



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 92174 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

A61K038/24 A

A61K038/04 B

G01N033/68 B

C12Q001/02 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.11.02</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1988.11.01 US 266421</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.05.31</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 05/95 1995.05.10</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> SUSAN P. PERRINE 2682 LONGUEW DRIVE RICHMOND, CALIFORNIA 94806 US NORBERT ALBERTS EDWIN-SCHARFF-RING 67 2000 HAMBURGO 60 DE</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i></p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> VASCO MARQUES LEITE ARCO DA CONCEIÇÃO 3 1/AND. 1100 LISBOA PT</p>
--	--

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA AUMENTAR A HEMOGLOBINA FETAL MEDIANTE TRATAMENTO COM ACTIVIDADE E/OU INIBINA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

61.561

File: FA. 49154-PT/RJS

2. NOV 1989

Patente Nº 92174Z

- R E S U M O -

"PROCESSO PARA AUMENTAR A HEMOGLOBINA FETAL MEDIANTE TRATAMENTO COM ACTIVINA E/OU INIBINA"

A presente invenção refere-se a um processo de inibição de conversão de  $\delta$ -globina em  $\beta$  globina em indivíduos com perturbações provocadas por  $\beta$ -globina. O processo é particularmente adaptado para melhorar os sintomas clínicos das células infectadas ou  $\beta$ -talassemias pela introdução periódica no indivíduo doente de quantidades eficazes de activina, inibina ou cadeia de inibina e misturas respectivas.

61.561

File: FA. 49154-PT/RJS

2 NOV 1969

1

Descrição do objecto do invento  
que

5

SUSAN P. PERRINE, norte-americana, industrial, residente em 2682 Longview Drive, Richmond, Califórnia 94806, Estados Unidos da América e NORBERT ALBERS, alemão, industrial, residente em Edwin-Scharff-Ring 67, 2000 Hamburgo 60, República Federal da Alemanha, pretendem obter em Portugal, para: "PROCESSO PARA AUMENTAR A HEMOGLOBINA FETAL MEDIANTE TRATAMENTO COM ACTIVINA E/OU INIBINA"

10

15

20

A presente invenção refere-se a um método para a inibição ou inversão da conversão in vivo ou in vitro de  $\gamma$  em  $\beta$ -globina aumentando desse modo a produção de hemoglobina fetal. Em particular, a presente invenção refere-se a um método para o controlo da conversão em hemoglobina fetal por introdução de activirina, inibina ou misturas correspondentes num mamífero ou em culturas eritroides.

25

30

35

A hemoglobina de adultos normais compreende uma molécula com quatro cadeias de polipeptidos, duas das quais não designadas subunidades  $\alpha$  e duas das quais são designadas subunidades  $\beta$ . As doenças conhecidas como síndromas de células doentes são associadas a perturbações na cadeia  $\beta$  da hemoglobina. Porém, em animais, e particularmente em seres humanos, durante o desenvolvimento fetal, o feto produz uma hemoglobina fetal que compreende em vez de

2 NOV 1989

1 proteínas de globina- $\beta$ , duas proteínas de globina- $\gamma$ . Ao  
mesmo tempo durante o desenvolvimento fetal ou infância,  
dependendo das espécies particulares e individuais, há o  
chamado "controlo de globina" em que os precursores de eri-  
trócitos no feto controlam a conversão predominantemente  $\gamma$ -  
5 globina em predominantemente  $\beta$ -globina. Tem-se observa-  
do, porém, que os aumentos dos níveis de hemoglobina fetal  
(derivados de  $\gamma$ -globina) melhoram a gravidade das pertur-  
bações. Tem-se observado também que os heterozigotos dos  
10 indivíduos para persistência hereditária de síndromas de  
hemoglobina fetal (HPFH) e hemoglobina de doentes (Hbs)  
são clinicamente sintomáticos de anemia das células em foice.  
Também, as crianças com anemia nas células não desenvol-  
vem normalmente os sintomas das doenças até quando os níveis  
15 de hemoglobina fetal diminuem. Estas observações sugerem  
que um método para aumentar os níveis de hemoglobina fetal  
seria benéfico para doentes com síndromas de células em  
foice.

20 É, por conseguinte, um objecto da presente  
invenção proporcionar um método para inibir ou converter a  
 $\gamma$ -globina em  $\beta$ -globina num feto ou criança para manter o  
aumento dos níveis de hemoglobina fetal nos indivíduos com  
síndromas de células em foice e  $\beta$ -talassemias.

25 A inibina é uma hormona que, entre outros  
efeitos, suprime a secreção de FSH (hormona de estimulação  
de folículo) a partir da glândula pituitária. A inibina é  
uma proteína que consiste em subunidades  $\alpha$  e  $\beta_A$  ligadas  
por ligações dissulfito. A activina, uma outra hormona, al-  
30 gumas vezes referida como factor de diferenciação de eri-  
troide (EDF) ou proteína de libertação da hormona de esti-  
mulação de folículo (FRP) é um homodímero que consiste tan-  
to em duas subunidades  $\beta_A$  de inibina (Actinina A), duas  
subunidades  $\beta_B$  de inibina (Activina B) como numa subuni-  
dade cada de  $\beta_A$  e  $\beta_B$  (Activina AB). Estas substâncias  
35

61.561

File: FA. 49154-PT/RJS

2 NOV 1989

1 estão presentes, em formas análogas, em mamíferos e têm sido referidas, por exemplo, no fluido folicular humano, porcino e bovino. A inibina dos suínos tem sido purificada e sequen-  
5 ciada a partir do fluido folicular porcino como se descreveu na patente Americana 4 740 587. O DNA que codifica as cadeias prepro inibina  $\alpha$  e  $\beta$  da inibina suína ou humana tem sido isolado, ligado em vectores de expressão e expresso em cultura de mamíferos. Veja-se o pedido de patente Europeia No. 222 491 publicado em 20 de Maio de 1987. Tem sido in-  
10 dicada a activina A para induzir a acumulação de hemoglobina numa linha de células eritroleucémicas humanas e para induzir a proliferação de células progenitoras eritroides na cultura de medula óssea humana. Veja-se Yu, et al., Nature, 330, 765 (24 de Dezembro de 1987). As estruturas e isola-  
15 mento de activina têm sido referidas por vários grupos na literatura. Veja-se Vale et al., Nature, 321: 776 (1986); Ling, et al., Nature, 321:779 (1986); Ito, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 142, 1095, (1987); Tsuji et al., Biotech. Bioeng., 31, 675 (1988); Shibata et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 146, 187 (1987).

20 Verificou-se inesperadamente, nesta invenção, que tanto a activina como a inibina podem inibir ou mesmo inverter a conversão de  $\gamma$ -globina em  $\beta$ -globina num feto ou num mamífero criança.

25 É ainda objecto da presente invenção proporcionar um agente para manter um nível elevado de síntese de cadeia (por consequência manter os níveis de hemoglobina fetal elevados) sem toxicidade significativa e efeitos secundários de longa duração.

30 A presente invenção proporciona um método para melhorar perturbações de  $\beta$ -globina em mamíferos caracterizado por compreender a introdução num mamífero de um composto seleccionado do grupo que consiste em activina, inibina, cadeia de inibina e misturas correspondentes numa quantida-  
35

61.561

File: FA. 49154-PT/RJS

-2. NOV. 1989

1 eficaz suficiente para inibir ou inverter a conversão de  $\delta$ -  
-globina em  $\sqrt{\beta}$ -globina. O método de acordo com a presente  
5 invenção é particularmente eficaz para melhorar em seres  
humanos os efeitos clínicos da doença de célula em foice.  
A invenção proporciona adicionalmente um método de diagnós-  
10 tico para detectar a doença da célula em foice caracteriza-  
do por compreender a cultura de uma amostra biológica a par-  
tir de um mamífero com uma quantidade eficaz de activina,  
inibina, cadeia de inhibina ou misturas correspondentes e a  
medição da diminuição da síntese de  $\beta$ -globina na cultura  
quando comparada com um controle.

15 A presente invenção proporciona um método  
para melhorar os efeitos clínicos das perturbações de  $\beta$ -glo-  
bina, particularmente a perturbação da anemia da célula em  
foice e  $\beta$ -talassemias. A presente invenção é vantajosa na  
medida em que os compostos utilizados podem ser factores  
fisiológicos, isto é, proteínas naturais encontradas na cor-  
20 rrente sanguínea de mamíferos e são, por consequência, quando  
introduzidas num indivíduo menos propícias a induzirem efei-  
tos secundários de longa duração indesejáveis ou tóxicos do  
que um factor não fisiológico.

25 De acordo com a presente invenção, a acti-  
vina, inhibina de mamíferos em qualquer das suas formas a-  
nálogas, ou respectivas misturas são introduzidas no indi-  
víduo (adulto, feto ou criança) de que se suspeita possuir  
uma perturbação de  $\beta$ -globina tal como doença da célula em  
foice ou  $\beta$ -talassemias.

30 Como se utiliza nesta invenção, o termo  
"amostra biológica" significa quaisquer células ou fluído  
corporal de um mamífero que podem ser diagnosticados inclu-  
indo progenitores eritroides sanguíneos.

35 Pretende-se também que as variantes e ca-  
deias simples de activina ou inhibina sejam utilizadas iso-  
ladamente ou em misturas umas com as outras ou com activina

61.561

File: FA. 49154-PT/RJS

2 NOV 1989

1 e/ou inibina. Através dos termos "activina" e "inibina" pre-  
tende-se significar os dímeros de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de inibina,  
formas prepro e os seus pro-domínios em conjunto com glico-  
5 silação e/ou variantes correspondentes, de sequências de  
aminoácidos. O precursor pode ser utilizado com ou sem a pro-  
teína madura e após clivagem da proteína madura pode ser as-  
sociado de modo não covalente com a proteína madura. Pelo  
10 termo "cadeia de inibina" entende-se, mas não se pretende  
limitar, as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de inibina bem como as suas formas  
prepro e os seus pro-domínios em conjunto com glicosilação  
e/ou variantes de sequências de aminoácidos de cada cadeia  
correspondente.

15 As variantes de sequências de aminoácido  
são geralmente homólogas com a porção relevante das sequên-  
cias de cadeia  $\alpha$  ou  $\beta$  dos suínos ou humanos indicadas no pe-  
dido de patente Europeia supracitado No. 222 491 incorporado  
por referência na sua globalidade.

20 Substancialmente homólogo significa que  
mais do que cerca de 60% da sequência de aminoácidos primá-  
rios do polipeptido homólogo corresponde à sequência da  
cadeia humana ou de suíno quando alinhados com vista a maxi-  
mizar o número de ligações dos resíduos de aminoácidos entre  
as duas proteínas. O alinhamento para maximizar as ligações  
25 dos resíduos inclui o deslocamento da extremidade amino e/ou  
carboxilo, introduzindo as lacunas necessárias e/ou elimi-  
nando os resíduos presentes como inserções no candidato. Ti-  
picamente, as variantes das sequências de aminoácidos são  
maiores do que 70 % das homólogas com as correspondentes se-  
quências de origem.

30 As variantes que não são activas sob o pon-  
to de vista hormonal caem no âmbito desta invenção e incluem  
polipeptidos que podem ou não ser substancialmente homólo-  
gos tanto com a cadeia de inibina madura como com a sequên-  
cia de pro-domínio mas que são (1) imunologicamente reactivo

61.561

File: FA. 49154-PT-RJS

2 NOV 1999

1 em cruz com anticorpos criados contra a contraparte original  
ou (2) capazes de competir com esses polipeptidos de con-  
traparte original para ligação do receptor à superfície das  
5 células. Sob o ponto de vista hormonal as variantes inacti-  
vas são produzidas pela preparação recombinante ou sintéti-  
ca orgânica de fragmentos, em particular as cadeias isola-  
das  $\beta$  de inibina ou pela introdução de variantes na sequên-  
cia de aminoácidos de forma que as moléculas não apresentam  
10 mais actividade hormonal como se definiu atrás.

10 Reactividade cruzada de receptor ou imuno-  
lógica, significa que o polipeptido candidato é capaz, sob o  
ponto de vista competitivo, de inibir a ligação do análogo  
activo sob o ponto de vista hormonal ao seu receptor e/ou  
15 anti-sores policlonais criados em função do análogo activo  
sob o ponto de vista hormonal. Esses anti-soreos são prepa-  
rados de modo convencional por injeção de cabras ou coe-  
lhos S.C. com o análogo activo sob o ponto de vista hormo-  
nal ou derivado adjacente de Freund completo seguida de in-  
20 jeções intraperitoniais de reforço ou S.C. em adjuvante de  
Freund incompleto.

25 As variantes de inibina incluem as sequên-  
cias prepro e/ou pro dos precursores da cadeia de inibina  
 $\alpha$  ou  $\beta$  ou os seus fragmentos activos sob o ponto de vista  
imunológico ou biológico substancialmente livres das corres-  
pondentes cadeias de inibina madura. As sequências para ini-  
bina humana e suína são conhecidas, por exemplo, como se  
publicou no pedido de patente Europeu No. 222 491. A sequên-  
30 cia prepro para o precursor de subunidade dos suínos é o  
polipeptido constituído pelos resíduos 1 a 230 enquanto a se-  
quência pro da subunidade  $\beta_A$  é constituída pelos resíduos  
1 a 308. Estas sequências englobam as sequências prodomí-  
nio.

35 As sequências  $\beta_A$ ,  $\beta_B$  ou  $\alpha$  prepro ou pro-  
domínio isoladas, intactas são sintetizadas melhor em cultu-

61.561

File: FA. 49154-PT/RJS

-2 NOV. 1989

1 ras de células recombinantes e os domínios de subcomponentes  
individuais são sintetizados pelos métodos de rotina de quí-  
mica orgânica ou por cultura de células recombinantes, por  
5 exemplo como se descreveu no pedido de patente Europeia  
222 491.

10 Enquanto o local para introduzir uma varia-  
ção de sequência é predeterminada é desnecessário que a mu-  
tação per se seja predeterminada. Por exemplo, com vista  
a otimizar o tipo de mutação num dado local, pode-se con-  
duzir uma mutagénese ao acaso no codão ou região alvo e pro-  
teger os mutantes de inibina expressos para uma combinação  
15 óptima da actividade desejada. As técnicas para a realiza-  
ção de mutações de substituição nos locais predeterminados  
em DNA que possui uma sequência conhecida são bem conhecidas  
por exemplo a mutagénese primeira de M13.

20 A mutagénese é conduzida preparando inser-  
ções de aminoácidos, normalmente dentro da gama 1 a 10 resí-  
duos de aminoácidos ou eliminações de 1 a 30 resíduos. As  
substituições, eliminações, inserções ou qualquer subcombina-  
ção podem ser combinadas para se chegar a uma construção fi-  
nal. De preferência, porém realiza-se apenas a mutagénese  
de substituição. Obviamente, as mutações no DNA de codifica-  
ção podem não colocar a sequência fora do quadro de leitura  
25 e de preferência não criam regiões complementares que possam  
produzir estrutura de mRNA secundária.

30 As modificações covalentes de inibina, ac-  
tivina ou prodomínios são incluídas no âmbito da invenção e  
incluem conjugados covalentes ou de agregação com outras  
porções químicas. Os derivados covalentes são preparados por  
ligação de funções a grupos que se encontram nas cadeias la-  
terais de aminoácidos de inibina ou no terminal N- ou C-,  
através de processos conhecidos do estado da técnica. Por e-  
xemplo, estes derivados incluem: ésteres ou amidas alifá-  
35 ticas dos terminais ou resíduos carboxílicos contendo cadei-

61.561

File: FA. 49154-PT/RJS

2 NOV 1999

1 as laterais carboxílicas, por exemplo, resíduos de aspartil;  
derivados de O-acilo de resíduos contendo grupos hidroxilo  
tais como seril ou alanil; e derivados N-acilo dos resí-  
duos contendo grupos amino ou aminoácidos de terminal amino,  
5 por exemplo lisina ou arginina. O grupo acilo é selecciona-  
do do grupo de porções com alquilo (incluindo alquilos nor-  
mais C<sub>3</sub> a C<sub>10</sub>) formando, por consequências, espécies alca-  
noilo e compostos carboxílicos ou heterocíclicos, consti-  
tuindo espécies aroilo, Os grupos reactivos, de preferência  
10 são compostos di-funcionais conhecidos per-se para utili-  
zação em proteínas de ligação cruzada até matrizes insolú-  
veis através de grupos laterais reactivos, por exemplo és-  
ter de m-Maleimidobenzoil -N-hidroxi succinimida. Os locais  
de derivação preferidos são os resíduos de histidina.

15 O método utilizado para introduzir o compos-  
to será qualquer método conveniente utilizado normalmente  
para introduzir fármacos na corrente sanguínea, tais como  
injecção, bolus, infusão e análogos. A administração paren-  
teral pode também ser utilizada.

20 O tamanho exacto de uma dose eficaz de um  
composto de acordo com o método da presente invenção depen-  
de de um número de factores, incluindo o receptor particu-  
lar e a gravidade do estado;  
25 deste modo, a via de administração ficará fundamentalmente  
à descrição do médico.

30 Enquanto é possível utilizar os compostos  
in vivo per se, é preferível apresentá-los sob a forma de  
uma preparação ou formulação farmacêutica. A formulação da  
presente invenção compreende um composto como previamente  
se descreveu em conjunto com um ou mais veículos aceitáveis  
correspondentes e, opcionalmente outros ingredientes tera-  
pêuticos. Os veículos podem ser aceitáveis tendo em vista  
a compatibilidade com outros ingredientes da formulação e  
35 não serem perniciosos para o receptor.

2 NOV 1978

1 A activina B é administrada ao doente por  
qualquer técnica apropriada, incluindo a administração paren-  
teral, sublingual, intrapulmonar tópica e intranasal. A via  
5 específica de administração depende, por exemplo, do tipo  
de terapia necessária. Exemplos de administração parenteral  
incluem administração intramuscular, subcutânea, intravenosa  
intra-arterial e intraperitoneal.

10 As composições a serem utilizadas em tera-  
pia são formuladas e doseadas de modo consistente com boa  
prática médica tendo em conta o estado clínico do doente in-  
dividual, a origem do estado que necessita de terapia, o lo-  
cal de distribuição da composição, o planeamento de adminis-  
tração e outros factores conhecidos para os métodos. A "quan-  
15 tidade eficaz" utilizada aqui é assim determinada por essas  
considerações.

20 Como uma proposição geral, a quantidade  
farmaceuticamente eficaz total da activina e/ou inibina ad-  
ministrada por via parenteral, por dose, está compreendida  
na gama de 50 µg/Kg/dia a 10 mg/kg/dia de peso do corpo do  
doente, embora, como se citou atrás isto será submetido a  
uma grande descrição terapêutica. O facto chave ao seleccio-  
nar uma dose apropriada, é o resultado obtido, como se mediu  
25 por inibição de conversão de  $\gamma$ -globina em  $\beta$ -globina fetal  
ou por outros critérios considerados apropriados pelo médico.

30 A composição é também administrada de modo  
apropriado pelos sistemas de libertação controlada. Exemplos  
apropriados de composições de libertação controlada incluem  
matrizes poliméricas semi-permeáveis sob a forma de artigos  
moldados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Matrizes de  
libertação controlada incluem polilactidos (Patente Ameri-  
cana No. 3 773 919, Patente Europeia 58 481), copolímeros  
de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato (U. Sidman,  
35 et al., Biopolimeros, 22, 547-556 (1983), poli (2-hidroxi-  
etilmetacrilato) (R. Langer, et al., J. Biomed. Mater. Res.

61.561

File: FA.49154-PT/RJS

-2 NOV. 1989

1 15:: 167-277 (1981) e R. Langer, Chem. Tech. 12::98 - 105  
(1982)), acetato de vinil-etileno (R. Langer, et al., Id.)  
ou ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico (Patente Europeia  
5 133 988). As composições de libertação controlada incluem  
também activina ou inibina sob a forma de lipissoma ou uma  
mistura correspondente. Essas composições são preparadas por  
métodos conhecidos per se: DE 3218121; Epstein et al., Proc  
Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:3688 - 3692 (1985); Hwang,  
10 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:4030-4034;  
EP 52 433; EP 36 676; EP 88 046; EP 143 949; EP 142 641;  
pedido de patente Japonesa 83-118 008; Patentes Americanas  
Nºs 4 485 045 e 4 544 545 e EP 102 324. Vulgarmente os li  
15 possomas são do tipo unilamelar pequeno (cerca de 200-800  
Angstroms) em que o conteúdo lípido é maior do que cerca de  
30 mol. por cento de colesterol, sendo a proporção seleccio-  
nada ajustada para a terapia óptima.

Para administração parenteral, a activina  
ou inibina é formulada geralmente misturando-a no grau de  
pureza desejado, numa forma injectável de dosagem unifária  
20 (solução, suspensão ou emulsão) com um veículo aceitável sob  
o ponto de vista farmacêutico, isto é, um que não seja tóxi-  
co para doentes nas dosagens e concentrações utilizadas e é  
compatível com outros ingredientes da formulação. Por exem-  
plo, a formulação não inclui, de preferência, agentes de  
25 oxidação e outros compostos que são conhecidos como perigo-  
sos para polipeptidos.

Geralmente, as formulações são preparadas  
fazendo contactar a activina ou inibina uniformemente e in-  
30 timamente com veículos líquidos ou veículos sólidos finamen-  
te divididos ou ambos e depois, se necessário moldando o pro-  
duto na formulação desejada. De preferência, o veículo é um  
veículo parenteral sendo preferível uma solução que é iso-  
tónica com o sangue do receptor. Exemplos desses veículos  
35 incluem água, solução salina, solução de Ringer, dextrose e

61.561

File: FA.49154-PT/RJS

11/01/1989

1 albumina de soro humano a 5%. Veículos não aquosos tais como  
óleos fixos e oletato de etilo são também utilizados aqui  
bem como liposomas. Geralmente, o veículo pode conter quanti-  
5 dades menores de aditivos tais como substâncias que possuem  
isotonicidade e estabilidade química, por exemplo, tampões  
e conservantes, bem como polipeptidos, proteínas, aminoáci-  
dos, hidratos de carbono de baixo peso molecular (inferior  
a cerca de 10 resíduos) incluindo glicose ou dextranos, a-  
10 gentes quelantes tais como EDTA ou outros excipientes. A ac-  
tivina ou inibina é tipicamente formulada em tais veículos  
para uma concentração de cerca de 10 ug/ml a 100 ug/ml com  
pH fisiológico.

15 A actinina ou inibina para utilização em  
administração terapêutica pode ser estéril. A esterilidade  
é prontamente acompanhada por filtração estéril através de  
membranas (por exemplo, 0,2 micron). A activina B é ordina-  
riamente armazenada em recipientes multidose ou unitários,  
por exemplo, ampolas ou frascos selados, com uma solução  
aquosa altamente estável a desnaturação oxidativa e térmica.  
20 São também aceitáveis formulações liofilizadas para recons-  
tituição.

25 Formulações de dosagem unitária preferidas  
são as que contêm uma dose diária ou uma sob dose diária u-  
nitária ou uma fracção apropriada correspondente.

30 Alternativamente, FSH (Hormona de estimu-  
lação de folículo) pode ser administrada para estimular  
in vivo a produção de inibina e activina a um indivíduo ou  
a uma grávida para tratamento de um feto. Quando se trata  
o feto com activina, inibina ou FSH, o tratamento deve ser  
administrado ao feto começando num período de tempo antes e  
durante a ocorrência da conversão antes de  $\gamma$  em  $\beta$ -globina  
no feto. Em seres humanos, o tratamento começa tipicamente  
antes da 32ª semana de gestação. Quando se deseja o trata-  
35 mento por administração de FSH, o tratamento deve ser apro-

61.561

File:FA. 49154-PT/RJS

U-2 NOV 1999

1 ximadamente de 10-500 microgramas/kg de peso de corpo/ de  
2-8 em 2-8 horas durante um período de 1 a 10 dias antes e  
durante a ocorrência esperada da conversão de  $\gamma$  em  $\beta$ -glo-  
5 bina. Se a activina e/ou inibina é administrada de modo con-  
corrente com FSH, a quantidade de FSH administrada será nor-  
malmente inferior às dosagens anteriores.

10 Como outra aplicação dos compostos de acor-  
do com o presente método, pode-se adicioná-los in vitro a  
culturas de células tiradas dos doentes e a quantidade de  
síntese de  $\beta$ -globina pode ser medida para determinar a efi-  
cácia potencial de outro tratamento para as perturbações de  
 $\beta$ -globina, tais como doenças de células em foice. Os com-  
postos podem ser assim utilizados in vitro em culturas de  
15 células de doentes para determinar se outra adição de um dos  
compostos provocaria inibição ou inversão da conversão de  
globina.

20 A frequência e dosagens de administração  
dos compostos anteriores dependerá da altura em que o com-  
posto é introduzido, se o individuo é um feto, uma criança  
ou um adulto, do tamanho e peso do individuo, do estado do  
doente e análogos. Geralmente as injeções de activina e/ou  
inibina começando para uma dosagem de cerca de 50  $\mu$ g/kg -  
- 10 mg/kg e muitas vezes  $\mu$ g/kg - 100  $\mu$ g/kg de peso do cor-  
25 po por dia durante a gestação, particularmente antes da 32ª  
semana de gestação em seres humanos, impedirá a conversão  
de  $\gamma$  em  $\beta$ -globina. As dosagens até cerca de 10 mg/kg/dia  
podem ser utilizadas à discrição do método. Visto que apa-  
rentemente o processo de conversão não é completo em seres  
30 humanos até aproximadamente quatro meses após o nascimento,  
o tratamento pode ser iniciado após o nascimento até cerca  
de 4 meses de infância e continuando tanto tempo quanto o  
necessário para manter os níveis de hemoglobina, fetal eleva-  
dos nos doentes, ou então o tratamento pode ser iniciado  
35 mais tarde na idade infantil ou adulta.

W. 2 NOV 1989

1 O tratamento de crianças ocorre, de preferência, antes do 4º mês de infância visto que o processo de conversão de  $\gamma$  em  $\beta$  globina é difícil de inverter. Embora o tratamento com um dos compostos anteriores antes do 4º mês

5 de infância iniba o processo de conversão de  $\gamma$  em  $\beta$ -globina, o tratamento subsequente a esse período pode também atingir os resultados clínicos desejados, isto é, o melhoramento dos efeitos da perturbação de  $\beta$ -globina. Por consequência, se o processo de conversão é inibido ou invertido

10 mesmo para a extensão de 10 a 20 % (isto é, o indivíduo produz 10 a 20% mais  $\gamma$ -globina do que seria esperado se a conversão ocorre, isto pode ser suficiente para melhorar os sintomas da doença.

15 O método de acordo com a presente invenção pode ser utilizado in vivo ou in vitro como um teste de diagnóstico medindo o decrescimento da síntese de  $\beta$ -globina na cultura quando comparado com o decrescimento numa amostra de controlo cultivada durante a doença da célula em foie na ausência da activina, inibina ou cadeia de inibina.

20 Para as culturas eritroides de teste in vitro tais como as obtidas de células mononucleares sanguíneas em cordão em meio Dulbecco Modificado por Iscove com 0,9 % de metilcelulose pode ser utilizado como se descreveu atrás por Stamatoyannopoulos et al., Blood, 54, 440 - 450 (1979) e Friedman et al., J. Clin. Invest., 75, 1359-1368 (1985).

25

30 Os exemplos seguintes são proporcionados através de ilustração, porém, não se pretende limitar a invenção. A produção de globina analisada por electroforese em geles de ureia de Triton, auto-radiografia e densitometria e por imuno-ensaio radioligante da hemoglobina fetal e total em pg por célula derivada de -Bfu foi realizada como se descreve em Stamatoyannopoulos et al e Friedman et al., ibid. todas as citações nos exemplos são expressamente incorporadas aqui por referência.

35

61.561

File: FA. 49154-PT/RJS

2 NOV 1969

1 Exemplo 1

5 A conversão de  $\gamma$ -globina em  $\beta$ -globina (conversão fetal para adulto) no feto do carneiro ocorre entre 120 e 140 dias de gestação onde uma duração de gestação total é de 140 a 150 dias. A FSH ovina foi administrada de um modo pulsátil 5 microgramas de 3 em 3 horas durante 5 a 10 dias para 9 fetos ovinos caracterizados por 113 a 125 dias de gestação. Isto aumenta a produção de inibina gonadal. A síntese de globina foi ensaiada em eritrocitos ovinos após marcação da leucina com trítio por coluna cromatográfica antes de se iniciar o tratamento e após o 5º e 10º dia de administração. Verificou-se que a síntese de  $\beta$ -globina foi diminuída de modo significativo de  $82,1 \pm 8,8 \%$  de não  $\beta$ -globina em controle ligados à idade a 15  $40,0 \pm 8,1 \%$  em fetos tratados com FSH entre 132 e 140 dias de gestação ( $P < 0,001$ ,  $n = 8$ ). Um feto não tinha nenhuma  $\beta$ -globina detectável aos 123 dias de gestação, mais do 4,5 desvios padrão abaixo dos animais de controle  $27,0 \pm 5,9 \%$ ). 20

EXEMPLO 2

25 Activina humana produzida por recombinação (produzida como se descreveu na Publicação de EP No.222 491, supra) e a inibina humana produzida por recombinação (produzida como se descreveu na publicação de EP No. 222 491, supra) foram utilizadas para testar a expressão de globina em culturas de eritroides a partir de sangue em cordão de crianças normais. As amostras foram preparadas contendo 30 100 manogramas/ml de activina, 100 manogramas/ml de inibina e controle. Os resultados apresentaram que a activina aumentou consistentemente a produção de globina fetal ( $\gamma$ -globina) em 7 a 10% por auto-radicografia e desitrometria (5 % por radio-imunoensaio) e a inibina aumentou a produção 35 de globina (fetal em 15 a 30 % (auto-radiografia). Verifi-

1 cou-se algum crescimento de inibição nas culturas contendo  
inibina. Estes resultados equivalentes a um aumento de duas  
a três vezes da velocidade de síntese da globina fetal se  
5 induzida em reticulócitos de doentes de anemia de células  
em foice.

Os resultados nas culturas de células de eritrócitos de um doente adulto atingido por  $\beta$ -talassemia também apresentaram que a proporção de  $\alpha$  : não  $\alpha$  é uma medida de extensão de  $\beta$ -talassemia, em culturas de  $\beta$ -talassemia, mostraram que o tratamento com activina recombinante para 100 nanogramas/ml diminui a proporção de  $\alpha$  : não  $\alpha$  em 25 % e o tratamento com 100 nanogramas/ml de inhibina recombinante diminui a proporção de  $\alpha$  : não  $\alpha$  em 47% testado por auto-radiografia e densitometria. Para estas proporções não é necessário qualquer transfusão num doente de  $\beta$ -talassemia.

### EXEMPLO 3

20 Para mostrar o efeito dos progenitores eritroides de sangue em cordão de activina/inibina a partir do sangue dos fetos normais fez-se a cultura com ou sem um fluido folicular porcino semi-purificado contendo inhibina e activina cada uma na quantidade de 100 mg/ml de cultura de células. Em quatro a cinco culturas, a síntese de  $\beta$ -globina diminui de 16,5 % comparado com os controles não tratados. Visto que FSH isolado não tem qualquer efeito na síntese de globina nestas culturas, a diminuição da síntese de  $\beta$ -globina é atribuída à activina e/ou inhibina.

30 O depósito do primeiro pedido para o invento acima descrito foi efectuado nos Estados Unidos da América em 1 de Novembro de 1988 sob o No. 266.421.

2-NOV-1989

## - R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1  
5  
10

1ª - Processo para o tratamento de perturbações de  $\beta$ -globina num mamífero caracterizado por se introduzir periodicamente durante a sua vida um composto seleccionado do grupo que consiste em activina, inibina, uma cadeia de inibina, derivados e misturas respectivas numa quantidade e frequência e/duração de vida suficiente para inibir ou inverter a conversão de  $\gamma$ -globina fetal em  $\beta$ -globina fetal.

15  
20

2ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto ser seleccionado do grupo que consiste em compostos de mamíferos análogos de inibina e activina, cadeia  $\alpha$  de inibina, cadeia  $\beta$  de inibina, cadeia  $\alpha$  de prepro inibina cadeia  $\beta$  de prepro inibina e sequência de aminoácido variante de cadeia  $\alpha$  de inibina, numa sequência de aminoácidos variante de  $\alpha$ -inibina uma sequência de aminoácidos variante de cadeia  $\beta$ , cadeia pro inibina  $\alpha$  e cadeia de pro inibina  $\beta$ .

25

3ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o mamífero é o ser humano e a perturbação são células com anemia ou talassemia caracterizado por se administrar ao adulto humano uma dose de activina compreendida entre 50  $\mu$ g e 10 mg/kg de peso de corpo/dia.

30

4ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o mamífero é o ser humano e a perturbações são células com anemia ou talassemia caracterizado por se administrar ao adulto humano uma quantidade de inibina ou cadeia de inibina compreendida entre 50  $\mu$ g e 10 mg/kg de peso de corpo/dia.

35

5ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o mamífero é o ser humano e a perturbação são cé-

1

5

lulas com anemia ou talassemia caracterizado por se administrar ao adulto humano uma mistura de activina e inibina ou cadeia de inibina com quantidades compreendidas entre 50µg/ e 10mg/kg de peso de corpo/dia e 50µg e 10 mg/kg de peso de corpo/dia respectivamente.

10

6ª. Processo de acordo com a reivindicação 1 em que o mamífero é o ser humano e a perturbação são células com anemia ou talassemia caracterizado por se administrar ainda uma quantidade eficaz de hormona de estimulação de folículo compreendida entre 10 e 500 microgramas/kg de peso de corpo/dia.

15

7ª. Processo de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado por a β globina ser controlada numa cultura de células *in vitro* do referido mamífero por adição de uma quantidade eficaz de activina para determinar se é necessário tratamento adicional.

20

8ª. Processo de acordo com a reivindicação 7 caracterizado por a β globina ser controlada numa cultura de células *in vitro* do referido mamífero por adição de uma quantidade eficaz de inibina ou cadeia de inibina para determinar se é necessário tratamento adicional.

25

9. Método de diagnóstico de perturbação numa célula doente de um mamífero caracterizado por se fazer a cultura de uma amostra biológica de um mamífero com uma quantidade eficaz dos compostos referidos nas reivindicações anteriores e por se medir a diminuição da quantidade de β globina da amostra quando comparada com a cultura da amostra de controlo na ausência dos referidos compostos.

30

Lisboa, 19. ABR 1995

Por SUSAN P. PERRINE e NORBERT ALBERS

35

VASCO MARQUES LEITE  
Agente Especial  
da Propriedade Industrial  
Centro Arco da Conceição, 3, 1.ª 1100 LISBOA

