



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 91094 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
A61K031/70 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.07.07	(73) <i>Titular(es):</i> HEM RESEARCH, INC. 12220 WILKINS AVENUE ROCKVILLE, MARYLAND 20852 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.07.07 US 220765	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.02.08	(72) <i>Inventor(es):</i> WILLIAM A. CARTER US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 07/94 1994.07.12	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS ASSOCIADAS COM A FADIGA CRÓNICA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 91 094

REQUERENTE: HEM RESEARCH., norte-americana, estabelecida em 12220 Wilkins Avenue, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos da América.

EPÍGRAFE: " MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS ASSOCIADAS COM A FADIGA CRÓNICA "

INVENTORES: William A. Carter.

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

Estados Unidos da América, em 07 de Julho de 1988, sob o nº. 07/220,765.

~~SECRET~~

Descrição referente à patente de invenção de HEM RESEARCH, Inc., norte-americana, industrial e comercial, estabelecida em 12220 Wilkins Avenue, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos da América, (inventor: William A. Carter, residente nos E.U.A.), para "MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIÁRIS ASSOCIADAS COM A FADIGA CRÓNICA".

DESCRIÇÃO

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O Síndrome de Fadiga crónica (SFC), uma condição genérica que envolve cerca de 10 a 12 milhões de pessoas apenas nos Estados Unidos, é uma doença ubíqua difícil de diagnosticar caracterizada por uma extrema fadiga, inchamento da glândula linfática e sintomas constitucionais como por exemplo perda de peso, perda de apetite, falhas de memória e perda de inteligência em alguns pacientes. A doença ocorre especialmente em gente jovem, activa e está associada com infecções com vírus contendo ARN e ADN. Alguns pacientes com SFC apresentam alterações neuropsiquiátricas tais como depressão, perda de memória e problemas semelhantes. Deste modo, o síndrome de fadiga crónica é por vezes difícil de distinguir de doenças totalmente neurológicas, particularmente em situações de depressão. Vários estudos laboratoriais indicam que muitos vírus diferentes se replicam em indivíduos com Fadiga Crónica, e que esses indivíduos se tornam de facto, "cultivadores de vírus". Vírus como o

~~CONFIDENTIAL~~

de Epstein-Barr, citomegalovirus, retrovirus, virus herpes, etc, estão frequentemente presentes nesses indivíduos onde podem permanecer durante anos e os pacientes tornam-se progressivamente cansados e presos à cama.

Determinou-se que existem alterações específicas na via molecular 2'-5'A na maior parte dos indivíduos que apresentam Síndrome de Fadiga Crônica, alterações que têm valor diagnóstico e prognóstico muito grande. Como ilustração, considera-se que muitas mulheres com 25-30 anos com crianças muito activas se queixam muitas vezes de "fadiga crônica", mas não estão necessariamente infectadas com vírus. Os procedimentos de diagnóstico aqui descritos permitem ao médico saber que pacientes apresentando sintomas de fadiga crônica e sintomas semelhantes, incluindo nalguns casos a perda de peso, perda de apetite e alterações neuropsiquiátricas, são adequadamente classificados como possuindo o Síndrome de Fadiga Crônica com envolvimento Viral associado e distinguir com precisão esses pacientes daqueles que apresentam sintomas de fadiga cansados por outras razões frequentemente externas e/ou depressão. O dispositivo adequado do Síndrome de Fadiga Crônica é o pré-requisito necessário para uma terapia eficaz, terapia essa que também é aqui descrita. Estes procedimentos valiosos de diagnóstico e terapia são a seguir descritos.

Para além destes procedimentos de diagnóstico, a primeira terapia definitiva para esta doença foi desenvolvida utilizando vários APN de dupla espiral para corrigir as doenças associadas com vírus e tratar com sucesso a condição dos pacientes.

Em estudos anteriores, a utilidade em diagnóstico de componentes individuais da via 2'-5' oligoadenilato RNase L foi referido especialmente no que se refere a doenças de vírus em geral e infecções por retrovírus em particular sem referência particular aos sintomas da fadiga crônica. Especificamente, foi agora determinado que no Síndrome da Fadiga Crônica, entre outras coisas, existem uma enzima 2'-5'A sintetase anormalmente baixa e uma enzima RNase L aberrantemente activada

ambas partes integrantes da via antiviral natural da célula que estão correlacionadas com a condição morbida de fadiga.

Estas duas medidas podem assim servir como indicadores ou "marcadores" o Síndrome de Fadiga Crónica e podem portanto ser utilizados para diagnosticar definitivamente e seguir o tratamento do síndrome de uma forma totalmente nova e clinicamente fiável. Além disso, o diagnóstico é convenientemente efectuado numa amostra de sangue periférico do paciente sem necessidade de cirurgia ou outros ensaios de diagnóstico invasivos.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Esta invenção inclui procedimentos para identificar o Síndrome de Fadiga Crónica, evidenciada por aberração associada com vírus da enzima RNase L ligada com o baixo teor da enzima 2'-5'A sintetase nos linfócitos do sangue periférico do paciente, procedimentos de diagnóstico que utilizam esta informação para determinar a presença do Síndrome de Fadiga Crónica, procedimentos terapêuticos para restaurar as aberrações da via molecular 2'-5'A do paciente por exemplo por administração de dsARNs exógenos e melhorando a condição clínica do paciente, procedimentos terapêuticos para monitorar a condição do paciente em relação ao Síndrome de Fadiga Crónica e medir o grau de Substituição de dsARN necessário numa base individual, e composições terapêuticas para o tratamento do Síndrome de Fadiga Crónica.

PROCEDIMENTOS DE DIAGNÓSTICO

Determinou-se a concentração in vivo da enzima 2'-5'A sintetase, moléculas 2'-5'A e RNase L activada em indivíduos normais e em pessoas com o Síndrome de Fadiga Crónica a partir de amostras de pacientes (linfócitos do sangue periférico purificado por ficoll-Hypaque). O teor de 2' - 5'A foi determinado por análises de celulose do número de 2' - 5'A (cromatografia de afinidade) com poli U - { ³²P } -pCp. Neste ensaio,

utiliza-se a capacidade de RNase L activada com 2' - 5'A para hidrolisar poli (U) para determinar a concentração de 2' - 5'A funcional.

Os valores de referência foram estabelecidos ensaiando 25 pessoas normais sem história recente de infecções virais evidenciado pela falta de cultura de vírus, febre, ausência de sintomas constitucionais, borbulhas, etc. As concentrações dos teores de 2' - 5'A de linfócitos de pessoas ensaiadas foram determinadas utilizando curvas de calibração obtidos com moléculas de 2' - 5'A autênticas. Os valores de referência de indivíduos normais expressos em nanomoles de 2' - 5'A por grama de proteína de linfócito, estão geralmente na gama de 0,2 a 1,0. As curvas normais de calibração foram também estabelecidas para enzima 2' - 5'A sintetase e enzima RNase L.

Utilizando estes métodos de ensaio, analisaram-se dez pacientes apresentando os sintomas habituais do Síndrome de Fadiga Crônica e os resultados representativos determinados são apresentados a seguir. Os níveis de 2' - 5'A oligonucleótido são tipicamente maiores de cerca de 2 -15 vezes enquanto a enzima 2' -5'A sintetase é proporcionalmente diminuída e aparece uma nova aberração enzimática da RNase L.

TABELA 1

Aberrações de Pré-Terapia na via 2' - 5A/RNase L em Pacientes que Sofrem de Fadiga Crônica Secundária em relação a Infecção Viral .

<u>Número do Paciente</u>	<u>n moles de 2'-5'A por grama de proteína de linfócito</u>
A	1.4, 2.4
B	2.0
C	10.1
D	5.2

TABELA 1 (continuação)

E	11.3
F	7.6
G	8.3
H	4.7
I	3.8
J	5.9

Além disso, todos os 10 pacientes apresentavam antes da terapia com dsARN, diminuição da enzima intracelular 2'-5'A sintetase para valores de aproximadamente 5 a 50 vezes inferiores aos de pessoas saudáveis não infectadas. Os pacientes com o Síndrome de Fadiga Crônica têm geralmente associado um defeito (ou aberração) no mediador terminal da via de defesa antiviral designada por RNase L. Assim, a via global de defesa antiviral demonstra ambos os defeitos (valores alterados dos mediadores) ou aberrações (novas actividades de componentes de enzimas). O tratamento definitivo dessas pessoas com o Síndrome da Fadiga Crônica é efectuado administrando dsARNs exógenos, como necessário, até que o nível intracelular de 2' - 5'A oligonucleótidos e 2' - 5'A sintetase atinja o valor normal a aberração da RNase L seja corrigida, e/ou diminua a sintomatologia clínica do paciente. Frequentemente estas melhorias moleculares ocorrem aparentemente de forma simultânea com melhorias clínicas muito elevadas, como se pode observar comparando a Tabela 2 (uma via enzimática estudada em função do tempo no paciente A) com quadros clínicos do paciente A (Tabelas 3 e 4). Mais do que 90% dos outros pacientes estudados até agora tinham melhorias enzimáticas muito elevadas associadas com a recuperação clínica.

TABELA 2

COMPONENTES DO SISTEMA ANTIVIRAL 2-5A SINTETASE/RNase IM PBMC
DE PACIENTES COM O SINTOMA DA FADIGA CRÔNICA (SFC)

Fonte	Semanas em dsARN inco _e rentes	Atividade In Vitro ^a da 2-5A Sintetase	Concentração Intracelular de 2 - 5A ^b	RNase I ^c Ativada
Paciente	0	2.4	1.4	++++
CPS	0	1.8	2.4	++++
HA	2	1.4	0.5	+++
	4	2.1	0.7	+
	8	1.4	0.6	+
Saudáveis	5		0.7	+

^a moles de ATP incorporada em 2-5A por mg de proteína

^b moles por grama de proteína

^c + = Nível normal; ++++ = nível de RNase I "hiperactivo" medido no ensaio de clivagem de rARN.

TABELA 3
RESULTADOS DE ENSAIOS NEUROPSICOLÓGICOS CUMULATIVOS

Ensaio	8/26/87	5/26/88	Amplifênio Iniciado	
			6/30/88	9/1/88
Wais - R				
Informação	12	13	11	15
Digit Span	11	8	8	10
Vocabulário	12	12	12	16
Aritmética	9	8	5	11
Semelhanças	15	13	9	12
Desenho de Bloco	8	6	5	9
Símbolo do Dígitto	8	2	3	8
IQ de Escala Total	110	93	88	112

Halstead - Reitan	Níveis De			
Hand Tapping	Severo	Severo	Severo	Normal
Trailmaking A	Suave	Severo	Severo	Normal
Trailmaking B	Suave	Suave	Moderado	Normal

~~CONFIDENTIAL~~

TABELA 4

ENSAIO DE TOLERANCIA DE EXERCÍCIO

<u>DATA</u>	<u>FASE</u>	<u>DURAÇÃO</u>
7/23/88	I	1 min, 30 seg.
8/9/88	Terapia com Ampligénio Iniciada	
9/6/88	I	3 min.
10/20/88	II	3 min.
	III	5 min.
12/6/88	I	3 min.
	II	6 min, 10 seg.
4/4/89	II	3 min.
	III	6 min.

A resistência do paciente ao Síndrome de Fadiga Crónica e vírus oportunistas pode ser mantida continuando a medir os níveis de 2'-5'A oligonucleótidos intracelulares, 2'-5'A sintetase, e grande aberração na enzima RNase L, e administrando ds ARN exógeno, como necessário, para manter a normalidade, ou quase normalidade, destas funções moleculares.

Os ds ARN naturais (intracelulares) também têm um papel importante na defesa do hospedeiro quando um indivíduo é atacado com agente(s) viral(is) como no caso do Síndrome de Fadiga Crónica. A redução específica no ds ARN bicativo, ou enzimas que dependem directamente ou indirectamente do ds ARN, nomeadamente a 2'-5'A sintetase e RNase L aberrante, ligada com níveis anormalmente baixos de 2'-5'A em linfócitos do sangue periférico, dentro de células específicas contribui para a cronicidade de doenças virais, seja qual for o agente viral espe-

cífico. O ds ARN, nomeadamente ds ARN incoerentes (como por exemplo AMPLIGEN^R, HEM Research, Inc., Rockville, MD., (EUA) inverte a sintomatologia da doença por re-regulação da via molecular alterada.

Em "ds ARN incoerente pretende incluem-se aqueles em que a ligação de hidrogénio (empilhamento de base) entre os espirais opostas está relativamente intacta, isto é, não é interrompida com frequência. O termo "ds ARN" emparelhado deve ser entendido da mesma forma. O ds ARN pode ser um complexo de um poliinosinato e um policitidilato contendo uma proporção de bases de uracilo ou bases de guanidina, por exemplo, de 1 a 5 a 1 a 30 dessas bases

(poli I . poli (C₄₋₂₉x > U ou G).

O ds ARN pode ter a fórmula geral

$rI_n \cdot r(C_{11-14}, U)_n$ ou $rI_n \cdot r(C_{12}, U)_n$. São discutidos a seguir outros exemplos de ds ARN, e oligonucleotidos específicos de espiral dupla podem ser também utilizados em certos casos.

Os ds ARN incoerentes preferidos para utilização na presente invenção tem uma base em copolinucleótidos escolhidos de entre poli (C_n,U) e poli (C_n,G) em que n é um inteiro com um valor entre 4 e 29 e são análogos incoerentes de complexos de ácidos polirribonucleicos e polirribocitidilicos, formados pela modificação de $rI_n \cdot rC_n$ para incorporar bases desemparelhadas (uracilo ou guanidina) juntamente com a espiral polirribocitidilato (rC_n). Alternativamente, o ds ARN pode ser derivado de poli (I) . poli (C) ds ARN por modificação do esqueleto de ribosilo do ácido polirribonucleico (rI_n), por exemplo incluindo os resíduos de 2'-O-metil ribosilo. Os complexos incoerentes podem ser complexados com um polímero estabilizador de ARN como por exemplo lisina e celulose. Estes análogos incoerentes de $rI_n \cdot rC_n$, cujos preferidos são os que possuem a fórmula geral $rI_n(C_{11-14}, U)_n$ ou $rI_n \cdot r(C_{29}, G)_n$, são descritos por Carter e Ts'ao nas Patentes Norte-Americanas 4 130 641 e 4 024 222



cuja descobertas são aqui incorporadas por referência. Os ds ARN ali descritos são geralmente adequados para utilização de acordo com a presente invenção.

Outros exemplos de ds ARN incoerente para utilização na invenção inclui

poli (I) . poli (C₄,U)
poli (I) . poli (C₇,U)
poli (I) . poli (C₁₃,U)
poli (I) . poli (C₂₂,U)
poli (I) . poli (C₂₀,G)
poli (I) . poli (C₂₉,G)
poli (I) . poli C_{p23} G>p

As moléculas de ds ARN oligonucleótido podem também ser utilizados quando os "terminais" moleculares são dobrados para evitar o deslizamento dos pares de base, conferindo assim numa bioactividade específica em vários solventes ou ambientes aquosos que existem nos fluidos biológicos humanos.

A concentração e tamanho molecular de 2'-5'A podem ser quantificado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os ensaios de clivagem do ribossoma de ARN podem ser utilizados para determinar a funcionalidade biológica (actividade biológica) do 2'-5'A sintetizado pelo paciente in vivo e determinar o nível de RNase L activada em amostras do paciente. As células mononucleares do sangue periférico são as células preferidas para análise embora se possam analisar outras células se a infecção crónica do vírus a e sequestrada em outros órgãos do corpo.

Os pacientes com o Síndrome de Fadiga Crónica tratados tipicamente com infusões intravenosas de 200 a 600 mg de rI.r(C₁₁₋₁₄,U) duas ou três vezes por semana ou até que os

níveis de 2'-5'A aumentem em associação com a melhoria clínica e correcção dos níveis de sintetase e aberração de RNase L. A quantidade de ds ARN administrado e a frequência de administração serão ditadas por parâmetros laboratoriais medidas em ligação com a melhoria clínica do paciente. As quantidades de ds ARN administradas proporcionarão um nível transiente de 0,01 a 1,000 microgramas de ds ARN por mililitro do sangue sistémico do paciente imediatamente após administração medidos num ponto distal do ponto de infusão. Os fragmentos bioactivos de ds ARN, produtos de desintegração do ds ARN macromolecular de infusão, servem para manter a melhoria das vias enzimáticas 2-5A, acelerando assim o processo de recuperação clínica.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Método de diagnóstico para a presença de uma infecção viral crónica como por exemplo o síndrome de fadiga crónica, num paciente humano, caracterizado por se determinar o nível de 2'-5' A oligonucleótidos celulares e enzimas sintetase e RNase L relacionadas numa amostra de sangue periféricos do paciente e comparar-se esse nível com níveis pré-determinados de 2'-5' A oligonucleótidos sintetase e RNase L em seres saudáveis, indicando os valores reduzidos de nível de 2'-5'A oligonucleótidos sintetase e moléculas enzimáticas alteradas, quando comparadas com os correspondentes a seres saudáveis, a presença do síndrome de fadiga crónica.

- 2ª -

Método para distinguir o síndrome da fadiga crónica induzida por vírus de problemas psicológicos ou neuropsiquiátricos primários parecidos numa pessoa, caracterizado por se determinar o nível de 2'-5'A sintetase, 2'-5'A oligonucleótidos intracelulares e RNase L aberrante numa amostra de sangue

- 11 -

BAD ORIGINAL

periférico do paciente e compararem-se esses valores com os níveis pré-determinados de componentes moleculares semelhantes em pessoas saudáveis.

- 3^ª -

Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado por o 2'-5' A oligonucleótido ser o 2'-5'-oligoadenilato.


- 4^ª -

Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado por a diagnose ser presumivelmente positiva para a síndrome da fadiga crónica associada com infecções virais quando o 2'-4' oligonucleótido na amostra retirada do paciente é superior a 1,0 nanamoles de 2'-5'A por grama de proteína de linfócito associado com pelo menos um sintoma clínico.

A requerente reivindica a prioridade do pedido norte-americano apresentado em 7 de Julho de 1988, sob o número de série 07/220,765.

Lisboa, 7 de Julho de 1989
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL





R E S U M O

"MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS ASSOCIADAS COM A FADIGA CRÔNICA"

A invenção refere-se a um método de diagnóstico para a presença de uma infecção viral crônica como por exemplo o síndrome de fadiga crônica num paciente humano, que compreende determinar-se o nível de 2'-5'A oligonucleotidos celulares e enzimas sintetase e RNase L relacionadas, numa amostra de sangue periférico do paciente e comparar-se esse nível com níveis pré-determinados de 2'-5'A oligonucleótidos sintetase e RNase L em seres saudáveis, indicando os valores reduzidos de nível de 2'-5'A oligonucleótidos sintetase e moléculas enzimáticas alteradas, quando comparadas com os correspondentes a seres saudáveis, a presença do síndrome de fadiga crônica.

