbrido que compreende polipeptídeos, em que esses polipeptídeos não são proteínas naturais do invólucro de HIV que, possuindo os referidos polipeptídeos a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo os referidos polipeptídeos o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

60a. - Processo de acordo com a reivindicação 59a, caracterizado por compreender a imunização com, pelo menos, um composto possuindo a capacidade de introduzir e/ou de se ligar com anticorpo neutralizantes, possuindo o referido composto à fórmula



na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento,
y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e
z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b individualmente podem compreender qualquer um dos seguintes; cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

61a. - Método para detecção de um anticorpo contra HIV num fluido biológico, caracterizado por os seguintes passos:

- (a) incubação de um composto, que não uma proteína natural do involucro de HIV que, possuindo o referido composto a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo o referido composto o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento de uma variante de HIV;
- (b) detecção dos complexos formados entre o referido anticorpo e o referido composto.

62a. - Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado por o referido composto ter a seguinte fórmula

x G z G y



na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento,

y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e

z é P, A, S, Q ou L; e

63a. - Método para a profilaxia ou tratamento de infecções de HIV, caracterizado por compreender a administração a um animal ou ser humano necessitando dessa profilaxia ou tratamento uma composição compreendendo um anticorpo obtido contra uma mistura compreendendo compostos, em que esses compostos não são proteínas naturais do invólucro de HIV que, mas que possuem a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo cada um dos referidos compostos o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV; em que a referida composição contém de 0,5 a 10% de compostos activos.

64a. - Método de acordo com a reivindicação 63, caracterizado por os referidos compostos terem a fórmula seguinte:

x G z G y

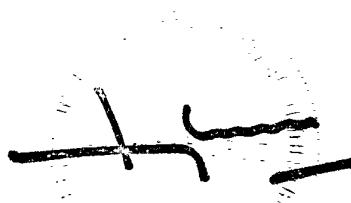
na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento

y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e

z é P, A, S, Q ou L; e

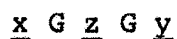
ou a, ou b mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b indi-



vidualmente podem compreender qualquer um dos seguintes; cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

65a. - Método para estimular uma reacção conducente à profilaxia de linfócitos caracterizado por compreender o tratamento de humanos necessitando de estimulação de uma reacção conducente à profilaxia de linfócitos com pelo menos um composto, que não é uma proteína natural do invólucro de HIV que ocorre naturalmente, possuindo o referido composto a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo o referido composto o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV; em que a referida composição contem de 0,5 a 10% de compostos activos.

66a. - Método de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o referido composto ter a fórmula



na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento,

y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e

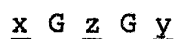
z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b individualmente podem compreender qualquer um dos seguintes;

cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

67a. - Método para o tratamento de infecção de HIV, caracterizado por compreender a administração a um animal ou ser humano necessitando de tal tratamento uma composição compreendendo um ou mais compostos em que estes compostos não são proteínas naturais de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo cada um dos referidos compostos o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV; em que a referida composição contem de 0,5 a 10% de compostos activos.

68a. - Método de acordo com a reivindicação 67, caracterizado por os referidos compostos ter a fórmula



na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento,

y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e

z é P, A, S, Q ou L; e

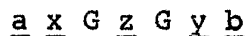
ou a, ou b mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b individualmente podem compreender qualquer um dos seguintes; cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização

principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

69a. - Método para testar um fluido biológico relativamente à presença de uma proteína específica de determinada variante de HIV, caracterizado por compreender

- (a) o contacto do referido fluido com um anticorpo específico para compostos que não são proteínas naturais do invólucro de HIV que ocorrem naturalmente, mas têm a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo os referidos compostos o domínio de neutralização principal, ou um dos segmentos, de uma variante de HIV; e
- (b) a detecção de complexos imunológicos como uma medida da referida variante no fluido referido.

70a. - Método de acordo com a reivindicação 69, caracterizado por os referidos compostos da parte (c) terem a fórmula



na qual

$\underline{x}$ tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento,

$\underline{y}$ tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e

$\underline{z}$ é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b individualmente podem compreender qualquer um dos seguintes; cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

71a. - Método de estimulação in vitro de linfócitos, caracterizado por compreender o tratamento de células linfóides de animais imunes com pelo menos um composto, que não proteínas naturais do invólucro de HIV que ocorrem naturalmente, possuindo o referido composto a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo o referido composto o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

72a. - Método de acordo com a reivindicação 71, caracterizado por o referido composto ter a fórmula



na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento,
y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e
z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b individualmente podem compreender um dos seguintes; cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal

de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.

73a. - Método para identificação de anticorpos monoclonais ou policlonais que são úteis na profilaxia ou terapia, caracterizada por compreender a triagem de células produtoras de anticorpos relativamente à capacidade de ligação a, pelo menos, um composto, que não proteínas naturais do invólucro de HIV que possuindo o referido composto a capacidade de induzir e/ou de se ligar com anticorpos neutralizantes, compreendendo o referido composto o domínio de neutralização principal, ou um seu segmento, de uma variante de HIV.

74a. - Método de acordo com a reivindicação 73, caracterizado por o referido composto ter a fórmula



na qual

x tem 0 a 13 aminoácidos de comprimento,

y tem 0 a 17 aminoácidos de comprimento; e

z é P, A, S, Q ou L; e

ou a, ou b, mas não ambos, podem ser omitidos; ou a, ou b individualmente podem compreender qualquer um dos seguintes: cisteína, uma proteína ou outra fracção capaz de intensificar a imunogenicidade, um peptídeo de um domínio de neutralização principal de HIV, um peptídeo capaz de estimular células-T, ou um agente estimulante do sistema imunitário em geral.



75a. - Gene sintético que codifica um polipeptídeo, caracterizado por o referido polipeptídeo compreender mais de um epítipo neutralizante de HIV.

76a. - Gene sintético que codifica um polipeptídeo, caracterizado por o referido polipeptídeo compreende epítipos neutralizantes de mais de um isolado de HIV.

77a. - Gene sintético de acordo com a reivindicação 76, caracterizado por o referido polipeptídeo compreender epítipos neutralizantes de 2 a 20 isolados de HIV.

78a. - Gene sintético de acordo com a reivindicação 76, caracterizado por um dos referidos epítipos neutralizantes ser do isolados de HIV designado HIV-MIN.

79a. - Gene sintético de acordo com a reivindicação 76, caracterizado por o referido polipeptídeo compreender epítipos neutralizantes isolados de HIV designados HIV-MN, HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-SC e HIV-WMjl.

80a. - Gene sintético de acordo com a reivindicação 76, caracterizado por as regiões que codificam epítipos neutralizantes de diferentes isolados de HIV estarem separados por espaçadores de aminoácidos.

81a. - Gene sintético de acordo com a reivindicação 80, caracterizado por os referidos espaça-

dores de aminoácidos serem glicinas.

82a. - Gene sintético de acordo com a reivindicação 76, caracterizado por o referido gene codificar um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos indicado no Quadro 13, ou uma sequência de aminoácidos equivalentes.

83a. - Gene sintético de acordo com a reivindicação 76, caracterizado por o referido gene codificar um polipeptídeo de fusão.

84a. - Gene sintético de acordo com a reivindicação 83, caracterizado por o referido gene codificar um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos indicado no Quadro 13A ou uma sequência de aminoácidos equivalente.

85a. - Processo para a produção de composto caracterizado por se incorporar no referido composto epítomos neutralizantes relativas a mais de um isolado de HIV.

86a. - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por se incorporar no referido composto compreender epítomos neutralizantes de 2 a 20 isolados de HIV.

87a. - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por um dos epítomos neutralizantes referidos ser do isolado de HIV designado HIV-MN.

88a. - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por se incorporar no referido composto epítomos neutralizantes de isolados de HIV designados por HIV-MN, HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-SC e HIV-WMjl.

89a. - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por os referidos epítomos neutralizantes estarem separados por espaçadores de aminoácidos.

90a. - Processo de acordo com a reivindicação 89, caracterizado por os referidos espaçadores de aminoácidos serem glicinas.

91a. - Processo de acordo com a reivindicação 89, caracterizado por se incorporar no referido composto a sequência de aminoácidos indicada na Tabela 13, ou uma sequência equivalente

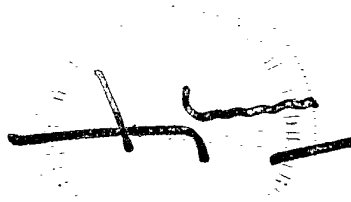


Tabela 13

IIIB

MetThrArgIleGlnArgGlyProGlyArgAlaPheVal GlyGlyGlyGly -

RF

SerIleThrArgGlyProGlyArgValIleTyr GlyGlyGlyGly -

MN

ArgIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

SC

SerIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

WMJ1

HisIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

LeuSerIleCys

92a. - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido composto ser um polipeptídeo de fusão.

93a. - Processo, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado por se incluir no referido composto a sequência de aminoácidos indicada na Tabela 13A, ou uma sequência de aminoácidos equivalente.

TABELA 13A

E.coli BG

MetLeuArgProValGluThrProThrArgGluIleLysLysLeuAspGlyLeuTrp -

AlaPheSerLeuAspArgGluArgValValArgTyrHisArgTrpIleArgGlnAlaSer -

IIIB

MetThrArgIleGlnArgGlyProGlyArgAlaPheVal GlyGlyGlyGly -

RF

SerIleThrArgGlyProGlyArgValIleTyr GlyGlyGlyGly -

MN

ArgIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

SC

SerIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

WMJ1

HisIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyr GlyGlyGlyGly -

LeuSerIleCys

94a. - Processo para a produção de uma composição profiláctica ou terapêutica, caracterizada por se incluir na referida composição imunoglobulinas, anticorpos monoclonais e/ou anticorpos policlonais gerados mediante imunização de um animal apropriado com uma composição que compreende um composto multi-epítopo, em que o referido composto multi-epítopo compreende epítomos neutralizantes de 2 a 20 isolados de HIV, em que um dos referidos é HIV-MN.

95a. - Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado por o referido composto multi-epítopo compreende epítomos neutralizantes dos designados HIV-MN, HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-SC e HIV-WMj1.

96a. - Processo para a preparação de anticorpos monoclonais ou policlonais neutralizantes amplos, caracterizado por compreender a imunização de um animal apropriado com uma composição compreendendo um composto multi-epítopo, em que o referido composto-multi-epítopo compreende epítomos neutralizantes de 2 a 20 isolados de HIV, em que um desses isolados é HIV-MN.

97a. - Processo de acordo com a reivindicação 96, caracterizado por o referido composto multi-epítopo compreende epítomos neutralizantes dos isolados de HIV designado HIV-MN, HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-SC e HIV-WMj1.

98a. - Método para a profilaxia ou terapia de infecção de HIV, caracterizado por compreender a administração a um animal ou ser humano necessitando dessa

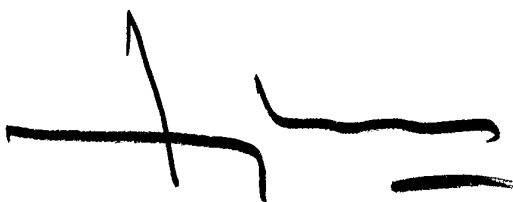
profilaxia ou terapia uma composição farmacêutica compreendendo imunoglobulina, anticorpos monoclonais e/ou anticorpos policlonais obtidos mediante imunização dum animal apropriado com uma composição compreendendo um composto multi-epítopo em que o referido composto compreende epítomos neutralizantes de 2 a 20 isolados de HIV, em que um desses isolados é HIV-MN, em que a referida composição contém 0,5% a 10% de compostos activos.

99a. - Método de acordo com a reivindicação 98, caracterizado por o referido composto multi-epítopo compreender domínios neutralizantes dos isolados de HIV designados HIV-MN, HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-SC e HIV-WMj1.

100a. - Processo para estimular uma reacção em humanos conducente à profilaxia de linfócitos caracterizado por compreender o tratamento de seres humanos necessitando de estimulação de uma reacção conducente à proliferação de linfócitos com uma composição compreendendo um composto multi-epítopo em que o referido composto compreende um domínio neutralizante de 2 a 20 isolados de HIV, em que um dos referidos isolados é HIV-MN; em que a referida composição contém 0,5 a 10% de compostos activos.

101a. - Processo de acordo com a reivindicação 100, caracterizado por o referido composto multi-epítipo compreender epítipos neutralizantes dos isolados de HIV designados HIV-Mn, HIV-IIIB, HIV-RF, HIV-SC e HIV-WMjl.

Lisboa, 3 de Outubro de 1989



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

FIGURA 1

Padrão de sequências comuns

KRKRIIIGPGRFYT

MM KKKKING OPO RAYTTT

KRKRHIGPGRFYTTK

6 V - N - - - - - | - - - -

7 T S R G - R - - - - - I L A - E

5 T - - G - F - - - - - N I - - - G

6 --QR-----V'-IG

$$A \quad T \quad \dots \quad TM \quad \dots \quad V_W^Y \quad \dots \quad C$$

1. $T = \frac{R}{K} = T_K = \frac{R}{V} V I = A - C$

5. $T \rightarrow G \rightarrow YV \rightarrow S \rightarrow \Lambda_K V \rightarrow \Pi$

$$4 \quad T = Q_2^R TP - L - Q_2^A L - \dots$$

DO1-1	V-M	---	---	M---
AF130-1-1	V-M	---	---	II---
KH1-1-1	V-M	---	---	II---
KH2-1-1	V-M	---	---	II---
PR1-1-1	V-M	---	---	II---
PR2-1-1	V-M	---	---	II---
PR3-1-1	V-M	---	---	II---

AF130-3	TSRQ-R	---	---	11A
EE5-8-1	TSBN-R	---	---	11A
EE5-10-1	TSRQ-R	---	---	11A
EE5-11-1	TSRQ-R	---	---	11A
EE5-2-1	TSRQ-R	---	---	11A
AF130-1-3	TSRQ-R	---	---	11A
WH2-1-2	TSRQ-R	---	---	11A

[	829-1-2	Y--O-F --- -W1--
	829-10-3	I--O-I --- -W1--
	829-11-1	Y--O-F --- -W1--
	829-11-1	Y--O-F --- -W1--
	829-6-1	Y--O-F --- -W1--

```

PCJ-6-1      --|--OR --- --V-
IIR (IHXZL)  --|--OR --- --V-
IIR (DILIO)  --K|--OR --- --V-
IAV-1 IAV    --V|--OR --- --V-
IIR (IHXZJ)  --K|--OR --- --V-
PCJ-6-1      --K|--OR --- --V-

```

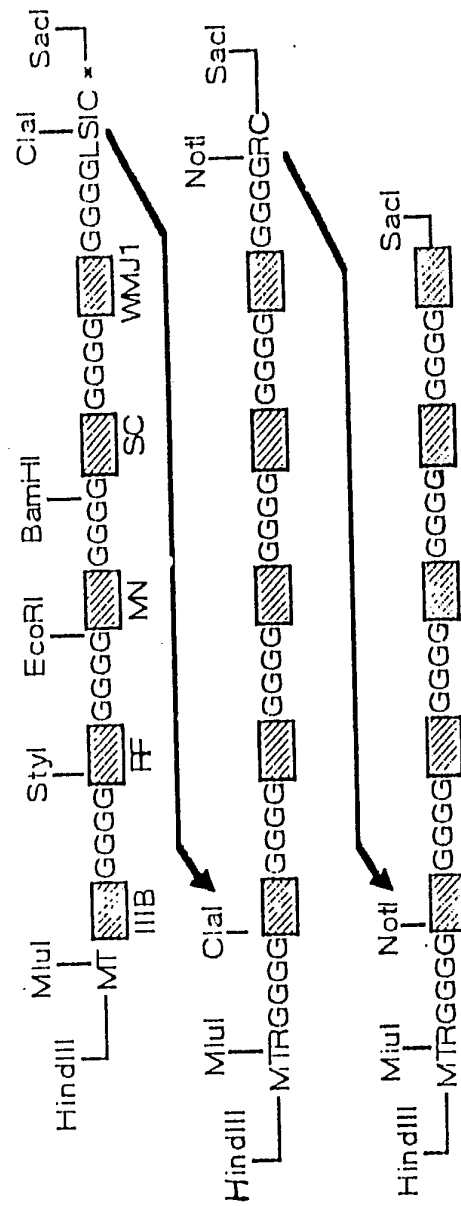
PMI-1-3	1---	TH	---	VY-
LCI-106-1	1---	TH	---	VY-
FCI-106-2	1---	TH	---	VY-

THJ-2-1 T-2-VTH -2-2-VH-

[PF		T----	TR	--	-VI-
[PF		T--O-	IN	--	-VI-
[TRL=70] : 1		----	IN	--	BVI:
[A1-A1] : 1		----	TR	--	BVI-

RES-8-1	Y-0-IV -0- -V-
RES-9-1	Y-0-IV -0- -V-
RF10-9-1	Y-0-IV -0- -V-
AF10-9-1	Y-0-IV -0- -V-
TH12-1	Y-0-IV -0- -V-
[AVEL]	Y-0 IV -L -Q-L
JY1	Y-0IV -L -Q-L
FS	Y-0IV -L -Q-L
RES-13-1	Y-0IV -L -Q-L

TABELA
CONSTRUÇÃO DE GENES MULTI-EPÍTOPO



☐ = XXXXGPGXXX para cada isolado diferente

Emparelhador oligos

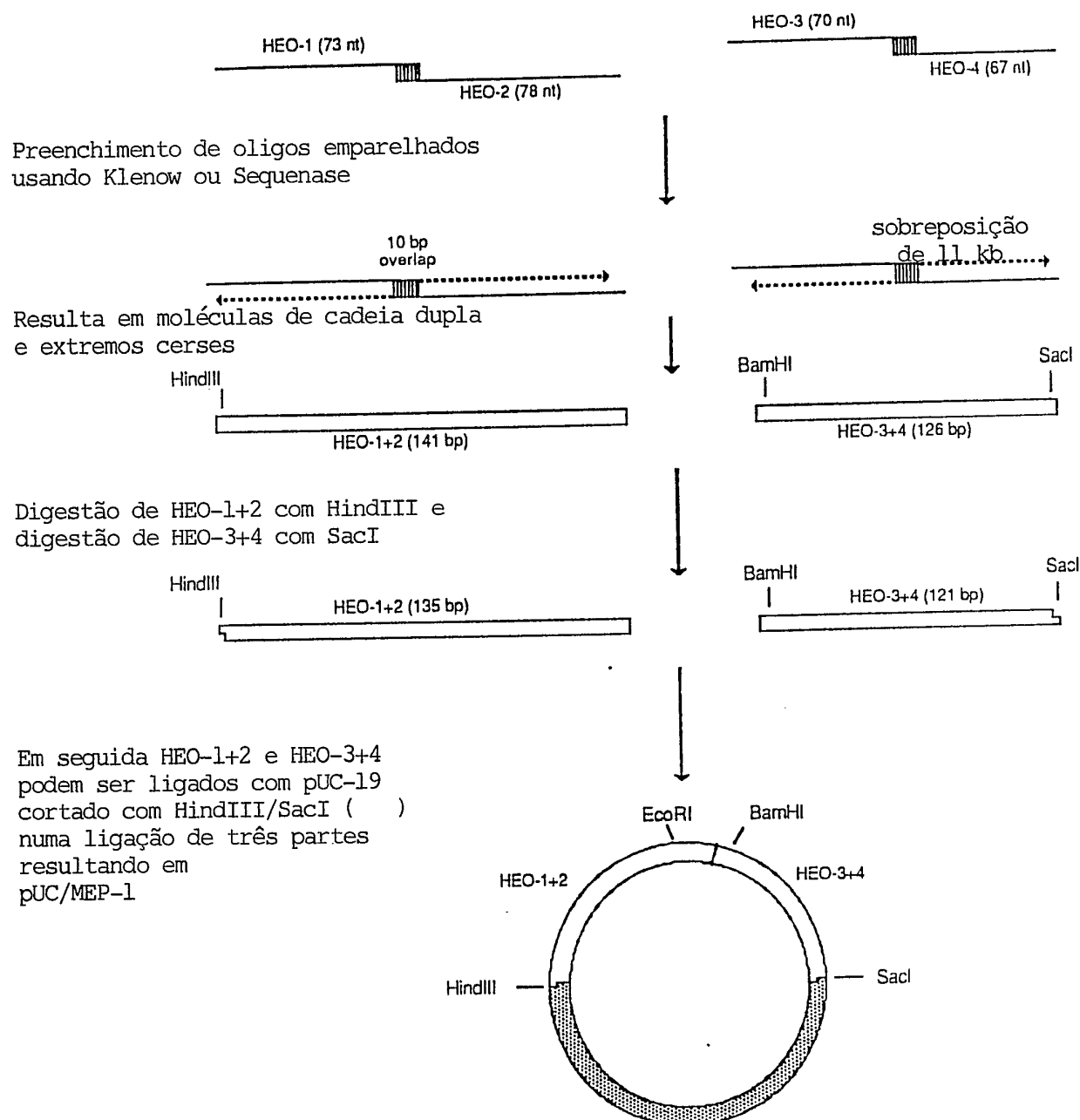


Figure 3

Oligonucleotídeos para a construção de um gene multi-
-epitopos

HEO-1

5' CAGTCAAGCT TCCATGACGC GTATCCAGCG TGGTCCGGGT 40
CGTGCTTTTG TTGGTGGCGG AGGCTCCATC ACC 3' 73

HEO-2

5' TAGAAGGCTC TTCCAGGTCC GATGTGAATT CGACCCCTC 40
CTCCGTAGAT AACCTTCCT GGTCCCTTGG TGATGGAG 3' 78

HEO-3

5' CGGTGGTGGA GGATCCATAC ATATAGGACC TGGAAGAGCA 40
TTTTATGGTG GAGGTGGTCA CATTACATC 3' 70

HEO-4

5' GACCGAGCTC AGCAAATCGA TAGGCCCCCT CCGCCGTAGA 40
AAGCACGACC CGGACCGATG TGAATGT 3' 67