

C12N 7/04 (2007.10) **C12N 15/64** (2007.10)
C12N 15/00 (2007.10) **C12N 15/09** (2007.10)
C12N 15/63 (2007.10) **C12N 15/70** (2007.10)
C12N 15/74 (2007.10) **C12P 19/34** (2007.10)
A61K 39/21 (2007.10) **C12N 7/00** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **1995.12.26**

(30) Prioridade(s): **1994.12.27 US 364600**

(43) Data de publicação do pedido: **1997.10.01**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.08.20**
229/2008

(73) Titular(es):

IMMUNOSCIENCE, INC.
COCKBURN HOUSE, COCKBURN TOWN,
GRAND TURK BWI/TC

TC

(72) Inventor(es):

SATEESH N. APTE

US

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **VACINAS E TERAPÊUTICAS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**
CONTENDO MUTANTES HIV-1 COM DEFEITOS DE REPLICAÇÃO COM DELEÇÃO DO NEF

(57) Resumo:

RESUMO

"VACINAS E TERAPÊUTICAS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA CONTENDO MUTANTES HIV-1 COM DEFEITOS DE REPLICAÇÃO COM DELEÇÃO DO NEF"

Actualmente, não existe tratamento imunológico específico utilizando vírus vivos para a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o qual é uma causa de uma síndrome clínica designada Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Foram feitas muitas tentativas anteriores de desenvolver vacinas para reforçar a resposta imune humoral contra o invólucro e as proteínas gag que têm sido uniformemente mal sucedidas devido a vários factores incluindo a propagação célula-a-célula do HIV e a sua destruição do sistema imune mediado por células do organismo devido ao seu efeito citopático e fatal nas células T_{helper} (CD4). A presente invenção descreve um método para criar um clone recombinante do vírus HIV com deleção do seu gene nef. A invenção descreve ainda um método para criar uma suspensão injectável de partículas de vírus e o protocolo de tratamento preferido para doentes infectados com o HIV. Também é descrito um protocolo para a prevenção da infecção por HIV do tipo selvagem. Acredita-se que a forma de realização preferida funciona eliminando o bloqueio da indução de mRNA de IL-2 e IFN_{γ} em células linfóides através da proteína nef, pelo desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células ao HIV através dos Linfócitos T citotóxicos (LTC) e por competição com o HIV do tipo selvagem por hospedeiros potenciais e, deste modo, aumentar a probabilidade de exposição do HIV do tipo selvagem, aumentando, desse modo, a probabilidade de

exposição do HIV do tipo selvagem a anticorpos humorais contra gp120, gp41 e proteínas gag.

DESCRIÇÃO

"VACINAS E TERAPÊUTICAS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA CONTENDO MUTANTES HIV-1 COM DEFEITOS DE REPLICAÇÃO COM DELEÇÃO DO NEF"

1. ÂMBITO DA INVENÇÃO

Esta invenção relaciona-se com o tratamento e prevenção do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) usando uma vacina viva de vírus HIV geneticamente modificado.

2. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA ANTERIOR

Tanto quanto é do conhecimento deste inventor, não existe qualquer técnica anterior que empregue uma invenção semelhante para tratamento ou prevenção.

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico primário da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). O HIV apresenta uma elevada variação genética, que resulta numa grande variedade de fenótipos biológicos exibidos por várias estirpes do vírus e também pela mesma estirpe do vírus num mesmo doente em alturas diferentes. A heterogeneidade fenotípica verifica-se nas cinéticas de replicação, susceptibilidade à neutralização com soro, resistência a fármacos anti-virais, indução de citopatogenicidade e especificidade na gama de células hospedeiras. Os dois principais subtipos HIV-1 e HIV-2 são membros de um grupo de lentivírus de primatas humanos e não humanos, estreitamente relacionados, os quais são retrovírus de RNA.

A infecção pelo HIV conduz à deterioração progressiva do sistema imune mediado por células, tornando a vítima susceptível a uma variedade de infecções oportunistas tais como pneumonia por *pneumocystis carinii* (PPC) e tumores, tais como sarcoma de Kaposi (SK). Sabe-se que o mecanismo de destruição do sistema imune é o efeito citopático do HIV em linfócitos T_{HELPER} CD4⁺, os quais são instrumento para o funcionamento adequado da imunidade mediada por células.

Inicialmente, a infecção pelo HIV e a SIDA envolviam homens homossexuais, consumidores de drogas intravenosas e hemofílicos nos Estados Unidos e na Europa. No entanto, a infecção de heterossexuais tornou-se comum e galopante em África (particularmente no Ruanda, Burundi, Zaire e Quênia), Brasil, Índia, Birmânia e Tailândia. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, estima-se que mais de 10.000.000 de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com o HIV. Os dados disponíveis indicam que quase todos estes indivíduos infectados podem morrer por falta de tratamento eficaz.

A resposta humoral com anticorpos mediada por linfócitos B é normalmente forte em indivíduos infectados, com títulos de anticorpos elevados nos infectados com as proteínas do invólucro gp120, gp41 e proteínas gag p24, p17 e p15. Infelizmente, isto não fornece qualquer protecção contra a infecção continuada e severa e progressão da doença devido principalmente à transmissão célula-a-célula da infecção e à inibição dos linfócitos T citotóxicos, talvez pela inibição da sinalização da IL-2 (inter-leucina 2). Os Institutos Nacionais de Saúde dos EUA abandonaram recentemente os ensaios da fase III e da fase IV de vacinas derivadas de várias proteínas virais do HIV devido aos

resultados decepcionantes nas fases anteriores. Do mesmo modo, a resposta celular contra o HIV é forte no início com um aumento dos linfócitos T citotóxicos (LTC) ("killer"). Infelizmente, isto colapsa pouco depois da infecção devido a variações genéticas nos epitopos gag dos LTC, o que permite que o vírus escape ao reconhecimento pelos LTC (Phillips RE et al; Nature 345:453, 1991).

Vários fármacos foram também aprovados para o tratamento da infecção pelo HIV tais como zidovudina, a qual interfere com a sequência de nucleótidos do vírus. Embora se tenha pressentido ser muito promissor nas fases mais precoces, o desenvolvimento de resistência a esses fármacos provocou uma enorme decepção e frustração.

Foram reivindicadas muitas outras abordagens. O Professor Jonas Salk, no seu comentário na Nature referiu que à medida que a doença progride, os títulos de anticorpos contra a gp41 e anticorpos neutralizantes de vírus permanecem constantes, mas o nível de anticorpos anti-p24, que se correlaciona com a presença de citotoxicidade de células dependente de anticorpos (ADCC) e os anticorpos contra a transcriptase reversa, diminuem. Ele propôs o tratamento de doentes sintomáticos infectados com HIV com soros de doentes assintomáticos infectados com HIV. Ele admitiu também a hipótese de que os imunogénios do HIV fornecidos a doentes infectados com HIV poderiam ser protectores. (Salk J; Prospects for the control of AIDS by immunizing seropositive individuals. Nature 327:473-476, 1987).

Vírus vivos atenuados e viriões mortos foram colocados como hipóteses mas até agora nenhum investigador os testou para

prevenção ou tratamento da infecção pelo HIV em humanos, de forma significativa.

O SIV (vírus da imunodeficiência dos símios) é um lentivírus dos primatas com várias estirpes que afectam os macacos verdes Africanos, macacos macaque, macacos mangabeis, macacos reshus e chimpanzés. A infecção pelo SIV em macacos é amplamente usada para estudar a fisiologia e patologia dos lentivírus dos primatas. Foram feitas muitas pesquisas tentando infectar macacos com mutantes do SIV criados artificialmente para determinar a sua infecciosidade relativa. Muitos destes estudos focaram-se no papel do gene *nef* na fisiologia do ciclo de vida do vírus. O gene *nef* está presente em todos os lentivírus de primatas sequenciados até à data. O gene consiste numa grelha de leitura aberta que começa na extremidade 3', ou imediatamente depois da extremidade 3', do gene *env* e sobrepõe-se à porção U3 da repetição terminal longa 3'. O gene era anteriormente designado F,3'-orf ou B-orf. Expressa-se *in vivo* conforme determinado por anticorpos contra produtos do gene *nef* em indivíduos infectados. Luria *et al* demonstraram que pelo menos alguns produtos do gene *nef* bloqueiam a indução do mRNA de IL-2 (interleucina 2) nas células linfóides activadas por agentes activantes PMA, PHA e/ou anticorpos contra CD3, TCR ou CD2 (Luria S, Chambers I, Berg P; Proc Natl Acad Sci USA 88:5326, 1991). Kestler *et al* verificaram a rápida reversão das mutações pontuais do codão stop no *nef* para formas abertas *in vivo*, demonstrando pressão selectiva para formas abertas, presumivelmente formas funcionais do *nef*. (Kestler HW *et al*; Cell, 65:651, 1991). Demonstrou-se ainda que o *nef* é necessário para a replicação vigorosa do vírus em macacos rhesus, para manter cargas virais normais e para a indução

da doença. Os animais inoculados com mutantes com deleção do *nef* permaneceram livres da doença ao longo de pelos menos 3 anos enquanto que todos os animais infectados com o vírus do tipo selvagem desenvolveram SIDA e morreram. Demonstrou-se também que a deleção do *nef* aumenta a replicação viral mas foi postulado que as respostas à deleção do *nef* são diferentes *in vivo* e *in vitro* (Gibbs JS e Desrosiers RC in Human Retroviroses. Cullen BR, ed, Oxford University Press, NY, 1993).

O documento WO 92 00987 A descreve o uso de lentivírus infecciosos, não-patogénicos de primatas, no qual o gene *nef* foi manipulado de modo a ser uma mutação nula não-reversível, grupo esse incluindo o HIV. Demonstrou-se que esses vírus infecciosos não patogénicos são capazes de desencadear uma resposta imune protectora e, deste modo, são úteis como vacinas contra a SIDA em indivíduos humanos.

Daniel, M.D. et al, Science, vol. 258, 1991, p. 1938-1941, descrevem o uso de SIV vivo atenuado como vacina. Este vírus contém uma deleção no gene *nef*, cujo efeito foi que macacos vacinados com este SIV atenuado ficassem totalmente protegidos. Discute-se um possível papel dos linfócitos T citotóxicos para tal. Discute-se o possível uso da vacina viva atenuada para proteger seres humanos contra a SIDA.

A WO 95 21912 A descreve a sequência do isolado HIV-1 C18MBC, o qual se caracteriza pela deleção e rearranjo da sequência da região U3 5'-LTR e a deleção da sequência do gene *nef*. É ainda referido que a ausência de sintomas típicos de SIDA do doente, a partir do qual se obteve o isolado, é atribuída aos efeitos da perda da LTR e/ou da perda das sequências de codificação do *nef*.

Deste modo, tornou-se o primeiro objecto desta invenção, produzir uma suspensão terapêutica de acordo com a reivindicação 1 utilizando tecnologia recombinante em que uma porção substancial do gene *nef* é apagada preservando, no entanto, as restantes grelhas de leitura aberta, especialmente *tat*, *pol*, *gag*, *env* e *vpr*.

É um objecto adicional desta invenção injectar doentes infectados com HIV com este vírus recombinante com deleção do *nef* e proporcionar uma cura por um ou mais meios

a) permitindo a produção normal de IL2 e IFN γ nas células THELPER activando assim os linfócitos B e os linfócitos T citotóxicos (LTC) ("killer") para reconhecer as células que exibem antigénio do HIV,

b) activando, estimulando e mantendo continuamente uma resposta imune mediada por células contra o HIV do tipo selvagem via Linfócitos T citotóxicos (LTC).

c) e competindo com o HIV do tipo selvagem por potenciais hospedeiros e aumentando assim a probabilidade de exposição do HIV do tipo selvagem aos anticorpos humorais contra gp120, gp41 e proteínas *gag*.

O segundo objecto desta invenção é proporcionar imunização profilática de acordo com a reivindicação 2 em indivíduos de alto risco tais como trabalhadores do sexo comercial através do tratamento com o vírus mutante com deleção do *nef*, o qual é tema desta invenção proporcionando uma linha de linfócitos T citotóxicos com especificidade para células que expressam qualquer uma das proteínas do HIV e que poderiam criar uma linhagem de LTC de memória semi-permanente de longa duração. A infecção por HIV do tipo

selvagem poderá, nestes indivíduos ser tratada rapidamente, eficazmente e efectivamente.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO



Foi construído um clone recombinante do isolado HIV-1_{ELI} com a sua grelha de leitura aberta do *nef* deletada, a partir de um vector plasmídeo por clivagem com endonuclease nos locais Nco I e Xho I e preenchendo as extremidades abertas com um oligonucleótido. O DNA plasmídico resultante foi examinado e transfectado usando dextrano DEAE na linha celular HuT 78. A propagação do vírus HIV foi confirmada monitorizando as proteínas gp41, p24, p17 e p15, monitorizando a actividade da transcriptase reversa e pela identificação dos viriões por microscopia electrónica. As partículas de vírus foram separadas do meio sobrenadante e congeladas em azoto líquido até serem usadas. Para o tratamento da infecção por HIV, após os procedimentos base de diagnóstico incluindo a confirmação da infecção por HIV e contagens das células CD4-CD8, um teste de pele para reacção alérgica e um consentimento informado, cerca de 200.000.000 de partículas de vírus serão injectadas por via intravenosa. Isto será seguido de monitorização das contagens de CD4 duas vezes por mês e uma dose de reforço com outras 200.000.000 partículas de vírus, por via intravenosa. Isto será seguido de monitorização mensal das contagens de CD4 durante um ano. De acordo com a invenção, é esperado que os doentes tenham uma contagem normal de CD4 em 6-9 meses e que tenham os sistemas imunitários restabelecidos em 1 ano. Para prevenção da infecção por HIV do tipo selvagem nas populações de alto risco, serão injectadas, por via subcutânea, aproximadamente 1.000.000 de partículas de vírus, sendo os indivíduos observados por

um período de tempo suficiente para garantir a ausência de efeitos desagradáveis tais como uma reacção anafiláctica. A imunidade nesta população será verificada por seroconversão e a infecção por HIV do tipo selvagem pode ser diagnosticada utilizando ensaios imunoabsorventes ligados a enzima para detecção de anticorpos contra produtos do gene *nef*.

DESCRIÇÃO DA FORMA DE REALIZAÇÃO PREFERIDA

Células HuT 78, uma linha de células linfóides humanas foi obtida da American Type Culture Collection (Rockville MD) e propagada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco, Grand Island, NY) contendo 10% de soro de vitelo (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) aquecido (56°F, 30 minutos) e 10% de interleucina 2 - um factor de crescimento das células T (Meloy laboratories, Springfield, VA). As células foram cultivadas em placas de cultura de tecidos em plástico (Falcon) e transferidas usando tripsina com EDTA (Gibco, Grand Island, NY). Esta linha celular foi inoculada com células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de um doente de SIDA infectado com a estirpe HIV-1_{ELI}. As PBMCs foram primeiro preparadas por bandejamento em Ficoll-diatrizoato (densidade 1,077 até 1,080 g/mL a 20°C) (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia). As PBMCs foram lavadas com meio RPMI 1640, estimuladas durante 5 dias com 1 µg/mL de fitohemaglutinina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) e lavadas para retirar toda a fitohemaglutinina antes da inoculação. Usaram-se as técnicas de clonagem molecular conforme descrito por Maniatis T, Fritsch, EF et al (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Usando uma endonuclease de

restrição não-cortante do HIV-1_{ELI} (New England Biolabs, Beverly, MA) a partir do DNA celular total da linha celular infectada, o DNA pró-viral integrado com sequências celulares flanquiadoras foram clonados no local Xba I do bacteriófago J1 (Promega Biotec, Madison, WI) dando origem a um clone de fago recombinante λ HXELI. Construiu-se um vector SP65gpt ligando o fragmento Bam HI-Pvu II do plasmídio pSV2gpt aos locais Bam HI-Pvu II do SP65 (Promega Biotec, Madison, WI). Um fragmento Hpa I-Xba I de 12,5 quilobases (Kb) do clone λ HXELI foi embotado nas extremidades com fragmento Klenow de DNA polimerase I e clonado nos locais Bam HI até Eco RI, igualmente embotados nas extremidades, do vector SP65gpt. O clone resultante HXELIgpt tinha o HIV-1_{ELI} e as sequências de xantina guanina fosforibosil transferase (gpt) com orientação transcricional idêntica. O pró-vírus contendo o vector plasmídio foi digerido com endonucleases de restrição Nco I (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Germany) e Xho I (New England Biolabs, Beverly, MA) seguido de enchimento das extremidades com um oligonucleótido construído num sintetizador Biosearch Cyclone, transcriptase reversa e dNTPs, seguido por ligação das extremidades embotadas. Os plasmídios foram examinados por electroforese em géis de agarose a 0,8% (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) em relação aos derivados de HXELIgpt contendo a deleção do *nef*. As coordenadas exactas da deleção foram confirmadas por sequenciamento de DNA com inibidores da terminação da cadeia de DNA polimerase - análogos de 2',3'-dideoxi e arabinonucleósido do deoxinucleósido trifosfato normal (o ddCTP foi obtido da Collaborative Research, Inc., Waltham, MA, araATP e araCTP foram obtidos da P-L Biochemical, Inc. Milwaukee, WI) conforme descrito por Sanger, F, Nicklsen, S et al (Proc Natl Acad of Sci 74:5463-5467, 1977). O DNA

Heteroduplex foi submetido a precipitação com etanol e ressuspendido em água esterilizada. Prepararam-se diluições seriadas do DNA até ao volume final de 80 micL. A cada amostra de DNA foram adicionados 20 µL de dextrano DEAE (peso molecular 5×10^5) obtido da Pharmacia numa concentração de 2 mg/mL após esterilização por autoclavagem e 100µL de meio de Eagle modificado por Dulbecco sem soro concentrado duas vezes (Gibco, Grand Island, NY). As células HuT 78 descritas acima foram transferidas para placas novas 24 horas antes da transfecção para garantir um crescimento exponencial. Estas células em crescimento foram removidas das placas com tripsina a 0,1 % com EDTA (Gibco, Grand Island, NY) em tampão Tris salino isotónico a pH 7,2 (Sigma Chemicals, St Louis, MO), misturadas com meio de Eagle fresco modificado por Dulbecco contendo soro de vitelo aquecido conforme descrito acima para inactivar a tripsina e contadas com um contador Coulter. Adicionaram-se 6×10^5 células a 2 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco contendo soro em tubos de plástico transparente de 12 mm x 75 mm (Falcon #2058). Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm durante 1 minuto. O meio foi retirado cuidadosamente usando uma pipeta com aspirador. Adicionou-se a cada tubo uma amostra de 100 µL da diluição de DNA. Os tubos foram agitados cuidadosamente e transferidos para uma incubadora de CO₂ a 37°C durante 1 hora. O suporte foi agitado cuidadosamente a cada 15 minutos. No final da incubação, adicionaram-se a cada tubo 2 mL de meio de Eagle fresco modificado por Dulbecco contendo soro de vitelo aquecido conforme descrito acima, os tubos foram agitados, centrifugados e o meio foi aspirado conforme descrito acima. As células foram então ressuspendidas em 2 mL de meio de Eagle fresco modificado por Dulbecco contendo soro

de vitelo aquecido conforme descrito acima e incubadas a 37°C numa incubadora de CO₂ a 5%. As culturas foram monitorizadas quanto ao aparecimento de produtos de gag e env HN-1 p17, p24 e gp41, à actividade da transcriptase reversa e aos viriões conforme observado por microscopia electrónica como é rapidamente conhecido pelos conhecedores da técnica. O sobrenadante contendo o vírus das culturas foi filtrado através de um filtro millipore (tamanho do filtro 0,45 µm, Millipore Corp., Bedford, MA) e colocado em frascos esterilizados de modo a conterem cerca de 200.000.000 de partículas de viriões por mL. Os frascos esterilizados foram armazenados em azoto líquido.

EXEMPLO 1

Dois voluntários (S1 e S2), ambos trabalhadores do sexo comercial na Índia ficaram HIV positivos em 1989. Desde então, ambos têm tido um processo de declínio com diarreia, perda de peso, infecções por cândida e CMV. As suas contagens de CD4 foram 327 e 258 respectivamente. As famílias e os amigos de ambos abandonaram-nos devido à sua infecção por HIV e eles ficaram praticamente sem qualquer estrutura de apoio. Após um consentimento detalhadamente informado e uma discussão aprofundada relativamente a todos os riscos envolvidos no uso da presente invenção, estes indivíduos foram submetidos a testes físicos, de confirmação Western Blot para confirmar o estado do HIV, contagem basal das células CD4-CD8 e um teste de pele de sensibilidade à suspensão viral, ambos receberam por via intravenosa 1 mL da suspensão viral recombinante contendo aproximadamente 200.000.000 de partículas de vírus por via intravenosa. Os doentes foram mantidos em quarentena em instalações isoladas e todo o pessoal que entrou em

contacto com eles usou medidas de precaução contra doenças transmissíveis. As contagens de CD4 dos doentes foram registadas um mês após a primeira injeção e foi-lhes administrada uma segunda injeção de dose igual, por via intravenosa. As suas contagens de CD4 foram registadas novamente, 4-6 semanas após o reforço. Os doentes começaram a ganhar peso aproximadamente 4-6 semanas após a primeira injeção e as suas contagens de CD4 aumentaram conforme mostrado na tabela junta. Eles tornaram-se assintomáticos ao fim de 3 e de 4,5 meses respectivamente.

	Antes da vacina	Após a vacina e reforço
Doente S1	240/mm ³	1051/mm ³
Doente S2	385/mm ³	1233/mm ³

EXEMPLO 2

100 ratinhos com SCID (Síndrome da Imunodeficiência Combinada Severa) com transplante de sistema imune humano foram separados num grupo de controlo e num grupo experimental, com 50 ratinhos cada. O grupo experimental foi infectado com uma injeção intravenosa de 1 milhão de viriões do vírus com deleção do *nef*, objecto da forma de realização preferida. Um mês após esta injeção, ambos os grupos foram infectados com viriões HIV-1 do tipo selvagem e linfócitos infectados. Um mês após a injeção sacrificaram-se 10 ratinhos de cada grupo e os seus tecidos linfóides foram examinados. O exame patológico revelou uma perda acentuada de células dendríticas foliculares, formações de sincícios consideráveis e o sangue periférico com uma redução média de 38,6 % na contagem de células CD4 no grupo controlo. O grupo experimental revelou alterações

patológicas mínimas e uma redução não significativa nas contagens de células CD4. Depois de passarem mais 2 meses, 58% dos animais no grupo de controlo estavam mortos como resultado da imunodeficiência causada pela infecção por HIV-1 do tipo selvagem, enquanto que nenhum dos animais no grupo experimental morreu em resultado da imunodeficiência. Esta observação é estatisticamente significativa ($p < 0,001$). 20 animais do grupo experimental foram novamente infectados com HIV-1 do tipo selvagem conforme descrito acima e mais uma vez, não houve resposta patológica.

Uma vez que se verificou que o vírus recombinante que é objecto desta invenção é não patogénico e proporciona imunidade em relação aos efeitos citotóxicos sobre CD4 do HIV do tipo selvagem conforme descrito acima, é estabelecido o protocolo seguinte para profilaxia contra a infecção por HIV do tipo selvagem em indivíduos de alto risco:

1. Um exame físico e educação aprofundados em relação à infecção por HIV.
2. Uma discussão pormenorizada dos riscos da profilaxia com vírus HIV recombinante com deleção do *nef* e obtenção de um consentimento informado. A discussão deve incluir a incapacidade de diagnosticar infecções por HIV do tipo selvagem a partir de testes padrão e a necessidade de realizar um ELISA especial (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima) para detectar anticorpos contra a proteína *nef*.
3. Aproximadamente 1.000.000 de partículas de vírus suspendidas em 0,5 mL para serem administrados por via subcutânea.

4. Os indivíduos serão observados durante o tempo suficiente para garantir a ausência de reacções desagradáveis tais como uma reacção anafiláctica.
5. A seroconversão será monitorizada em relação ao sucesso da resposta imune ao vírus recombinante.

CONCLUSÃO, RAMIFICAÇÕES E ÂMBITO

Apesar de apenas ter sido descrito um uso potencial de um retrovírus recombinante, o princípio da invenção tem muitas implicações que se estendem mais além. O princípio pode ser largamente usado para a prevenção e tratamento de outras infecções retrovirais tais como leucemia causada por vírus HTLV. Podem existir outros retrovírus patogénicos que ainda não foram descobertos, nos quais se poderia usar este princípio. É certamente provável que esta invenção possa ser modificada de modo a alterar a localização e extensão da deleção do gene e/ou expandir os locais das deleções. Também é exequível criar uma deleção de gene semelhante usando métodos alternativos aos descritos na forma de realização preferida da invenção acima.

Lisboa, 11 de Novembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Suspensão terapêutica para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em humanos compreendendo partículas virais de HIV-1_{ELI} isoladas e purificadas com falta do **nef**, preparadas a partir de células transfectadas com um clone molecular HIV-1_{ELI} recombinante com uma deleção do **nef** entre os locais de clivagem pela endonuclease **Nco** I e **Xho** I, em que as referidas partículas virais são suspendidas num diluente farmacêuticamente aceitável e a referida suspensão funciona de modo a aumentar ou restabelecer as contagens de CD4 em indivíduos infectados com HIV.
2. Uso de uma suspensão terapêutica compreendendo partículas virais de HIV-1_{ELI} isoladas e purificadas com falta de **nef**, preparadas a partir de células transfectadas com um clone molecular HIV-1_{ELI} recombinante com uma deleção do **nef** entre os locais de clivagem pela endonuclease **Nco** I e **Xho** I, em que as referidas partículas virais são suspendidas num diluente farmacêuticamente aceitável, para a preparação de um medicamento para aumentar ou restabelecer as contagens de CD4 em indivíduos infectados com vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Lisboa, 11 de Novembro de 2008