DESCRIÇÃO

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95 601

REQUERENTE: HEM RESEARCH, INC.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A DETECÇÃO DE AFECÇÕES NEURO-COGNITIVAS ASSOCIADAS COM DISFUNÇÕES IMUNOLÓGICAS SISTÊMICAS E PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM ARN DE CADEIA DUPLA DESEMPARELHADO PARA O TRATAMENTO DESTAS AFECÇÕES"

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, 12280 Wilkins Avenue, Rockville Maryland 20852.

Descrição referente à patente de invenção de HEM RESEARCH, INC., norte-americana, industrial e comercial, estabelecida em 12280 Wilkins Avenue, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos da América, (inventor: William A. Carter, residente nos E.U.A.), para "PROCESSO PARA A DETECÇÃO DE AFECÇÕES NEURO-COGNITIVAS ASSOCIADAS COM DISFUNÇÕES IMUNOLÓGICAS SISTÉMICAS E PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM ANR DE CADEIA DUPLA DESEMPARELHADO PARA O TRATAMENTO DESTAS AFECÇÕES".

D E S C R I Ç Ã O

Referências cruzadas a pedidos de Patentes relacionadas

O presente pedido de Patente é em parte uma continuação do pedido de Patente com o nº de série 07/421 596 depositado em 16 de Outubro de 1989.

A presente invenção refere-se a procedimentos para o diagnóstico da presença de afecções neuro-cognitivas para o tipo associado com disfunções imunológicas sistémicas e para a distinção entre as mesmas e afecções psicológicas ou neuropsiquiátricas primárias que apresentem sintomas clínicos se-

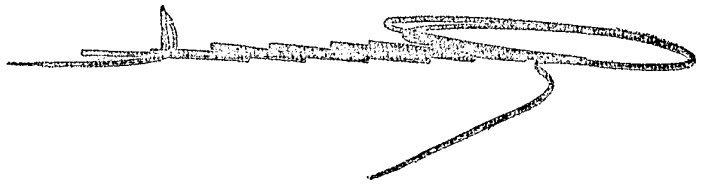
melhantes. A presente invenção inclui também o diagnóstico de demências do tipo associado com afrcções imunológicas. Descreve-se igualmente uma intervenção terapêutica contra estas condições por meio de ARNdc's.

Sumário da invenção

As manifestações do sistema nervoso central (SNC) de perda de memória, redução do quociente de inteligência (QI) e perda de capacidade cognitiva podem ser associadas com distúrbios no metabolismo da via do 2'-5'A nas células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Estes distúrbios podem assinalar a libertação subjacente e não detectada clinicamente de linfoquinas que, por sua vez, contribuem para uma sensibilidade embotada. Para além disso, estão frequentemente relacionados com infecções por retrovírus e/ou com infecções de herpes não detectadas. A infecção viral oculta contribui também para a patologia do cérebro tanto directa como indirectamente (por desencadear de modo inapropriado a produção crónica de linfoquinas). As manifestações duais de doença são diagnosticadas de um modo fácil por exame dos componentes da via 2'-5'A e terapia interventiva com ARNdc's que neutralizam biologicamente a toxicidade das linfoquinas reduzindo simultaneamente a carga viral intrínseca.

Verifiquei que certas demências são resultantes de uma activação imunológica continuada a seguir a uma infecção por vírus não resolvida, que perpectua a perda de memória. Observei também mau estar e depressão. Os níveis elevados no soro de várias linfoquinas, como por exemplo IL-2, IL-6, TNF e interferão, estão associados com as defesas do corpo e parece que estas moléculas (isolada ou colectivamente) contribuem para a sintomatologia.

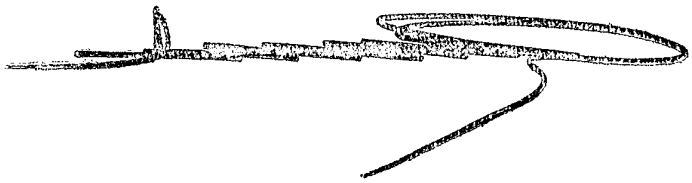
A etiologia mal definida das demências (doença de Alzheimer, etc.) contribuiu até agora para uma dificuldade na descoberta de um tratamento eficaz para esta afecção. Em consequência, eu desenvolvi uma nova estratégia: em primeiro lu



gar definir um fenotipo celular anormal nos doentes de demência que possa ter como resultado uma regulação significativamente anormal sobre várias afecções imunológicas incluindo infecções virais, sem ter em conta a natureza específica do organismo de incitação, e m segundo lugar determinar se o fenotipo anormal poderia ser encontrado em certas vias enzimáticas intracelulares que confiram um estado antiviral imunomodulatório sobre as células humanas, incluindo tecidos do cérebro. Astas vias são conhecidas e incluem a via de sintetase de 2-5A/RNase L dependente de ARNdc e a via da quinase proteica dependente de ARNdc. Estas vias enzimáticas são activadas ou desactivadas por meio de vários vírus animais bem como por produtos secundários de infecções virais, como por exemplo interferão ou ARNdc (ARN de dupla cadeia). As vias, quando reguladas de modo adequado, induzem resistência celular a uma ampla variedade de agentes patogénicos porque os produtos bioquímicos resultantes podem interferir com a síntese e estabilidade dos componentes dos agentes patogénicos. Refiro-me aqui às vias enzimáticas como vias "antivirais", mas deve notar-se que estas vias também têm sido referidas como tendo influência na diferenciação de células imunes.Em particular, estas vias podem participar na activação de células T, de células B e de monócitos ou das suas células precursoras.

Verifiquei anteriormente anormalidades na via da sintetase de 2-5A/RNase L in vivo numa outra infecção humana crónica por vírus (ref. 1). Por exemplo, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e acompanhada por níveis anormalmente elevados de sintetase de 2-5A, níveis reduzidos de 2-5A bioactivo e níveis baixos ou nem sequer detectáveis de RNase L (ref. 1). Este fenotipo está em concordância com uma via antiviral relativamente inactiva devido à falta de activação adequada de 2-5A e à consequente ausência do produto de sintetase de 2-5A, o 2-5A.

No meu presente estudo de pacientes de demência, identificou-se também o vírus do herpes com anticorpos monoclonais em alguns pacientes, conforme se discute seguidamente,



enquanto que os restantes foram sujeitos a uma verificação com soros que continham anticorpos de vários vírus de herpes,. Por conseguinte, referir-me-ei a alguns pacientes de demência como "positivos em relação a vírus por cultura", e não como positivos a HHV-6. Foram também isolados novos retrovírus destes e de outros pacientes com uma patologia semelhante do SNC.

Descrição Pormenorizada da invenção

Verifiquei e descrevo seguidamente que existe uma via de sintetase de 2-5A/RNase L hiperactiva ou aberrante em indivíduos que apresentam qualquer demência crónica associada com distúrbios metabólicos, defeitos neuro-cognitivos ou disfunção cerebral crónica (DCC). Esta afecção é frequentemente acompanhada de outras anormalidades de tecidos extensos, como lesões cerebrais reveladas por técnicas de visualização bem como por defeitos cognitivos como por exemplo perda de QI e baixa de capacidade de atenção e de abstracção. Para além disso,a função natural das células destruidoras e o fenótipo das células NK (killer cell) são com frequência pouco habituais nos pacientes com DCC.

Estas afecções são tratadas com eficácia com uma terapia de ARNdc que normaliza e ajusta favoravelmente a via da sintetase de 2-5A/RNase L e restaura um deficit de ARNdc no paciente. Verificam-se melhoras tanto no nível celular como no nível funcional, com recuperação de valores da memória e do QI para cerca dos valores anteriores enquanto que a tolerância do exercício e o consumo de oxigénio são aumentados. Os pacientes com disfunções cerebrais crónicas são examinados por meio de várias técnicas e de vários procedimentos conforme explicado seguidamente.

Estudo da demência crónica grave

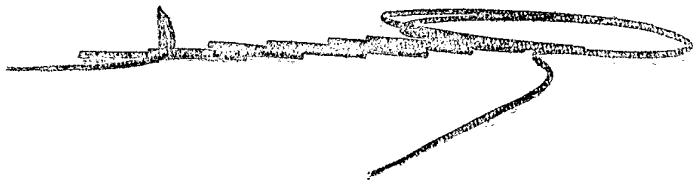
Administraram-se a 15 pacientes com demência crónica grave 200 a 400 mg de Ampligen(R), um ARN de dupla cadeia desemparelhado com efeitos secundários mínimos, duas vezes

por semana durante períodos até um máximo de 24 semanas. Atingíram-se níveis sanguíneos de 30 a 50 µg/ml de Ampligen(R). Mantiveram-se níveis de 10 µg/ml durante uma hora ou mais na maioria dos pacientes. Todos os 15 pacientes apresentavam componentes anormais da via de sintetase de 2-5A/RNase L nas células do sangue periférico. Os componentes desta via voltaram a valores mais normais durante o tratamento com Ampligen(R). Por exemplo, as concentrações de 2'-5' oligoadenilato bioactivo eram 3 a 665 vezes o normal (média = 242) antes do tratamento e baixaram em 13 pacientes para níveis normais de 12 semanas. Em 13 de entre 14 pacientes examinados, obtiveram-se igualmente provas de redução de vírus susceptíveis de serem cultivados durante a terapia e em 11 pacientes detectaram-se HHV-6 (vírus de herpes humano 6) e/ou novos retrovírus com anticorpos monoclonais. Os 15 pacientes apresentaram um aumento significativo na capacidade de desempenho, segundo se avaliou pela melhoria dos índices de Karnofsky, e a maior parte apresentaram melhorias persistentes no que se refere à memória, ao QI e a outros testes psicométricos.

Não se verificaram efeitos de toxicidade com qualquer significado clínico. Embora se tenham verificado ligeiros sintomas semelhantes ao de uma gripe, a terapia por meio de ARNdc desemparelhado foi bem tolerada e não se tornou necessária qualquer redução de dosagem.

Na maioria dos pacientes com demência, a anormalidade tomou a forma de níveis reduzidos de sintetase de 2-5A latente e níveis elevados de 2-5A bioactivo e de RNase. ESte fenotipo, que era nitidamente diferente do que se segue a uma infecção por HIV, sugeria uma hiperactividade de uma via antiviral que resultava do sobre-estímulo crónico da sintetase de 2-5A. Descrevi na presente memória descritiva algumas melhorias clínicas e virológicas em pacientes de demência que possuem algumas destas anormalidade da via antiviral da sintetase de 2-5A/RNase L durante o trayamento com Ampligen(R), um prtótipo de ARNdc.

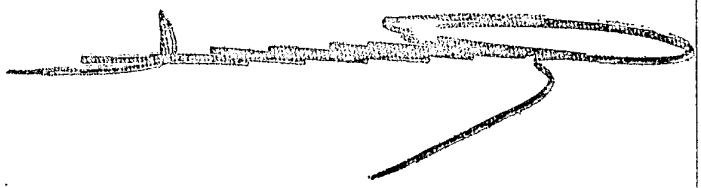
Pacientes - Os pacientes tinham de preferência índices de Karno



fsky de 60 ou inferiores. Os pacientes apresentavam demência debilitante grave persistente (ou recorrente) em grau suficiente para reduzir ou prejudicar a actividade diária média abaixo de 50% do seu nível de actividade pré-mórbido durante um período de pelo menos 24 meses, sem outras condições clínicas que pudessem ter produzido sintomas semelhantes. Uma verificação médica completa excluiu outras causas possíveis incluindo tumores cerebrais, anormalidades vasculares, depressões situacionais ou outras afecções psiquiátricas primárias, bem como doenças infecciosas de origem não viral. Todos os pacientes apresentavam provas de demência por resultados inferiores ao normal na escala de memória de Wechsler e resultados inferiores às expectativas na escala completa de QI (Escala de Inteligência de Adultos de Wechsler - revista, EIAW-T), com base nos antecedentes académicos e/ou nos resultados de testes semelhantes anteriores do paciente. Para além disso, estes indivíduos apresentavam um desvio de valores superior ao normal nos resultados de tarefas individuais no teste de EIAW-R. Normalmente os pacientes apresentavam uma imagem de ressonância magnética (IRM) por varrimento anormal do cérebro no aparelho de IRM de varrimento Tesla 1.4.

Regimes de fármacos - Os pacientes receberam de início doses de 200 mg de Ampligen(R) (HEM Research, Rockville, MD. EUA); administrado por via intravenosa duas vezes por semana durante vários períodos de tempo (ver Quadro 1), depois do que a dose foi elevada para 400 mg duas vezes por semana.

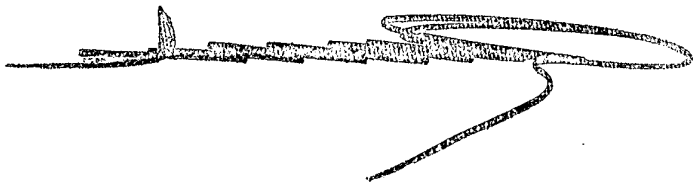
Medições da via de 2-5A e culturas de vírus - Estas medições foram levadas a efeito em amostras identificadas apenas por códigos em laboratórios centrais. A via antiviral de sintetase de 2-5A/RNase L foi estudada como se segue. Purificou-se sintetase de 2-5A a partir de extractos de CMSP por cromatografia de afinidade em agarose de poli(I).poli(C) (ref. 2). Por este procedimento apenas se purificou a sintetase de 2-5A latente, uma vez que a enzima ocupada pelo ARNdc não se ligou. A percentagem de conversão de ATP em 2-5A, medida por cromatografia em camada fina, foi então usada para quantificar a actividade da sintetase



de 2-5A latente purificada por afinidade. A actividade de RNase L em extractos de CMSP foi determinada por meio da sua capacidade para cindir o ARN ribossónico (ARNr) em produtos de cisão específicos, medidos por electroforese (ref. 3). Astas análises fotam quantificadas por varrimento densitométrico e os resultados foram expressos em % de ARNr 18S cindido/diluição do extracto. Recuperou-se 2-5A a partir dos extractos de CMSP por extracção com etanol. Estimou-se em seguida o 2-5A bioactivo por meio da sua capacidade para activar a RNase L latente para desgradar poli(U) [$^{32}P_pC_p$] em produtos solúveis em meio ácido.

Encontra-se descrita em geral a cultura de vírus (ref. 4) para vírus de herpes. As medições incluiram a preparação de células mononucleares de sangue periférico a partir de pacientes e a cultura destas por períodos até 30 dias, o exame periódico das culturas para verificar a presença de células gigantes características da infecção por vírus de herpes. A presença de vírus nas células gigantes foi confirmada em alguns pacientes por imunofluorescência, usando soros de pacientes com títulos relativamente elevados de anticorpos contra o vírus de herpes-6 humano (HHV-6). Usaram-se também anticorpos monoclonais específicos de HHV-6. Relacionou-se o número de células gigantes obtidas após cultura com a carga de vírus in vivo. A fim de quantificar a carga de vírus, deu-se a pontuação 2^+ às culturas que apresentavam 10% células gigantes em relação ao número total de células, às quais se apresentavam entre 0% e 10% de células gigantes deu-se a pontuação de 1^+ e às que não apresentavam células gigantes deu-se a pontuação de 0. Avaliaram-se também as diminuições nas cargas de vírus por monotorização da frequência de culturas negativas após tratamento com Ampligen$^{(R)}$

Níveis de ARNdc no sangue - Determinaram-se os níveis de Ampligen$^{(R)}$ no sangue conforme descrito (ref. 5). Misturou-se sangue heparinizado (100 µl) com 162 µl de GuSCN 6 M/edta 0,1 M de PH 8 e incubou-se com uma sonda de poli(C) marcada com ^3H. Após hibridação, eliminou-de a sonda não emparelhada com RNase e a sonda hibridada foi precipitada e separada por filtração. A quanti

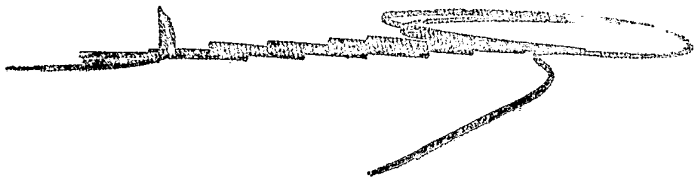


dade de sonda hibridada foi convertida na quantidade equivalente de Ampligen(R) por referência a uma curva padrão constituida por quantidades conhecidas de Ampligen(R) adicionadas a sangue heparinizado e processadas conforme descrito anteriormente. A fim de medir a eliminação de Ampligen(R) a partir do sangue, colheu-se sangue em vários momentos após o fim da perfusão do braço oposto ao usado para a perfusão.

Testes neuropsicológicos - Cada paciente completou uma bateria de testes funcionais cognitivos/neuropsicológicos incluindo o teste de QI de escala integral de Eiaw-R, bem como os testes neuropsicológicos de Halstead-Reitan e os componentes Verbal Imediato, Verbal Diferido, Visual Imediato e Visual Diferido da Escala de Memória de Wechsler. As pontuações de Memória de Wechsler aqui referidas são equivalentes a pontuação Verbal x 2 mais pontuações visuais. A fim de evitar um "efeito de treino" potencial, foram sendo sucessivamente introduzidas formas alternativas da Escala de Memória de Wechsler.

Teste de exercício da "gaiola de esquilo" - Alguns pacientes, se bem que não todos, com demência, possuem uma profunda incapacidade para executar exercícios de rotina. As melhorias terapêuticas na função do SNC estão frequentemente associadas com as actividades mais normais da vida diária incluindo exercício crescente. O teste de tolerância ao exercício da gaiola de esquilo foi conduzido de acordo com o Protocolo de Bruce Modificado, tendo a capacidade aeróbica sido estimada de acordo com as equações normalizadas por permuta de gás expirado com eléctrodos de O_2 e CO_2. O consumo de O_2 foi medido no limiar anaeróbico a fim de eliminar o factor de motivação.

A primeira doente de demência a receber Ampligen(R) era uma doente crónica que apresentava uma debilitação progressiva, tendo deste modo uma esperança de vida limitada. Especificamente, embora este doente tivesse sido anteriormente uma jogadora profissional de golfe, estava incapacitada de tomar conta de si própria havia já aproximadamente cinco anos,não



era capaz de caminhar 7,5 m sem auxílio e era acometida por ataques com frequência crescente. Não era capaz de ler nem sequer de seguir a televisão devido à falta de memória a curto prazo. Esta doente apresentava uma disfunção das NK, uma cultura de vírus positiva, um varrimento de IRM anormal, ensaios psicométricos marcadamente deteriorados e baixa tolerância ao exercício (Quadro 1). Após 8 semanas do início da terapia esta doente apresentava uma redução dos vírus em circulação. O índice de Karnofsky melhorou de 30 antes da terapia para 80 após ter recebido Ampligen(R) durante 24 semanas. As melhorias clínicas verificaram-se nas áreas dos testes psicométricos e da tolerância aos exercícios (Quadro 1 e Quadro 3). A paciente teve melhoras estáveis e está mantendo uma vida normal e completamente auto-suficiente, tendo estado submetida a terapia com Ampligen(R) durante 18 meses consecutivos.

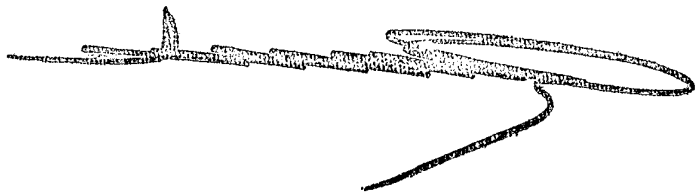
Alterações virológicas imunomodulatórias - Incluindo o paciente 00, todos os 15 pacientes apresentavam uma via antiviral perturbada nas células mononucleares do sangue periférico. Especificamente, os 15 pacientes tinham níveis de 2-5A bioactivo alterados nas células mononucleares sanguíneas. Esta circunstância era corroborada por uma actividade de RNase L alterada em 13 pacientes. Dose pacientes tinham também níveis de sintetase de 2-5A latente alterados nas células do sangue periférico no início da terapia. No total 11 casos tinham um fenotipo de via antiviral antes da terapia caracterizado por; (a) baixos níveis de sintetase 2-5A latente,acompanhados por (b) quantidades aumentadas de 2-5A bioactico de 2-5A bioactivo e (c) actividade anormalmente alta de RNase L. Chamo a este ensaio o "fenótipo do perfil 1", um fenótipo que está de acórdo com a estimulação crónica da via devido a linfoquinas extracelulares. Dois pacientes, os pacientes 01 e 06, apresentavam níveis elevados de sintetase de 2-5A latente acompanhados por quantidades elevadas de 2-5A bioactivo e níveis de RNase L normais ou elevados ("fenótipo de perfil 2"). Foram relatados níveis elevados específicos de sintetase de 2-5A tardia com infecção por vírus de Epstein-Barr (EBV) e esta circunstância pode indicar uma infecção co-

activa nos pacientes 01 e 06. A reactivação do EBV nos pacientes 01 e 06 foi confirmada por análise sorológica.

Durante o tratamento com Ampligen(R), a via de 2-5A voltou ao fenótipo normal. Em 13 pacientes, os níveis de 2-5A bioactivo baixaram para o normal durante 12 semanas e baixaram ainda nos outros dois, enquanto que as actividades de RNase L se reduziram significativamente para apenas 1 a 2 vezes o normal (Quadro 2). Na maioria dos pacientes, os níveis de sintetase de 2-5A latente aumentaram para o normal em 12 semanas (Quadro 2), mas diminuiram novamente no período seguinte. Muitos pacientes eram positivos em relação à cultura de vírus no limiar de detecção. Os títulos de vírus reduziram-se durante o tratamento com Ampligen(R) na maioria dos pacientes. Para além disso, os pacientes 02, 03, 04, 06 e 10 tornaram-se negativos em três culturas sucessivas após 28 a 40 semanas com Ampligen(R). O perfil da via antiviral associado com baixos níveis de sintetase de 2-5A latente (perfil 1) era acompanhado por uma redução mais rápida na carga de vírus durante a terapia; no entanto a carga de vírus diminuiu em 10 dos 11 pacientes ensaiados durante 24 semanas de terapia, independentemente do fenótipo no início do estudo (Quadro 1). A capacidade do ARNdc para reduzir simultaneamente o nível de diferentes agentes virais (rectrovírus e vírus de ADN) presente no paciente contribui para a grandeza da resposta.

Estado de Capacidade e Tolerância ao Exercício - Os pacientes no início do estudo estavam significativamente incapacitados com um índice de Karnofsky de 47. O índice médio melhorou para 67 após 12 semanas de terapia e para 79 nos 11 pacientes analisados às 24 semanas (Quadro 3).

Alguns pacientes participaram no teste da gaiola de esquilo antes e durante o tratamento com Ampligen(R). O período de tempo máximo de realização do exercício da gaiola de esquilo e o consumo máximo de O_2 durante os exercícios experimentais foram determinados. Pelas 24 semanas no grupo total, a duração do exercício da gaiola de esquilo aumentou em média 20% e



o consumo máximo de O_2 duplicou durante o exercício. doze dos quinze pacientes aumentaram o consumo de O_2 de mais de 50% (Quadro 3). Um paciente (01) melhorou apenas 10% às 24 semanas e um paciente (09), do qual apenas se dispõe de dados de oito semanas, baixou 15%. Uma vez que as medidas do consumo de O_2 foram feitas largamente no limiar de anearobicidade, as melhorias não podem ser atribuidas fundamentalmente a um aumento da motivação, como seja pelo "levantamento" de uma depressão ocasional.

Testes neuropsicológicos - Doze dos 15 pacientes apresentavam no início do estudo defeitos na memória a curto prazo, o que se podia verificar por meio da escala de memória de Wechsler. Os índices de Wechsler melhoraram 63% nestes pacientes durante o estudo. Os maiores ganhos ocorreram no desempenho verbal e não no desempenho visual, provavelmente porque o grupo começou com índices verbais mais baixos. Todos os pacientes que chegaram às 24 semanas melhoraram para os limites da normalidade na porção visual da escala de Wechsler. As melhorias no desempenho retardado da Escala de Memória de Wechsler sugerem uma melhoria na memória de interferência, um defeito notado crescentemente nas demências precoces.

Notaram-se também ganhos no QI. O QI aumentou 12% de 106 para 119 na escala integral. O QI de desempenho aumentou 19% enquanto que o QI verbal aumentou 10%. Considerando os pacientes tratados durante 24 semanas, os aumentos no QI de escala integral pareceram ser mais pronunciados durante o terceiro período de 8 semanas (8%) do que durante o primeiro ou o segundo (2 e 0%, respectivamente), sugerindo que os ganhos de QI podem ocorrer mais lentamente do que as melhorias na capacidade imunológica ou a memória de curto prazo.

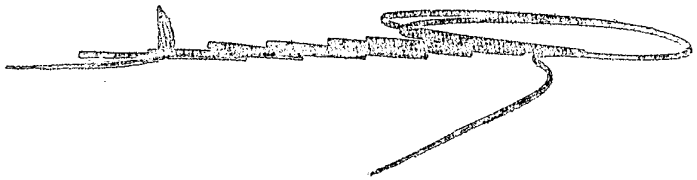
Níveis Sanguíneos de Ampligen(R) e efeitos adversos - Determinaram-se os níveis sanguíneos de Ampligen(R) por hibridação molecular. Imediatamente a seguir à perfusão de 400 mg, os níveis sanguíneos eram em média de 43 µg/ml, entre os limites de 31 e 75 µg/ml (Quadro 2). Obtiveram-se níveis sanguíneos de aproxima

damente metade destes valores por perfusão de uma dose de 200 mg. Nestes e em outros pacientes a taxa de eliminação aparente apresentava valores variados; no entanto os níveis no sangue de aproximadamente 20 µg/ml mantiveram-se normalmente durante pelo menos uma hora na maioria dos pacientes.

Não se observaram efeitos secundários clinicamente significativos em qualquer dos pacientes durante o estudo. Um paciente desenvolveu uma anemia de deficiência de ferro derivada de várias flebotomias e necessitou de receber suplementos de ferro. A maioria dos pacientes queixaram-se do aumento de sintomas de gripe, incluindo mialgias e dores de cabeça. Não houve qualquer prova de alteração da coagulação, da química do sangue, da contagem dos glóbulos brancos, da função do fígado e renal ou de outras anormalidades durante o decurso do estudo.

Os pacientes apresentaram sinais de melhorias clínicas e de melhor funcionamento cerebral. As primeiras melhoras estavam relacionadas com a normalização da via antiviral da sintetase de 2-5A e com o número de células $NKH1^{+}$ bem como com reduções na carga aparente de vírus nas células de sangue periférico. Num paciente (05) que recebeu Ampligen$^{(R)}$ durante apenas 8 semanas, os títulos de vírus não baixaram durante o período de estudo imediato. Este paciente também apresentava uma correcção da anormalidade da via antiviral. O paciente 01 apresentou uma melhoria do índice de Karnofsky durante as primeiras 24 semanas, com uma deterioração em outras categorias. Este paciente não tinha a mesma anormalidade da sintetase de 2-5A que caracterizava 13 dos outros 14 pacientes. O paciente 01 melhorou após 24 semanas. Pelas 32 semanas o seu QI era de 138 e a sua absorção de CO_2 durante o teste da gaiola de esquilo era de 1,56 1/minuto. Dois pacientes que interromperam o tratamento com Ampligen$^{(R)}$ voluntariamente, pioraram posteriormente, de acordo com índices de Karnofsky decrescentes e diminuiram a tolerância ao exercício e a capacidade neurocognitiva.

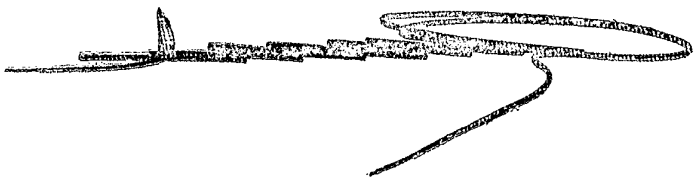
Os pacientes aqui estudados apresentavam ní-



veis significativamente alterados de 2-5A bioactivo e alterações na sontetase de 2-5A latente e RNase L activada, o que sugere um metabolismo das respectivas vias enzimáticas intracelulares alterado. Observei que este fenótipo "hiperactivo" era causado por produtos secundários da infecção por vírus, nomeadamente por reprodução crínica de citoquinas com capacidade deincitação. Uma vez que apenas uma pequena proporção de células mononucleares sanguíneas e provavelmente infectada pelo vírus nestes pacientes,a hiperactivação da via da infecção viral não é provável. De qualquer modo, o metabolismo alterado das vias da sintetase de 2-5A(RNase L é um marcador útil para a identificação de pacientes com demências crónicas não relacionadas com distúrbios primários psiquiátricos ou vasculares cerebrais.

Após a terapia com Ampligen$^{(R)}$, os níveis de 2-5A bioactivo voltaram ao normal bem como os níveis de RNase L activada. Este resultado éconsequência da restauração da produção de citoquinas mais normal ou de alterações na utilização de citoquinas das células sanguíneas. Também a actividade da via da sintetase de 2-5A/RNase L e regulada no sentido de se reduzir por meio de outra via de quinase de proteína activada por ARNdc.

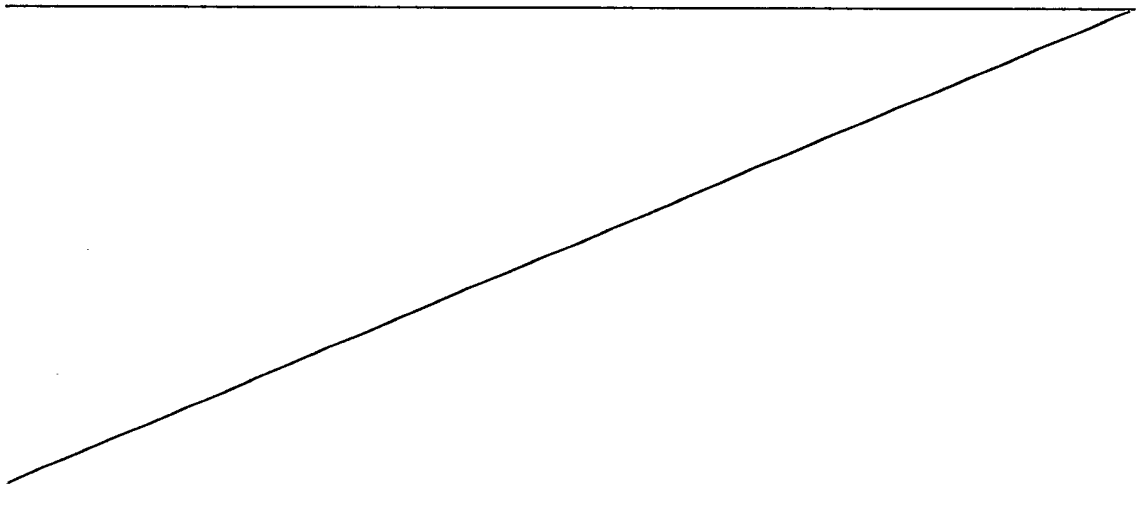
As melhoras nos sintomas clínicos foram acompanhadas por melhoras virológicas. As melhoras no índice de Karnofsky, no testede Memória de Wechsler, nos índices de desempenho e no QI foram notadas logo nos primeiros momentos em que se realizou a análise e as melhoras continuaram durante todo o período do estudo. Os ganhos mais consideráveis nos índices de Karnofsky parecem ter sido atingidos depois de as doses terem sido elevadas para 400 mg de Ampligen$^{(R)}$. O índice de Karnofsky médio inicial, 47, descrevia doentes incapazes de trabalhar e necessitando de assistência considerável para a realização das tarefas domésticas diárias. O índice de Karnofsky atingiu um patamar de 80 durante o período de estudo, o que descreve pacientes capazes de levar a efeito as actividades normais de trabalho e domésticas com esforço, mas sem assistência. O teste de memória de Wechsler apresentou os maiores ganhos relativamente

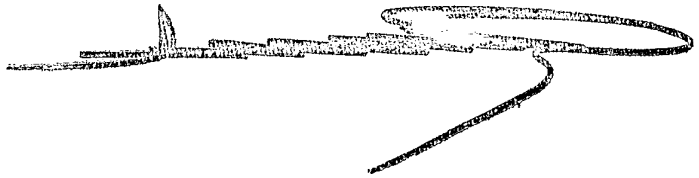


cedo (16 semanas), enquanto que os índices do teste de QI tenderam para mostrar melhorias mais tarde.

Em várias áreas, as melhoras observadas durante a terapia por Ampligen(R) foram estatisticamente significativas durante as 24 semanas. As reduções no 2-5A bioactivo e na RNase L activada eram significativas ao nível de $p<0,0001$. As melhoras nos parâmetros associados com a redução da fadiga à demência eram altamente significativas. A melhoria do desempenho no teste da gaiola de esquilo era significativa ao nível de $p<0,01$ às 16 semanas e ao nível de $p<0,001$ às 24 semanas. As melhorias nos índices de Karnofzky eram significativas ao nível de $p<0,001$ às 16 semanas e ao nível de $p<0,0001$ às 24 semanas. As melhorias no teste de memória de Wechsler eram significativas às 16 e às 24 semanas ($p<0,02$). Os aumentos de QI na escala integral eram também significativos.

A maioria dos pacientes apresentou a mesma melhoria drástica no estilo de vida que se tinha verificado com o primeiro caso. Muitos eram incapazes de tomar cuidado de si próprios e, de facto, eram desmemoriados e eram incapazes de caminhar sem assistência antes da perapia. Pelas 24 semanas, muitos dos que continuavam com a terapia estavam levando um estilo de vida mais normal. As melhoras ocorreram enquanto os pacientes estavam recebendo Ampligen(R). Para além disso, dois pacientes que tinham deixado de receber Ampligen(R) durante pelo menos dois meses, apresentaram uma deterioração neurocognitiva.





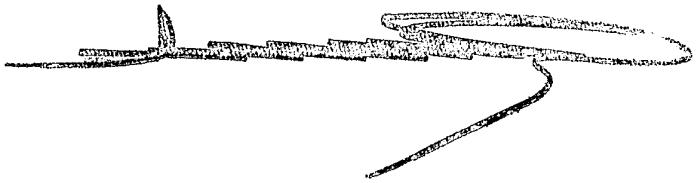
quadro 1 - PACIENTE OO

Teste	Antes	Depois
Gaiola de esquilo		
duração	1,5 min	9 min
consumo de O_2	1,15 unidades	2,35 unidades
Karnofsky[a]	30	80
Teste de memória de Wechsler[b]	0,5	2,75
QI de escala integral	88	134
Halsteadt-Reitan[b]		
bater palmas	0	3
Trilhas A	0	3
Trilhas B	0	3
Eiaw-R		
informação	11	16
envergadura digital	8	16
vocabulário	12	16
aritmética	5	14
semelhanças	9	12
desenho de bloco	5	10
símbolo digital	3	9

[a]= reconstruido a partir de cartas clínicas

[b]= 0 = grave, 1 = deterioração moderada, 2 = deterioração ligeira, 3 = entre os limites normais

[c]= 10 meses de terapia



QUADRO 2 - VIROLOGIA E NÍVEIS SANGUÍNEOS DE AMPLIGEN

Pt	sems a 200 mg	Ampligen no sangue µg/ml	Via antiviral							
			2-5A sint		2-5A RNase L		Vírus cultura			
			ant.	dep.	ant.	dep.	ant.	dep.	ant.	dep.
00	8	--	0,15	1,20	165	33	6	1	--	--
01	15	38	3,51	2,40	665	6	1	2	2	1
02	14	52	0,45	0,30	67	1	19	1	2	0[c]
03	15	47	0,30	0,60	665	1	40	1	2	0,5[c]
04	24	--	0,20	0,40	50	1	1	2	2	0,5[c]
05	10	36	0,25	1,1	200	1	13	1	1	2
06	10	42	1,57	0,9	85	1	20	2	2	0,5[c]
07	9	31	0,25	0,5	335	1	20	1	2	0,5
08	9	45	0,35	0,9	16	1	19	1	2	1,5
09	9	48	0,10	1,1	665	1	30	1	2	1,5[c]
10	9	52	0,25	0,6	165	1	30	0,5	2	0,5
11	2	35	0,50	0,56	335	1	30	0,2	1,5	0,5
12	2	75	0,40	1,37	3	1	30	0,3	1	0,5
13	2	--	0,45	0,83	50	1	10	1	2	1
14	2	--	0,10	0,28	167	1	30	2	2	1,5

[a] = Fracção da média normal. Depois = 12 semanas. Obtiveram-se resultados semelhantes às 24 semanas.

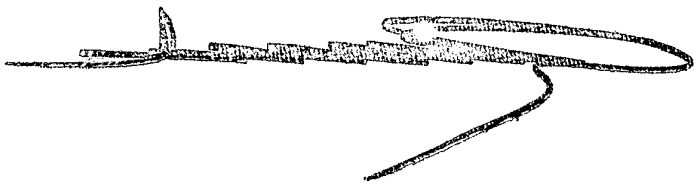
[b] = Calculado conforme descrito em métodos, os valores da cultura de vírus eram em média de culturas sucessivas em dois dias sucessivos antes do início do tratamento (antes) ou nas semanas 20 e 24 durante o tratamento (depois). Os valores "depois" dos pacientes 11 a 14 representa as últimas duas determinações, tomadas entre as semanas 8 e 16.

[c] = Tornou-se negativo em 3 ocasiões sucessivas após 24 semanas.

QUADRO 3 - PARÂMETROS CLÍNICOS

Pacien	Karnofsky			VO_2 Gaiola de esquilo (l/min)		Índice de memória de Wechsler		QI	
	antes	12 sem	14 sem	ant.	dep.	ant.	dep.	ant.	dep.
00	30	60	80	1,15	2,36	11	63[o]	88	134
01	60	60	80	1,07	1,15	91	64	146	124
02	40	50	80	0,21	1,31	64	64[b]	122	124[a]
03	40	70	80	0,21	1,13	29	73	117	150
04	50	70	80	1,85	3,56	58	73	103	121
05	50	60	70	0,32	0,57[a]	14	50[b]	98	101[b]
06	60	70	80	0,60	2,35	18	40	106	116
07	50	60	80	1,86	3,08	68	87	117	131
08	60	70	80	0,87	2,17	34	53[a]	94	102[a]
09	40	50	70	0,90	0,78[a]	40	46[b]	95	102[b]
10	50	--	80	0,60	1,52	64	79[b]	119	127
11	50	80	80	0,33	1,27[a]	--	--	84	96[a]
12	40	80	80	0,21	1,34[b]	39	57[b]	96	109[b]
13	60	80	80	1,28	1,67[b]	77	89[b]	116	139[b]
14	20	80	80	0,06	1,31[b]	24	69[b]	89	108
média	47	67	79	0,76	1,70	38[f]	62[f]	106	119

[a] = até 8 semanas apenas; [b] = até 16 semanas apenas;
[c] = até 32 semanas ou até 60 semanas (não se dispõe do ponto das 24 semanas).
[f] = pacientes com índice de Memória de Wechsler anormal no início (excluindo os pacientes 1, 11 e 13).

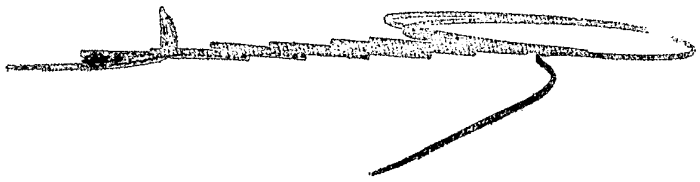


Estudo da disfunção cerebral crónica

Estudei também um grupo de pacientes que sofriam de uma síndrome cerebral orgânica caracterizada por disfunção cerebral, alguns já havia mais de 15 meses. A seguir a um episódio semelhante a uma infecção. Estes doentes desenvolveram uma nova disfunção imune pós-infecciosa caracterizada por deterioração mental progressiva, associada com lapsos de memória, ataques ocasionais e perda da capacidade mental superior (as chamadas funções cognitivas). A Imagem de Ressonância Magnética (IRM) do cérebro, efectuada em doentes que se queixavam de problemas cognitivos,mostrou várias anormalidades de altas intensidades de sinal, incluindo áreas almofadadas extensas concordantes com edema ou desmielização. As células do sangue periférico apresentavam deficiências enzimáticas numa nova via antiviral designada via do 2-5A ligado a ARN de dupla cadeia (dc)/ /RNase L. O tratamento com uma origem exógena de ARNdc causou uma melhoria na função cognitiva, no desempenho e na IRM e a perda do deficit de 2-5A.

A disfunção cerebral crónica (DCC) pode ocorrer em virtualmente qualquer grupo de idades e está frequentemente associada com um episódio anterior de uma doença infecciosa que se pensa ser de natureza viral. A disfunção cerebral crónica pode ocorrer a seguir à mononucleose (ref. 6), brucelose (ref. 7) ou infecções do tipo de herpes 6, bem como de outros factores.

Perda das funções cognitivas - Como com o estudo relatado anteriormente, existem vários instrumentos neuropsicológicos e eu usei estes instrumentos para estudar e definir um sub-conjunto de pacientes com disfunções cerebrais crónicas. Uma bateria de testes típica usada incluia a Escala de Inteligência de Adultos de Wechsler Revista (EIAW-R), a Escala de Memória de Wechsler, Imediata e Retardada (EMW), o Inventário de Personalidade Multifásico de Minnesota (IPMM) e testes semelhantes. Os doentes de DCC normalmente têm resultados dos testes que mostram 2 desvios

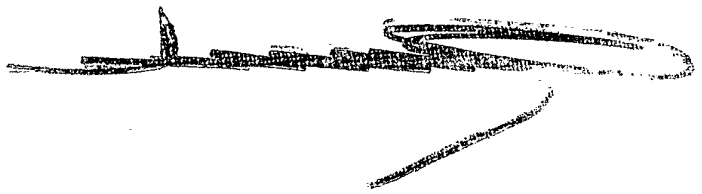


padrão ou mais abaixo da média; alguns pacientes têm uma média de todos os resultados que apresentam um desvio padrão ou mais abaixo da média e um paciente tinha resultados múltiplos que estavam pelo menos 4 desvios padrão abaixo da média. Observei também com frequência que a "capacidade de abstracção" e o desempenho em "tarefas de permuta de conjuntos" também estavam deteriorados. A deterioração da memória parece ser uma consequência de uma dificuldade com a atenção e a abstracção. Vários pacientes eram incapazes derealizar tarefas tão simples comofazer o balanço dos seus livros de cheques ou colocar uma chave da porta da rua na fechadura na posição correcta. Estes deficits cognitivos mesuráveis e consistentes não são com toda a probabilidade causados por fingimento ou por razões puramente psicológicas uma vez que são muitas vezes associados a um percurso descendente no qual o paciente chega a um estado de acamado e quase de moribundo. Descobri também um novo defeito bioquímico associado com esta doença.

Imagem de Ressonância Magnética do Cérebro - A maioria dos pacientes de que foram obtidas imagens de RM queixavam-se de problemas cognitivos. As imagens de RM para o presente estudo foram em geral efectuadas usando um aparelho de Imagens de Ressonância Magnética com um supercondutor de 1,5 T produzido pela companhia General Electric.

77% dos pacientes examinados tinham imagens de RM anormais: áreas pontuadas primárias de sinal de alta intensidade e por vezes áreas extensas almofadadas de alta intensidade de sina, em concordância com um edema focal e/ou com desmielização. A matéria branca subcortical estava frequentemente afectada, mas viam-se lesões também na matéria branca profunda.

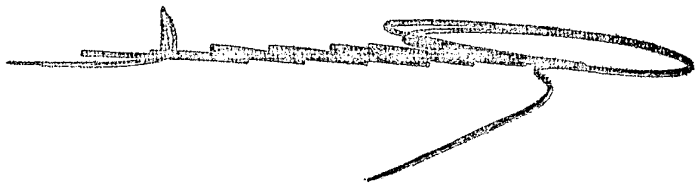
Existia uma correlação entre a área anatómica e a apresentação clínica; por exemplo, um paciente com ataxia tinha lesões que abrangiam o cerebelo, nove pacientes com sintomas visuais tinham lesões que abrangiam o cortex occipital, um paciente com paresia tinha uma lesão que abrangia a cápsula in-



terna contralateral. Nos vários casos em que se repetiu a análise por IRM, as lesões eram persistentes até que eu intervim com a terapia de ARNdc.

Fenótipo e função de células NK (Destruidoras Naturais = Natural Killer): uma afecção imunológica - O fenótipo e a função das células NK são com frequência de fenótipos pouco habituais: a subpopulação normalmente predominante NKH1 + T3 (um subtipo de linfócitos determinado com anticorpos monoclonais) pode ser diminuido, mas era normal em indivíduos tomados para comparação incluindo pacientes com depressões situacionais de natureza transiente que frequentemente apresentam melhoras com fármacos estimulantes, mudança de ambiente, exercício, etc.. Também a função das células NK (actividade citolítica contra várias linhas de células visadas) era generosamente reduzida em pacientes, mas nolmalmente não nos indivíduos do grupo de comparação. Esta actividade citolítica deficiente era particularmente notável após estimulação com interleuquina-2 e quando a linha de células visada era uma linha de células infectada por EBV (vírus de Epstein-barr) (LAZ 388). Realizei agora a primeira série de estudos com estes pacientes e observei que as anormalidades fenotípicas e funcionais nas células NK se alteraram à medida que o estado clínico dos pacientes melhorou a seguir ao tratamento com uma fonte de ARNdc exógeno.

Defesas antivirais e estudos virológicos - Observei também que a maioria destes pacientes estavam infectados com herpes-6, uma classe relativamente nova de vírus de herpes apenas recentemente descrita (ref. 4, discutida acima), e nunca antes associada com a perda das capacidades de memória. Estudos anteriores encontraram o vírus em doentes com cancro. O vírus tinha sido designado anteriormente por HBLV (vírus dos linfócitos das células B humano = human B cell lympfocyte virus) ou HBV-6 (vírus de herpes humana 6). As principais características deste vírus são a sua simetria icosaédrica com cerca de 162 capsómeros e uma membrana lipídica. As células infectadas desenvolvem células refractivas de grande dimensão e alguns pacientes podem ter



até 20 a 30% ou mais dos seus linfócitos em circulação (um certo tipo de linfócitos de linhagem da medula óssea ou do timo) infectados. A seguir a uma terapia com ARNdc durante vários meses, a percentagem de células infectadas decresceu dràsticamente e esta descida esteve associada com a melhoria clínica das capacidades cognitivas. Verifiquei também a presença de vírus de EB (Epstein-Barr) em muitos destes pacientes bem como um novo rectrovírus semelhante (embora geneticamente diferente) ao HIV, um rectrovírus que causa a síndrome da imunodifiência adquirida ou SIDA.

Especimens de vários pacientes estudados por mim indicam a possibilidade intrigante de "pseudotipologia" como um meio de alastramento da doença. Por "pseudotipologia" eu refiro-me, por exemplo, ao invólucro de um vírus de herpes tipo 6 rodeando o material genético de um retrovírus. Esta circunstância daria origem a uma nova forma de contágio em que o agente infeccioso alastra epidemiologicamente através da população como um vírus de herpes mas em que a informação genética que se alastra é na realidade a de um retrovírus. Utilizei várias sondas genómicas (ref. 8) acopladas com considerações serológicas e morfológicas (ref. 9), a fim de elucidar novo mecanismo de alastramento biológico que provoca em última instância a deterioração mental é a morbilidade.

Estudei também a via de 2-5A/ RNase L em linfócitos de sangue periférico de 10 pacientes que tinham DCC com lesões visíveis por IRM e com deficits neurológicos associados com uma diminuição do quociente de inteligência. Na primeira fase do estudo, observei as defesas antivirais de pacientes apenas com quocientes de inteligência (QIs) iguais ou menores que 105 cuja ocupação anterior sugeria fortemente um QI pré-mórbido superior; em muitos pacientes fui capaz de localizar provas tangíveis que revelagam um QI superior meses ou anos antes da presente doença cerebral.

Oito de dez pacientes apresentavam RNase L hi

peractiva ou aberrante que causava uma cisão tão natural (inesperada) do ARN ribossónico numa análise normal em gel de poliacrilamina (PAGE). Para além disso, estes oito pacientes tinham níveis de sintetase de 2-5A inferiores ao normal antes da terapia. Estes pacientes responderam de modo extraordinário à terapia com ARNdc em termos de melhoria do QI, da IRM, etc., enquanto que dois pacientes sem o defeito bioquímico tiveram respostas mínimas.

Q A D R O 4

Respostas coordenadas (Fisiológicas, Bioquímicas e cognitivas)
em pacientes com disfunção cerebral)
com lesões da via de 2-5A/RNase L

A. Os pacientes tinham um QI reduzido. A seguir à terapia com ARNdc (200-700 mg cada 2 ou 3 dias administrados por via IV) o QI melhorou até 50 pontos num período de 6 a 9 meses.

B. A IRM estabiliza ou melhora.

C. Os resultados dos testes EIAW-R, EMW e IPMM melhoram num período de a 18 meses em muitos casos.

D. As células NK (destruidoras naturais) e o estado imunológico estabilizam-se ou melhoram.

E. A "carga" virológica decresce como se verifica pelo decréscimo do número de células do sangue periférico que contêm partículas infecciosas do vírus de herpes 6.

F. Melhoria do desempenho associada com uma melhor tolerância ao exercício (capacidade prolongada de ficar na gaiola de esquilo) e melhor consumo de oxigénio.

G. A correcção do defeito da via de 2-5A/RNase L é frequentemente um <u>indicador guia</u> que precede a resposta clínica de 4 a 12 semanas ou mais.

O diagnóstico é conduzido de modo conveniente a partir de uma amostra do sangue dos pacientes a fim de analisar as células do sangue periférico para o 2-5'A enzimaticamente deficiente usando os procedimentos descritos por Carter et al. em The Lancet, (ref. 1). A aberração notada anteriormente è comparada com os resultados do teste de indivíduos que de outro modo seriam saudáveis e é corrigido para administração exógena de ARNdc, de preferência de um ARNdc desemparelhado, a fim de melhorar a condição clínica do paciente e restaurar as capacidades cognitivas. Durante e no momento da conclusão da terapia, o paciente é vigiado a fim de confirmar as respectivas melhoras ao nível celular, o que normalmente precede as melhoras clínicas de várias semanas, e a fim de determinar a quantidade de ARNdc, no caso de nãoser nula, necessária para manter uma via de sintetase de 2-5'A/RNase L normal e de restaurar/manter as capacidades cognitivas do paciente.

Procedimentos de diagnóstico -

A concentração in vivo de moléculas de 2'-5'A em indivíduos normais e em pacientes com disfunção cerebral crónica é avaliada como se segue: Analisaram-se fracções solúveis em etanol de amostras dos pacientes (linfócitos do sangue periférico purificados por Ficoll-Hypaque) para verificar o conteúdo em 2'-5'A em análises em celulose com núcleo de 2'-5'A (cromatografia de afinidade) com poli U-(^{32}P)-pCp. Nesta análise, usa-se a capacidade da RNase L activada por 2'-5'A para hidrolisar poli(U) a fim de determinar a concentração de 2'-5'A funcional.

Os valores de referência foram estabelecidos por análise de 15 indivíduos normais sem qualquer história recente de infecções a vírus de acordo com o indicado por ausência de febre e de sintomas constitucionais, exantemas, etc., As concentrações dos respectivos níveis de 2'-5'A nos linfócitos foram determinadas usando curvas de calibração obtidas com moléculas de 2'-5'A autênticas.

O ARNdc pode ser um complexo de um poliinosinato e um policitidilato que contém uma proporção de bases de uracilo ou de bases de guanidina, por exemplo, de 1 em 5 até 1 em 30 destas bases (poli I - poli(C_{4-29}x U ou G)).

O ARNdc pode ser da fórmula geral $rI_n.r(C_{11-14},U)_n$ ou $rI_n.r(C_{12},U)_n$. Outros exemplos adequados de ARNdc são discutidos seguidamente.

Por "ARNdc desemparelhado" queremos significar O ARNdc em que as ligações de hidrogénio (empilhamento de bases) entre as cadeias complementares se encontram relativamente intactas, isto é, são interrompidas em média menos do que um par de bases em cada 29 resíduos de pares de bases consecutivas. O termo "ARNdc desemparelhado" deve ser compreendido em concordância.

Os ARNdc's desemparelhados preferidos para utilização na presente invenção são baseqdos em copolinucleótidos seleccionados de entre poli (C_n'U) e poli (C_n'G) em que n é um número inteiro com um valor de 4 a 29 e são análogos desemparelhados de complexos de ácidos polirriboinosínico e polirribocitidílico, formados por modificação de $rI_n \cdot RC_n$ a fim de incorporar bases não emparelhadas (uracilo ou guanidina) ao longo da cadeia de polirribocitidilato (rC_n). Em alternativa, o ARNdc pode ser derivado de poli(I)·poli(C)-ARNdc por modificação da coluna vertebral de ribosilo do ácido polirriboinosínico (rI_n), por exemplo por inclusão de resíduos de 2'-O-metil-ribosilo. Os complexos desemparelhados podem ser complexados com um polímero estabilizador de ARN, como seja com lisina e celulose. Estes análogos desemparelhados de $rI_n \cdot rC_n$, de que os preferidos são os da fórmula geral $rI_n.r(C_{11-14},U)_n$ ou $rI_n.r(C_{29},G)_n$, são descritos por Carter e Ts'o nas Patentes US 4 130 641 e 4 024 222, cujas memórias descritivas se dão como aqui reproduzidas por referência. Os ARNdc's descritos na presente memória descritiva são adequados para utilização de acordo com a presente invenção.

Outros exemplos de ARNdc's desemparelhados pa

ra utilização na presente invenção incluem:

poli (I) . poli (C_4,U)
poli (I) . poli (C_7,U)
poli (I) . poli (C_{13},U)
poli (I) . poli (C_{22},U)
poli (I) . poli (C_{20},G)
poli (I) . poli (C_{29},G) e
poli (I) . poli C_{p23} G>p

Outra classe de ARNdc's adequados para a prática da presente invenção é constituida pelos ARNdc's curtos de estrutura definida, por exemplo oligonucleótidos da fórmula:

5'fecho-$((I)_n$-fecho 3'
3'fecho-$(I)_n$-fecho 5'

em que m e n são números inteiros superiores a 5 e inferiores a 100, I é monofosfato de inosina, C é monofosfato de citidina e em que os fechos numa cadeia são complementares dos fechos na cadeia oposta, ou um oligonucleótido da estrutura

5'fecho-$[(I)_xA]_j$-fecho 3'
3'fecho-$[(C_yU]_k$-fecho 3'

em que x e y são números superiores a 5 e inferiores a 25, j e k são números superiores a 5 e inferiores a 10, I e C possuem os significados anteriormente definidos, A é um nucleótido que não é I, e U é um nucleótido cuja base emparelha com A.

Em alternativa, o oligonucleótido curto pode ter a estrutura:

5'$(I)_n$-dobradiça-$(C)_m$3'

em que n, m, I e C possuem os significados anteriormente definidos.

Estes oligonucleótidos podem ter substituições numa cadeia não complementar dos nucleótidos da cadeia oposta. De preferência estes oligonucleótidos estão estabilizados por

registos internos de heteropolímeros complementares e é desejável que o fecho ou a dobradiça ou ambos contenham regiões de heteripolímero complementar. Estes oligonucleótidos de preferência têm caudas de cadeia simples. Estes oligonucleótidos são descritos em mais pormenor no pedido de Patente US com o número de série Nº 07/181 385 depositado em 14 de Abril de 1988 cujos inventores são Gillespie e Carter e na correspondente PCT/US89/ /02172, cujas memórias descritivas se dão como aqui reproduzidas por referência.

Para além disso, a concentração e a dimensão molecular do 2'-5'A podem ser quantificados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Deste modo, podem ser usadas análises de cisão de ARN ribossomal para avaliar a funcionabilidade biológica (actividade) do 2'-5'A sintetizado pelo paciente in vivo ou para determinar o nível de RNase L activada em amostras dos pacientes. As células mononucleares do sangue periférico são as células preferidas para as análises.

Os pacientes que apresentam disfunção cerebral crónica são tratados com perfusões intravenosas de 200 a 700 mg de rI.r(C_{11-14},U) conforme necessário, por exemplo desde uma vez por semana até com uma frequência que pode atingir a administração diária e os níveis enzimáticos de 2'-5A aumentam em associação com as melhoras clínicas. A quantidade de ARNdc administrado e a frequência de administração serão guiadas pelos níveis de sintetase de 2'-5'A medidos em conjunção com as melhoras clínicas do paciente, especialmente o regresso das funções cognitivas. As quantidades de ARNdc administrado proporcionarão um nível de desde 0,01 a 1,000 microgramas de ARNdc por mililitro do sangue em circulação sistémica no paciente imediatamente a seguir à administração medidos num ponto distal em relação ao ponto de perfusão.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Processo para a determinação da presença de afecções neuro-cognitivas associadas com disfunções imunológicas sistémicas num paciente humano caracterizado por se avaliar o nível de sistetase 2'-5'A intracelular numa amostra de sangue periférico do paciente e comparar este nível com níveis pré-determinados de sintetase 2'-5'A em indivíduos saudáveis, indicando os níveis de sistetase 2'-5'A aberrantes em comparação com os indivíduos saudáveis a presença de afecções neuro-cognitivas associadas com disfunções imunológicas sistémicas.

- 2ª -

Processo para distinguir uma disfunção cerebral crónica de afecções psicológicas ou neuropsiquiátricas primárias semelhantes num ser humano caracterizado por se avaliar o nível de sistetase 2'-5'A intracelular numa amostra de sangue periférico do paciente e comparar este nível com níveis pré-determinados de síntese 2'-5'A em indivíduos saudáveis, indicando os níveis de sistetase 2'-5'A aberrantes a presença de uma disfunção cerebral crónica.

- 3ª -

Processo para a preparação de uma composição farmacêutica útil para o tratamento de disfunções cerebrais crónicas, nomeadamente quando evidenciadas por pelo menos uma per-

da parcial das funções cognitivas, de perturbações na atenção e na capacidade de abstração, por perdas de memória, por uma afecção imunológica ou por uma alteração enzimática na via 2'-5'A nas células do sangue periférico do paciente, caracterizado por se incorporar como ingrediente activo um ARN de cadeia dupla (ARNdc) desemparelhado constituido por ácido poliadenílico complexo com ácido poliuridílico.

- 4ª -

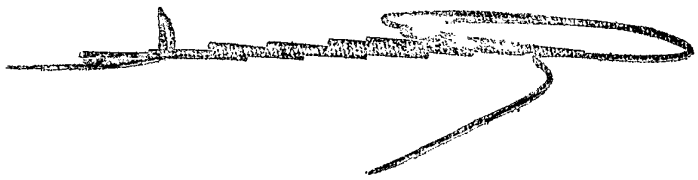
Processo para a preparação de uma composição farmacêutica útil para o tratamento de disfunções cerebrais crónicas, nomeadamente quando evidenciadas por pelo menos uma perda parcial das funções cognitivas, de perturbações na atenção e na capacidade de abstração, por perdas de memória, por uma afecção imunológica ou por uma alteração enzimática na via 2'-5'A nas células do sangue periférico do paciente, caracterizado por se incorporar como ingrediente activo um ARNdc desemparelhado constituido por um complexo de poliinosinato e policitidilato que contêm de 1 em 5 a 1 em 30 bases de uracil-guanidina.

- 5ª -

Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o ARNdc desemparelhado ser $rI_n.r(C_{11-14},U)_n$ ou o ARNdc desemparelhado conter regiões de quebra de ligação e apresentar a propriedade de proporção terapêutica favorável de $rI_n.r(C_{11-14},U)_n$.

- 6ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindi-



cações 3 a 5, caracterizado por a quantidade de ARNdc desemparelhado incorporada ser tal que resulta um nível de 2 a 1000 microgramas do ARNdc desemparelhado por mililitro do sangue na circulação sistémica do paciente.

- 7ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 6, caracterizado por o ARNdc ser um oligonucleótido curto com a estrutura definida pela fórmula:

$$5'\text{fecho}(I)_n\text{-fecho } 3'$$
$$3'\text{fecho-}(C)_m\text{-fecho } 5'$$

em que m e n são números superiores a 5 e inferiores a 100, I é o monofosfato de inosina, C é monofosfato de citidina, ou

$$5'\text{fecho-}[(I)_xA]_j\text{-fecho } 3'$$
$$3'\text{fecho-}[(C)_yU]_k\text{-fecho } 3'$$

em que x e y são números superiores a 5 e inferiores a 25, J e k são números superiores a 5 e inferiores a 10. I e C possuem os significados definidos anteriormente. A é um nucleótido que não é I e U é um nucleótido cuja base emparelha com A, ou

$$5'(I)_n\text{-dobradiça-}(C)_m3'$$

em que n, m, I e C possuem os significados definidos anteriormente,
com a condição de que os fechos numa cadeia são complementares dos fechos da cadeia oposta.

- 8ª -

Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o oligonucleótido ser estabilizado por registos internos de heteropolímero complementar e o fecho ou a dobradi-

ça ou ambos conterem regiões de heteropolímero complementar.

A requerente reivindica as prioridades dos pedidos norte-americanos apresentados em 16 de Outubro de 1989 e em 4 de Abril de 1990, sob os números de série 07/421,596 e 07/504,185, respectivamente.

Lisboa, 16 de Outubro de 1990

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE AFECÇÕES NEURO-COGNITIVAS ASSOCIADAS COM DISFUNÇÕES IMUNOLÓGICAS SISTÉMICAS E PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM ARN DE CADEIA DUPLA DESEMPARELHADO PARA O TRATAMENTO DESTAS AFECÇÕES"

A invenção refere-se a um processo para a determinação da presença de afecções neuro-cognitivas associadas com disfunções imunológicas sistémicas num paciente humano humano que compreende avaliar-se o nível de sistetase 2'-5'A intracelular numa amostra de sangue periférico do paciente e comparar este nível com níveis pré-determinados de sintetase 2'-5'A em indivíduos saudáveis, indicando os níveis de sistetase 2'-5'A aberrantes em comparação com os de indivíduos saudáveis a presença de afecções neuro-cognitivas associadas com disfunções imunológicas sistémicas.