

Memória descritiva referente à patente de invenção de HEM Research, Inc., norte-americana, (estado: Maryland), industrial e comercial, com domicílio em 12220 Wilkins Avenue, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos da América, (inventor: William A. Carter, residente nos Estados Unidos da América), para "PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) MEDIANTE A UTILIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE RNase L".

Memória descritiva

Ease Geral do SIDA

O SIDA (Síndrome de imunodeficiência adquirida) representa uma das maiores ameaças à saúde pública do século XX. Por causa da sua natureza biológica variável, dos seus meios súbtis de difusão de indivíduo para indivíduo e do seu período de doença "latente" que desafia até a detecção eficaz da sua presença, o SIDA rapidamente se tornou num dilema epidemiológico de proporções sem precedente. Na realidade, mesmo com os meios consideráveis já postos à disposição para aumentar as capacidades de diagnóstico, as tecnologias disponíveis ainda são bem pequenas para responder às necessidades de maneira a que se possa obter um controlo firme deste problema dentro de qualquer sector da população, p. ex., ver as Actas dum Simpósio intitulado "Experience with HTLV-III Antibody Testing, an Update on Screening, Laboratory and Epidemiological Correlations", patrocinado por Center for Drugs and Biologics, FDA, National Institutes of Health e Centers for Disease Control, realizado em 31 de Julho de 1985 nos National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; ver também



Budiansky, S. em Nature, volume 316 página 96, 11 de Julho de 1985.

Existem várias designações diferentes para o vírus da imunodeficiência humana (HIV); LAV é a designação para o vírus do SIDA isolado no Instituto Pasteur, Paris, França e HTLV-III é a designação para o vírus isolado no National Institute of Health, Bethesda, Maryland, E.U.A.. Na presente memória descritiva o vírus será frequentemente referido genericamente ou designado por HTLV-III ou LAV ou HIV sem intenção de se diferenciar entre eles. Além disso o termo "HIV" na presente especificação inclui todos e quaisquer outros vírus que se poderão associar como causadores do SIDA, quer já isolados ou não. HIV no singular quer dizer que inclui qualquer dos tipos de HIV sem se ter em conta os seus conteúdos genómicos. De forma similar os sintomas do SIDA serão referidos genericamente incluindo sintomas causados pelo HIV (como definido acima), os ARC ou complexos relacionados com o SIDA, o síndrome de linfadenopatia (LAS) e outros vírus causadores de condições substancialmente similares clinicamente.

O SIDA segue a deterioração pregressiva do sistema imunitário causado pela infecção com o vírus de imunodeficiência humana, HIV. Nos primeiros momentos da doença a imunidade mediada por intermédio celular fica danificada pela perda de células T (derivado de timo), as quais expressam o chamado antigénio T4, um subconjunto de células T consistindo principalmente em adjuvante T e células indutoras. A deficiência em células T4 pode conduzir a várias deficiências na imunidade mediada por intermédio celular, incluindo deficiências em células destruidoras naturais (natural Killer cell = NK), em células destruidoras activadas por linfoquina (lymphokine activated killer cell = LAK) e em células T citolíticas. Existem também insuficiências de células B (derivadas de medula de óssea) no SIDA.

O SIDA parece ser uma doença progressiva, apesar do ritmo de transição de uma fase para outra poder ser variável. Estas fases foram classificadas. Existem indivíduos assintomáticos infectados pelo HIV (seropositivos), como demonstra a presença de anticorpos em circulação contra o vírus (M.G. Sarngadharan et al., Science, volume 224, p. 506, 1984). Se não têm mais

quaisquer sintomas, estes pacientes são designados como pacientes no estágio WR1 pela classificação Walter Reed (R.R. Redfield et al., New England Journal of Medicine, volume 314, p. 131, 1986). Este estágio também foi denominado por pré-ARC (ARC = complexo relacionado com SIDA) apesar de alguns destes indivíduos poderem nunca vir a desenvolver sintomatologia ARC. Alguns destes pacientes podem desenvolver linfadenopatia (WR2) e apresentam uma deficiência de células T4 (WR3). Em seguida, a capacidade dos linfócitos para suportar uma proliferação estimulada por antígenos e a produção de interferão gama estimulada por antígenos diminuem e estes pacientes WR4 começam a perder hipersensibilidade cutânea retardada. Os pacientes WR5 são usualmente anergéticos. Estes pacientes apresentam infecções de herpes Zoster, candidíase oral (aftas) ou sintomas de ARC, os quais incluem febres prolongadas, suores nocturnos, fadiga, diarreia e/ou perda de peso. Este período de ARC é normalmente também caracterizado por decadência progressiva da imunidade. Finalmente, os indivíduos WR6 experimentam infecções oportunistas que constituem o SIDA "maduro" em que 50% dos pacientes morrem em 12 meses (H.W. Murray et al., New England Journal of Medicine, volume 310, p. 883, 1984).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

São descritos inibidore(s) dirigidos para HIV da via de defesa antiviral 2'-5' natural. O resultado destas investigações é pertinente para um novo diagnóstico e/ou modalidade de tratamento para uma variedade de afecções (p. ex. herpes, infecções por retrovírus, etc) e/ou de condições potencialmente cancerosas.

O sistema sintetase de 2-5A (2'-5'-oligoadilenatos) /RNase L induzido por interferão L é uma parte do mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções virais. Alguns elementos desse sistema incluem (i) a sintetase de 2-5A dependente de ARNdc, (ii) 2-5A endógeno e (iii) uma endoribonuclease dependente de 2-5A (RNase L). Uma deficiência em qualquer destes elementos das vias da sintetase 2-5A/RNase L resultará na abolição completa ou parcial do efeito antiviral.



Foram encontrados níveis elevados de síntese 2-5A em soro e em células mononucleares de sangue periferal (PBMC) de humanos com algumas infecções virais ou humanos submetendo-se a terapia de interferões. A indução de sintetase 2-5A em PMBC, assim parecia possuir um valor de diagnóstico potencial, apesar de limitado. Além disso, os altos níveis de sintetase 2-5A em PBMC indicam um estado avançado da doença em alguns dos desarranjos virais mas em contraste são um sinal de terapia de interferões efectiva em outras infecções virais. Foram encontrados interferões no soro de pacientes do SIDA, mas todavia mostrou-se uma elevação persistente de sintetase 2-5A para indivíduos cujo estado está em progressão de ARC para SIDA. Estas enormes discrepâncias entre os resultados laboratoriais e clínicas poderiam ser explicadas se outros elementos do sistema sintetase de 2-5A/RNase L, como 2-5A intracelular ou RNase L, fossem consideradas não funcionais. Para se explorar esta possibilidade requerer-se-ia a caracterização do 2-5A sintetizado in vivo e da acção RNase L, como relato pormenorização em seguida.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

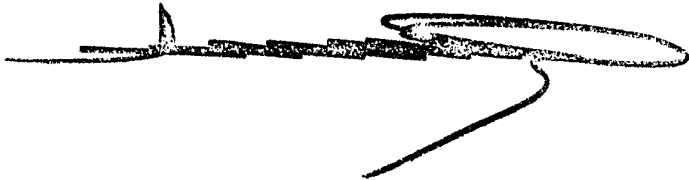
A presente invenção é seguidamente descrita com referência aos desenhos junto, nos quais:

A FIGURA 1 é uma fotografia de uma placa de electroforese com gel de poliacrilamida mostrando a activação de RNase L por 2-5A extraído de extractos de humanos PBMC com LAC, ARC ou SIDA como determinado por ensaio de cisão de ARN ribossomal;

A FIGURA 2 é uma fotografia de uma placa de electroforese de gel mostrando a activação do nível de RNase L em extractos de PBMC como determinado pelo ensaio de cisão de ARN ribossomal;

A FIGURA 3 é uma fotografia de uma placa de electroforese de gel, que mostra a restauração da actividade de cisão de ARN ribossomal em PBMC; e

A FIGURA 4 é um mapa de corrente ilustrando o caminho da oligadenilato/RNase L 2'-5'.



DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Foi descoberta uma substância inibidora, liberta feita libertar por células infectadas por vírus da imunodeficiência humana. Este inibidor parece ligar-se à enzima RNase L, provocando o produto da via 2'-5'-oligoadenilato/RNase L o funcionamento deficiente de todo o sistema imunitário e permitindo ao HIV multiplicar-se incontrolavelmente. Descrevem-se técnicas para identificar estes inibidores, directa ou indirectamente, pela falta de RNase L ou pela inactividade da RNase L ou pela presença de inibidores de intermediários bioquímicos na via 2'-5'A/RNase L, servindo o inibidor(es) como marcador para detectar a presença de HIV ou de vírus relacionados apresentando condições clínicas substancialmente similares.

É também discutido o significado como prognóstico deste marcador com respeito ao desenvolvimento da SIDA madura em pacientes, particularmente naqueles que possuem anticorpos a um HIV no sangue periférico e em tecidos incluindo sangue, em fracções de sangue, em células de órgãos transplantados e em extractos de células. São descritos procedimentos para activar a RNase L e/ou para remover ou inactivar a substância inibidora da RNase L. Fazem parte da presente invenção processos para a preparação de agentes terapêuticos para tratamento da SIDA e vírus relacionados e para controlar o progresso de tais vírus pela activação de RNase L e/ou pela remoção ou inactivação da(s) substância(s) inibidoras de RNase L ou vírus dirigidos para inibidores. Estão incluídos na presente invenção os procedimentos para preparação de anticorpos para estes vírus quer in vivo quer in vitro utilizando como antigénio um inibidor específico de RNase L ou inibidores de intermediários bioquímicos na via 2'-5'A/RNase L dirigidos contra vírus.

Os constituintes da via antiviral sintetase de 2-5A/RNase L foram medidos em extractos de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de humanos com linfadenopatia (LAS), complexo relacionado com SIDA (ARC) e síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). O nível de sintetase de 2-5A demonstrou ser altamente elevado em humanos com SIDA e a um nível basal em



indivíduos com ARC ou LAS. De qualquer modo, independentemente das variações na sintetase de 2-5A (2-5A), foram detectadas altas concentrações de 2-5A (acima de 35 nM) em humanos com LAS, ARC e SIDA. Verificou-se que o 2-5A extraído era realmente funcional por análises de ligação, de celulose nuclear e de cisão de ARN ribossomal. Apesar das concentrações elevadas de 2-5A funcional endógeno, não foi possível detectar qualquer RNase L activado em qualquer dos humanos com LAS, ARC, SIDA. No entanto a RNase foi activada em PBMC em todos os indivíduos saudáveis, mesmo apesar de as concentrações de 2-5A endógeno serem inferiores a 5 nM. Diversas experiências demonstraram a evidência da presença de um inibidor de RNase L em todos os indivíduos escolhidos de entre um grupo de cinco com LAS, ARC e SIDA. Este inibidor é transferido e pode prevenir a degradação de ARNr específica em relação a RNase L induzida por 2-5A extractos de células L929. É possível precipitar um inibidor de RNase como o descrito pelo TCA e pelo etanol. A inibição da acção de RNase L foi eliminada por RNase A ou por tratamento com uma protease. Os meus estudos sugerem que em PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA, um ARNdc endógeno activa a sintetase de 2-5A, o que tem como resultado numa concentração de 2-5A endógeno. A capacidade do 2-5A funcional para activar RNase L é evitada por um inibidor de RNase L induzido por HIV em PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA.

Eu anoto aqui as medições de concentrações de 2-5A e da função de RNase L em extractos de PBMC pela utilização de ensaios específicos e sensíveis e demonstro que uma deficiência no sistema antiviral de sintetase de 2-5A/RNase em PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA resulta na presença de um inibidor de RNase L mas não na síntese de 2-5A não funcional. Os dados aqui relatados salientam que as interacções aparentemente paradoxais que ocorrem na célula infectada pelo vírus podem agora ser explicadas em termos bioquímicos racionais e coerentes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DOS DESENHOS

Mergulhou-se num tampão de lise NP40 (16) (10 μ L) RNase A ligada a partículas acrílicas (1 mg) ou protease ligada a carboximetil-celulose (1 mg) (Sigma Chemical Co.) durante 2 horas

a 30°C, e em seguida mistura-se com extracto de PBMC (100 µg por análise), obtendo-se um volume final de 15 µL, e uma incubou-se durante mais 2 horas a 30°C. Durante a segunda incubação, os tubos foram várias vezes agitados à mão com suavidade. Incubaram-se amostras de comparação sem adição de qualquer enzima. As enzimas foram sedimentados por centrifugação (10 000 x g, 5 min. temperatura ambiente). Adicionaram-se 5 microlitros de fracções de sobrenadante a extractos de células L929 (150 µg de proteína/ensaio) e usaram-se análises de cisão de ARNr para medir a actividade específica da RNase L.

O 2-5A endógeno isolado dos extractos de PBMC foi caracterizado adicionalmente pelas análises de cisão de ARNr. Os padrões de cisão provocada por da RNase L com 2-5A isolado a partir de PBMC eram significativamente diferentes em extractos de células L929 dos obtidos com 2-5A autêntico (FIG. 1, comparar pistas 3, 5, 7 e 9 com pista 10). Por exemplo o 2-5A endógeno isolado de PBMC activa a RNase L de células L929 para clivir ARNr 28S e 18S, formando três produtos de cisão específicos (Fig. 1, pista 10). Estas diferenças nos padrões de cisão observados podem ser explicados pelo facto de o 2-5A endógeno sintetizado em PBMC diferir do autêntico 2-5A.

Têm-se usado análises de ligação a radioisótopos para estimar o nível de RNase L livre (não activada por 2-5A), uma enzima visada presentemente conhecida para 2-5A. Podem também ser usadas outras enzimas visadas adicionais, as quais são igualmente relevantes para a minha invenção. Extractos de PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA possuem níveis de RNase L livre 5 a 7 vezes mais baixos que os de indivíduos normais (Quadro 1, coluna 4). NO entanto, o ensaio de ligação a radioisótopos tem uma aplicação limitada em amostras em que o 2-5A endógeno compete com $P_3A_4(^{32}P)pCp$ para ligação com RNase L. Consequentemente os resultados obtidos em ensaios de ligação a radioisótopos não reflectem os níveis de RNase L com precisão. Por isso, foi essencial a determinação do nível de RNase L activada por 2-5A. Para se obter este objectivo eu usei uma técnica nova e sensível descrita seguidamente, que permite a medição de RNase L activada em extractos de PBMC isolados de quantidades tão reduzidas como


um mililitro de sangue periférico, uma técnica baseada na especificidade da cisão de RNase L activada por 2-5A em ARNr.

Porque rARN em PBMC está abaixo do nível de detecção, substituíram-se as células usadas como fonte de ARNr por células HL929 (um subclone deficiente em RNase L da linha de células L929). As células HL929 estão depositadas no American Type Culture Collection em Rockville, Maryland, USA sob o número de acesso _____, de acordo com os termos do tratado de Budapeste. Utilizando esta experiência posso demonstrar que a RNase L não está activa em extractos de PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA (Fig. 2, pistas 2-6) onde existe uma alta acumulação intracelular de 2-5A funcional. Extractos de PBMC de todos os indivíduos saudáveis testados mostraram a presença de RNase L activa que produziu produtos de cisão específicos (Fig. 2, pista 7) mesmo apesar de estar presente 2-5A a <5 nM (Quadro 1 coluna 2).

A minha observação de que 2-5A biologicamente activo estava presente em extractos de PBMC de pacientes infectados com LAS, ARC e SIDA levantou a questão de porque é que a RNase estava inactiva. Para determinar se a falta de actividade de RNase L (como evidenciado na Fig. 2, pistas 2-6) se deveu a RNase L não funcional ou era devida a um inibidor da actividade de RNase L, foram realizadas experiências de mistura como se segue. Foram misturados extractos de células L929 contendo RNase L funcional e co-incubaram-se estes extractos com extractos de PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA. Não foi detectável qualquer formação de produtos de cisão específicos de RNase L (Fig. 1, pistas 3, 5 e 7).

É importante sublinhar que o 2-5A endógeno responsável pela activação de RNase L (Fig. 1, pistas 3, 5 e 7) representa pelo menos uma diluição quadrupla relativamente aos extractos de células dos quais estas amostras eram derivadas (Fig. 1, pistas 2, 4 e 6). Estes dados indicam a presença de inibidor(es) de RNase L insolúvel em TCA no PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA. Um inibidor deste género não se encontra em humanos saudáveis porque os seus extractos de PBMC geram produtos de cisão específicos para RNase L a seguir a co-incubação com extractos de células L929 (Fig. 1, pista 8). Similarmente, a fracção so-



lúvel TCA de PBMC de humanos saudáveis geram também produtos de cisão específicos (Fig. 1, pista 9). A presença de 2-5A funcional e o facto de o presumível inibidor de RNase L ser precipitável por TCA e por etanol sugere que o inibidor de RNase L não é um análogo de 2-5A, como tem vindo a ser recentemente identificado em HSV-1 e células infectadas por retrovírus em cultura.

As minhas experiências utilizando enzimas de degradação imobilizadas em suportes sólidos têm proporcionado uma visão nova importante dentro da natureza do(s) inibidor(es) de RNase L encontrado(s) em extractos de PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA. Quando extractos de PBMC de humanos com SIDA foram pré-incubados com protease ou com RNase A imobilizadas e subsequentemente foram co-incubados com extractos de células L929, foi restaurada a activação de RNase L, como evidenciado pela presença de produtos de cisão específicas (Fig. 3, comparar pistas 1 e 2 com a pista 3).

O meu estudo presente demonstra que o defeito no sistema antiviral de sintetase 2-5A/RNase L em PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA pode ser atribuído a um inibidor de RNase L e não à falta de 2-5A funcional. O inibidor de RNase L está presente em extractos de PBMC isolados de humanos com LAS, ARC e SIDA, o que indica que o inibidor pode existir em todos os estádios do desenvolvimento de doenças provocadas por retrovírus típicos e é também relevante para uma variedade de outras infecções sub-agudas/crónicas virais/patogénicas. Tendo-se em consideração o meu relatório anterior, segundo o qual todos os PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA testados aqui têm ARN de HIV (conforme determinado por hidridação molecular) e centros de infecção HIV (conforme medido por co-cultura de linfócitos), é provável que o inibidor de RNase L seja induzido por vírus.

Os inventos aqui relatados sugerem que a replicação de vírus modifica o sistema de sintetase 2-5A/RNase L de maneira que o estado antiviral natural não pode ser completamente expresso e/ou mantido. É provável que proteína(s) ou ARN(s) codificados por HIV e/ou por outros retrovírus co-existentes podem inibir a activação de RNase L.



Exemplo

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas em Ficoll-Hypaque; as células L929 e HL929 (um subclone deficiente RNase L de L929) foram mantidas em cultura de monocamada; e os extractos citoplasmáticos de células L929 e LH929 foram preparados em tampão de glicerol e os extractos de PBMC em tampão de lise NP40, sempre de acordo com procedimentos conhecidos. As concentrações de proteínas dos extractos variaram entre 1 a 15 µg/µL.

A actividade da sintetase 2-5A foi determinada em extractos de PBMC (50 µg de proteína/ensaio) utilizando poli(rI)-poli(rC)-agarose. O 2-5A foi isolado da fracção solúvel em TCA de extractos de PBMC a seguir a neutralização por freon/tri-n-octilamina. O 2-5A extraído por TCA foi então liofilizado e redissolvido em água, de maneira que todas as amostras foram normalizadas num volume de água equivalente a 5 µg de proteínas/µL. As concentrações de 2-5A presente em extractos de PBMC foram medidas em ensaios de ligação a radioisótopos com extractos de células como fonte de RNase L. Dos 18 900 dpm de $P_3A_4(^{32}P)pCp$ (actividade específica de 3 000 Ci/mmol, Amersham) adicionados por ensaio, 9 400 dpm foram ligados a RNase L na ausência de 2-5A adicionado. Aproximadamente 9 a 14% de $P_3A_4(^{32}P)pCp$ foram substituídos nas experiências em que se adicionou 5 µL das amostras 2-5A isolados. A concentração de 2-5A em PBMC foi determinada por comparação com curvas de calibração de 2-5A autêntico e foi baseado num cálculo de concentração de proteína citoplasmática de 25 µg/µL. Foi também medida a concentração de 2-5A isolado de PBMC em ensaios de celulose de núcleo com extractos de células L929 como fonte de RNase L. A activação de RNase L por 2-5A neste ensaio basea-se na conversão de poli(U) (^{32}P)pCp em fragmentos solúveis em ácido. Aproximadamente 5 a 20% do total de poli(U) (^{32}P)pCp (15 000 dpm) foi cindido na presença de 2,5 µL das amostras de 2-5A isoladas. As concentrações foram determinadas a partir de curvas de calibração com 2-5A autêntico, como descrito acima. O nível de RNase L livre foi medido em ensaios de ligação a radioisótopos após a adição de 20 000 dpm de $P_3A_4(^{32}P)pCp$ a extractos de PBMC (50 µg de proteína/ensaio). Os resultados obtidos foram os seguintes:

Quadro 1 Actividade de sintetase 2-5A endógeno, nível de RNase L livre e presença de inibidor de RNase L em extractos de PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA.

Fonte de PBMC	Sintetase de 2-5 ^a	2-5A intracelular		RNase L livre ^d	Actividade de RNase L ^e
		Método A ^b	Método B ^c		
coluna:	1 (nmole de ATP incorporado/mg de proteína)	2 (nM)	3 (nM)	4 (dpm)	5
#1 LAS	50	18	ND ^g	280	inibido
#2 ARC	13	25	31	270	inibido
#3 SIDA	195	32	35	270	inibido
#4 SIDA + SK	50	21	15	260	inibido
#5 SIDA	157	24	25	240	inibido
Normal ^f	10	5	ND	1630	não inibido

^a desvio padrão <9%

^b determinado em análise de marcação por radioisótopos (em duplicado)

^c determinado em análise de celulose de núcleo (em duplicado); desvio padrão <1%

^d determinado em análise de marcação por radioisótopos (em duplicado); desvio padrão <10%

^e determinado em análise de cisão AKNr; ver também FIGURA 1

^f média de 7 amostras de comparação (em duplicado)

^gND = não determinado



A actividade da enzima sintetase de 2-5A induzida por interferão em extractos de PBMC obtidos de humanos com LAS, ARC e SIDA foi medida com ensaios in vitro e comparada com o de extractos de indivíduos sãos como se mostra no Quadro 1 acima apresentado. Os níveis de sintetase de 2-5A em humanos com SIDA (#3 e #5) eram de 16 a 20 vezes mais elevados do que os observados em pacientes normais (Quadro 1, coluna 1). Em contraste, os níveis de sintetase de 2-5A em pacientes com LAS (#1), ARC (#2) e SIDA com o sarcoma de Kaposi (SK) (#4) eram só 1,3 a 5 vezes mais elevados, em concordância com observações feita por outros que não revelavam qualquer elevação.

Para determinar se esta medição in vitro de sintetase de 2-5A era uma indicação da ocorrência de enzima funcional in vivo, extraiu-se 2-5A de PBMC. As actividades biológicas de 2-5A da fracção solúvel em TCA dos extractos do PBMC foram caracterizadas completamente por análises de ligação a radioisótopos e de celulose de núcleo. As concentrações de 2-5A foram similares às determinadas pelos dois procedimentos de análise (Quadro 1, colunas 2 e 3). O acordo entre resultados obtidos pelos métodos A e B (quadro 1, colunas 2 e 3) demonstra que o 2-5A isolado de extractos de PBMC humano pode ligar-se e activar RNase L de células L929 com a mesma intensidade que 2-5A autentico.

A falta aparente de correlação quantitativa entre os níveis de sintetase de 2-5A e do 2-5A endógeno em LAS, ARC e SIDA (Quadro 1, comparar coluna 1 com coluna 2 e 3) pode agora ser explicada, pela primeira vez, como se segue. A determinação de sintetase 2-5A por ensaios in vitro basea-se na purificação parcial via poli(rI)-poli(rC)-agarose; consequentemente esta análise média só a sintetase de 2-5A livre e não a sintetase de 2-5A que se encontra activada in vivo pelo ARNdc. No entanto, medição directa de sintetase 2-5A endógena mais as enzimas 2-5A degradativas (i.e., 2'-fosfodiesterase e fosfatase). Por conseguinte, a acumulação de 2-5A em PBMC de humanos com LAS, ARC e SIDA indica uma baixa actividade das enzimas degradativas. A presença de 2-5A em PBMC também indica que existe um ARNdc endógeno até aqui não detectado nem em indivíduos normais nem em pacientes com SIDA.



ARN de cadeia dupla desemparelhado é uma forma conhecida de ARN macromolecular (ver patente norte americana nº. 4 024 222 e patente norte americana nº 4 130 641) em que a desestabilização da hélice dupla evita a formação de pares de base. O ARNdc desemparelhado é bem conhecido pelas suas propriedades indutoras de interferência, o que indica um mecanismo não relacionado com a indução de interferência per se (p. ex., pedido de Patente Europeia 83305426.5 apresentado em 15 de Agosto 1983 intitulado "Antiproliferative action of dsRNAs on Tumor Cells").

Uma concretização típica de ARN de cadeia dupla desemparelhado é o ARNdc sintético formado por complexos de ácido poliribonucleotídico e de ácido poliribocitidílico/uridílico, como, por exemplo $rIn\ r(Cx, U \text{ ou } G)_n$ em que x possui o valor de 4 a 29, p. ex., $rIn.r(C_{12}U)_n$ aqui referido como AMPLIGEN^(r), uma marca registada por HEM Research, Inc., de Rockville, Maryland, EUA. Têm sido estudados muitos polímeros de ARNdc desemparelhado que se comportam de modo similar ao Ampligen. A vantagem terapêutica chave de ARNdc's imperfeitos sobre outras formas de ARN's naturais e/ou sintéticos reside na sua toxicidade reduzida em animais e homens. Por exemplo Lampson et al. na patente Norte Americana nº 3 666 646 tinha descrito anteriormente complexos de ARNdc que são capazes de desencadear vários efeitos relacionados com interferências, mas a toxicidade de tais compostos impossibilitam qualquer utilidade no tratamento do cancro ou afecções relacionadas.

Sabe-se presentemente que o ARNdc desemparelhado, p.ex. Ampligen, possui actividade terapêutica contra alguns tumores humanos, particularmente o cancro do rim. Apesar de correntemente os ARNdc's serem encarados como puramente "indutores de interferência", são activos em certos tumores humanos que são completamente resistentes a interferências, como vastamente descrito no pedido de Patente Europeia da qual o requerente da presente aplicação é um inventor.

Noutro pedido de patente (ver pedido de Patente Europeia 86306582.7, apresentado em 26 de Agosto de 1986 intitulado "Modulation of Virus-Related Events by Double-Stranded RNAs), o inventor descreve a inibição do vírus da SIDA em cultura de cé-

lulas humanas por ARNdc's utilizando Ampligen como um ARNdc protótipo.

Por "ARNdc emparelhado" entendem-se aquelas em que ligações de hidrogênio (empilhamento de bases) entre as cadeias opostas estão relativamente intactas, isto é, estão interrompidas em média menos do que um par de bases em cada 29 resíduos de bases consecutivos. O termo "ARNdc desemparelhado" deve ser entendido de acordo com esta definição.

O ARNdc pode ser um complexo de poliinosinato e um policitidilato contendo uma proporção de bases de uracilo ou de bases de guanidina, p. ex., de 1 em 5 a 1 em 30 destas bases (poli I. poli (C4-29 x U ou G).

O ARNdc pode ser da fórmula geral $RIn.(C_{12}U)_n$. Outros exemplos apropriados de ARNdc são discutidos a seguir.

Os ARNdc desemparelhados preferidos para uso na presente invenção são baseados em co-polinucleótidos selecionados a partir de poli (Cn,U) e poli (Cn,G), nos quais n um número inteiro com um valor de 4 a 29 e são análogos desemparelhados de complexos de ácido poliriboinosínico e poliribocitidílico, formados pela modificação de $rIn.rCn$ a fim de incorporar bases não correspondentes (uracilo ou guanina) ao longo da cadeia de poliribocitidilato (rCn). Alternativamente, o ARNdc pode ser derivado de ARNdc poli (I). poli (C) através de modificação da espinha dorsal do ribosilo de ácido poliriboinosínico (rIn) p. ex., por inclusão de resíduos de 2'-O-metil-ribosilo. Estes análogos desemparelhados de $rIn.rCn$, dos quais os preferidos são da fórmula geral $rIn.r(C_{12},U)_n$, são descritos por Carter e Ts'o na patente Norte-Americana 4 130 641 e 4 024 222, cujas descobertas são aqui incorporadas por referência, Os ARNdc's descritos nestas referências são geralmente apropriados para uso de acordo com a presente invenção.

Exemplos específicos de ARNdc desemparelhado para uso na presente invenção incluem: -

Poli (I). poli (C₄,U)
poli (I). poli (C₇,U)
poli (I). poli (C₁₃,U)


poli (I). poli (C₂₂,U)
poli (I). poli (C₂₀,U)
poli (I). poli (C₂₉,U) e
poli (I). poli (C_p) 23 G p

As composições farmacêuticas contempladas pela presente invenção incluem as adaptadas para administração parenteral num veículo farmacêuticamente aceitável. Assim, por exemplo, soluções parenterais, suspensões e dispersões podem ser preparadas como requerido de acordo com técnicas farmacêuticas conhecidas com água estéril ou livre de pirogênio como solvente/diluyente, opcionalmente também com sais farmacêuticamente aceitáveis.

A quantidade de ARNdc desemparelhado administrada é preferencialmente suficiente para alcançar uma concentração máxima no sangue de a partir de 0,01 microgramas por mililitro do nível de ARNdc através do fluido do corpo até 1000 microgramas por mililitro na circulação sistémica do sangue imediatamente a seguir num ponto distanciado do sítio de perfusão.

Em alternativa, pode ser adicionada uma concentração efectiva pode ser adicionada ao produto do sangue imediatamente antes da injeção no receptor. Nesses casos o operador pode simplesmente referir-se a um quadro normalizado de volumes de fluídos do corpo que interrelacionam o peso do receptor com o volume de fluídos do corpo, o qual é o total do volume de fluido do corpo do paciente e o volume de fluido do corpo disponível para equilibrar com a quantidade necessária de ARNdc. Um paciente de sessenta a setenta quilogramas de peso terá um volume de fluido de corpo de aproximadamente cinco a seis litros.

REIVINDICAÇÕES

- 1a -

Processo para determinação da presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou de outro vírus que causa condições clínicas substancialmente similares caracterizado por com-

- 15 -



preender uma fase de determinação de um inibidor de RNase L, um marcador para a presença de HIV ou informação genética dirigida por HIV, num extracto celular dum animal.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, para a determinação num fluido biológico humano ou em células humanas da presença de vírus da imunodeficiência humana ocultos caracterizado por compreender uma fase de detecção da presença de um inibidor de RNase L no fluido biológico humano ou nas células humanas.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o fluido biológico ser sangue ou uma fracção de sangue.

- 4ª -

Processo de diagnóstico para a determinação da incidência presumível de HIV num animal caracterizado por compreender uma fase de exame dum extracto de tecidos do animal e de determinação da presença ou da ausência de pelo menos um inibidor de RNase L de acordo com a reivindicação 1, constituindo a respectiva presença uma indicação positiva da presumível presença de vírus HIV.

- 5ª -

Processo para a monitorização de progresso de recuperação de HIV ou dum vírus que cause condições bioquímicas e/ou clínicas similares caracterizado por compreender as fases de:

- (1) determinação da presença ou da ausência de pelo menos um inibidor de RNase L num extracto de células do paciente e, no caso de se detectar um inibidor de RNase L, (2) administração de uma quantidade de ARN de dupla cadeia (ARNdc) suficiente para reduzir a quantidade de inibidor (ou de inibidores) de RNase L de

- 16 -

condições induzidas por HIV ou por outros vírus que causem condições bioquímicas e/ou clínicas similares e (3) continuação da administração de ARNdc até que os sintomas clínicos do paciente se estabilizem e melhorem.

- 6a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 5 caracterizado por ARNdc ser um ARNdc desemparelhado.

- 7a -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o ARNdc ser um complexo dum poli-inosinato com um policitidilado contendo desde 1 a 5 até 1 em 30 bases uracilo ou guanidina (x).

- 8a -

Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o ARNdc ser da fórmula geral $rIn.(C_{12}U)_n$.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado nos Estados Unidos da América, em 23 de Dezembro de 1987, sob o número de série 136,978.

Lisboa, 2 de Março de 1988

A AGÊNCIA NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL



RESUMO

"PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) MEDIANTE A UTILIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE RNase L"

A invenção refere-se a um processo para determinação da presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou de outro vírus que causa condições clínicas substancialmente similares que compreende uma fase de determinação de um inibidor de RNase L, um marcador para a presença de HIV ou informação genética dirigida por HIV, num extracto celular dum animal.

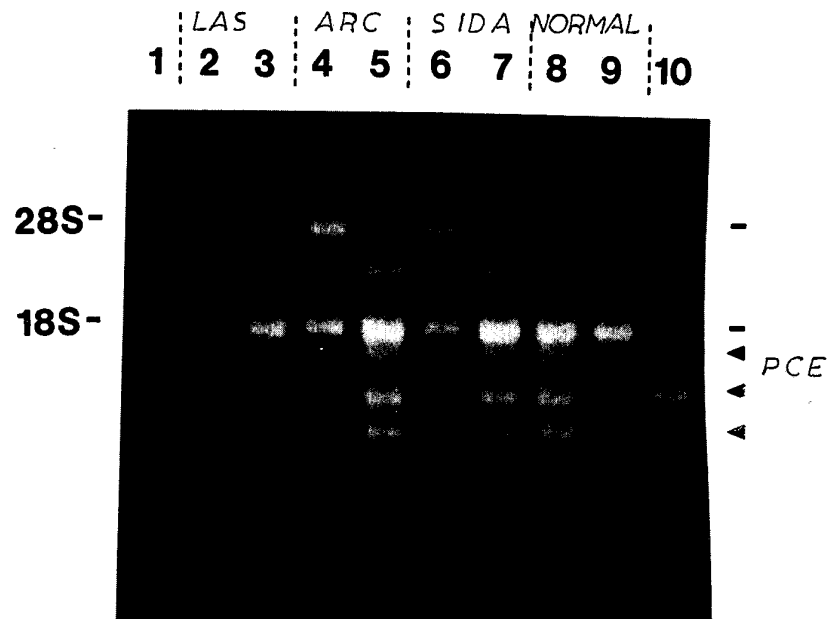


FIG.1

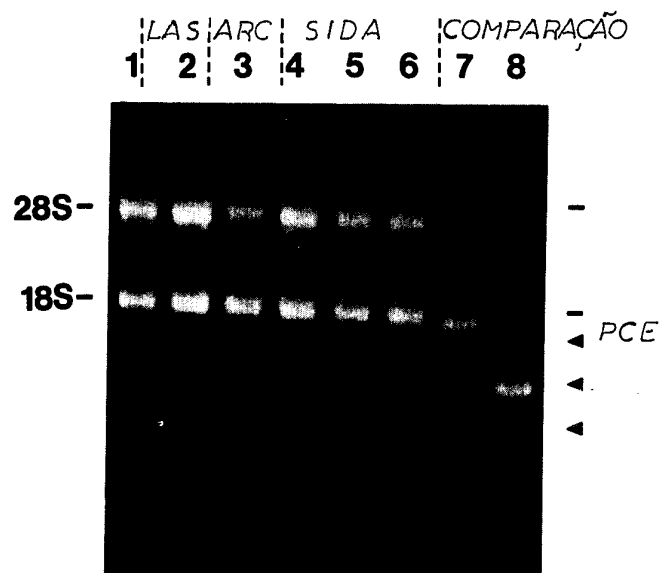


FIG.2

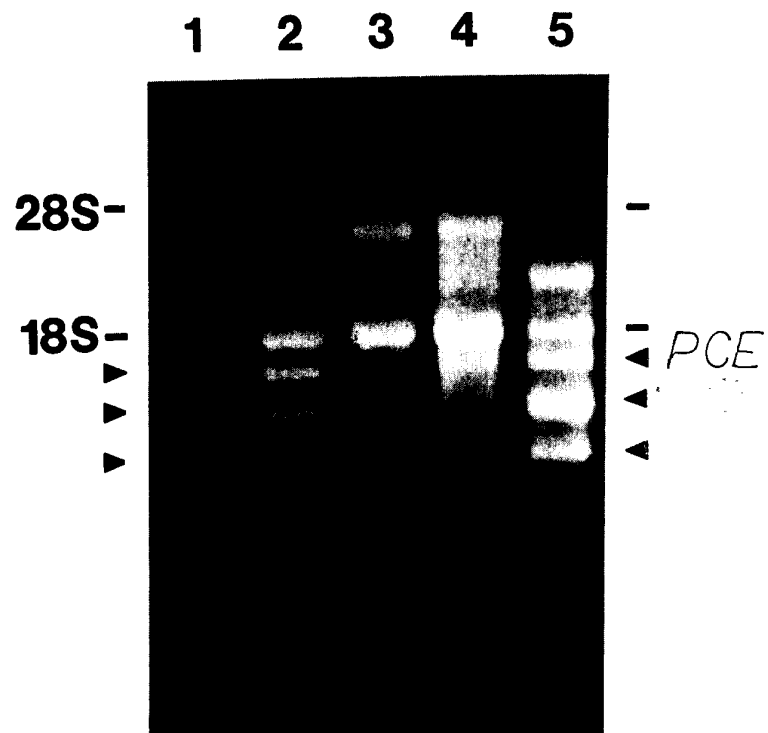
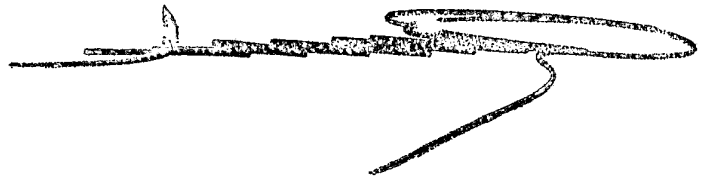


FIG.3

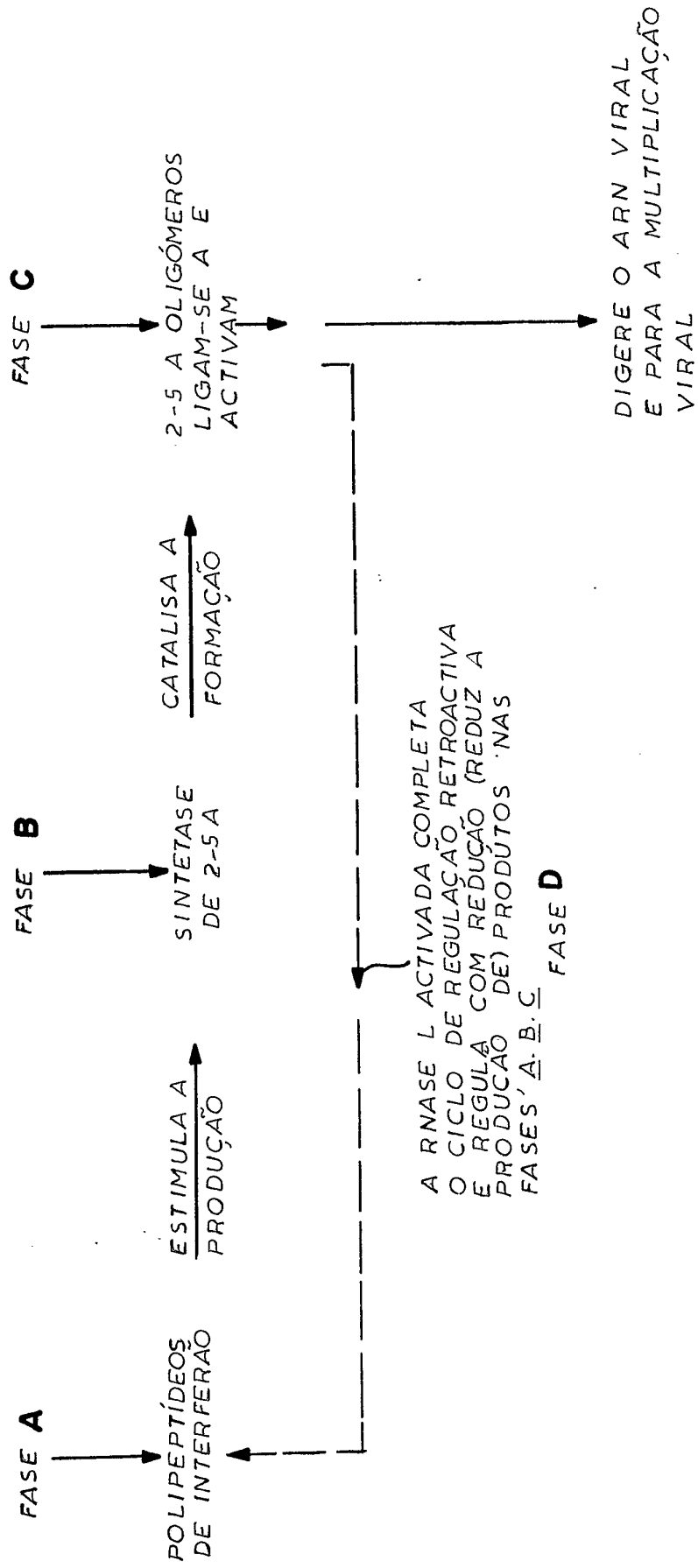


FIG. 4