

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 150**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A01N 43/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03819324 .9**
96 Fecha de presentación: **01.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1778186**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54 Título: **Método para la preparación de poly-ICLC y sus usos**

30 Prioridad:
03.07.2002 US 393713 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.04.2012

73 Titular/es:
ONCOVIR, INC.
3203 CLEVELAND AVE, NW
WASHINGTON, DC 20008, US y
SALAZAR, ANDRÉS

72 Inventor/es:
SALAZAR, Andrés

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 378 150 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la preparación de poly-ICLC y sus usos

Campo y antecedentes de la invención.

Campo de la Invención

- 5 La presente invención se refiere en general a métodos para producción de compuestos farmacéuticos, y más particularmente a ácido polirribonucleosídico-polirribocitidílico estabilizado con polilisina y carboximetilcelulosa (Poly-ICLC).

Información de Antecedentes

- 10 La invención descrita y reivindicada en esta memoria comprende un método mejorado para producir grandes lotes de Poly-ICLC final estéril adecuado para uso clínico con toxicidad reducida a niveles de dosis eficaces. El Poly-ICLC resultante puede utilizarse clínicamente para tratar diversas afecciones y para regular genes.

La Patente U.S. 4.349.538 (Hilton B LEVY) describe la preparación y el uso clínico de Poly-ICLC.

- 15 Sin embargo, las altas dosis (> 300 µg/kg) descritas clínicamente por Levy tenían como finalidad inducir interferón y resultaron tóxicas y en gran parte ineficaces para tratamiento de pacientes humanos, hasta el punto que, después de muchos intentos, el uso clínico experimental de Poly-ICLC se interrumpió en gran parte hace más de una década. Así, más de 20 años después que fue descrito por primera vez, el Poly-ICLC no ha sido aprobado todavía por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos para ninguna indicación terapéutica. El ácido poliinosínico-policitidílico estabilizado con polilisina y carboximetilcelulosa (Poly-ICLC) es un complejo sintético de ácido poliinosínico y ácido policitidílico (RNA bicatenario (dsRNA)), estabilizado con polilisina y carboximetilcelulosa que fue utilizado como inductor de interferón a dosis altas (hasta 300 µg/kg IV) en pruebas de acción
- 20 hace algunos años. Esto dio resultados desiguales con toxicidad moderada, y el uso de Poly-ICLC fue abandonado por regla general cuando llegaron a estar disponibles los interferones recombinantes. Sin embargo, a dosis más baja (10 a 50 µg/kg) Poly-ICLC da como resultado una estimulación más amplia de las defensas del hospedador, y una actividad clínica mejorada con poca o ninguna toxicidad. (Salazar, Levy et al. 1996)), (Ewel, Urba et al. 1992) (Levy and Bever 1988) (Levy and Salazar 1992) (Talmadge and Hartman 1985). (Maluish, Reid et al. 1985)
- 25 Existen al menos cuatro acciones clínicas interrelacionadas de Poly-ICLC, cualquiera de las cuales (sola o en combinación) podría ser responsable de su actividad antitumoral y antiviral. Éstas son 1) su inducción de interferón; 2) su amplio efecto mejorador de la inmunidad; 3) su activación de enzimas específicas, especialmente oligoadenilato-sintetasa (OAS) y la proteína-quinasa P68 (PKR); y 4) sus acciones reguladoras de genes multidimensionales.

- 30 Inducción de interferón. Si bien la inducción de interferón es uno de los mecanismos importantes para la acción de Poly-ICLC, el interferón por sí solo no parece ser tratamiento suficiente para muchas afecciones. Adicionalmente, los niveles de interferón sérico inducidos por las dosis de Poly-ICLC utilizadas por los presentes inventores son relativamente bajos y no han sido asociados en el pasado con acción antiviral o antitumoral cuando se administra exógenamente interferón solo.

- 35 Modulación de la inmunidad: El Poly-ICLC a dosis bajas tiene también una acción intensificadora de la inmunidad directa independiente de IFN que incluye la activación de las células T y las células agresoras naturales, activación de células dendríticas, liberación de citoquinas (v.g. interferones alfa, beta y gamma, interleuquinas, corticosteroides, y TNF), y un potente efecto adyuvante con respuesta incrementada de anticuerpos al antígeno (Levy y Bever 1988). Los efectos inmunoestimuladores de Poly-ICLC y los interferones son complejos. Sin embargo, resultados preliminares en laboratorio en el estudio piloto realizado por los inventores en pacientes con tumores cerebrales demostraron la ausencia de una relación clara entre la respuesta al tumor y el interferón sérico medible, TNF, IL2, IL6, o neopterina. (Salazar, Levy et al. 1996). El efecto adyuvante de Poly-ICLC se ha demostrado también en varios sistemas. Por ejemplo, la administración en dosis bajas de Poly-ICLC junto con la vacunación contra la gripe de los cerdos en los monos acelera y aumenta espectacularmente los títulos de HAI. (Stephen, Hilmas et al. 1977). Las complejas interacciones de los dsRNAs y los interferones en este contexto no están comprendidas todavía por completo, pero esta
- 40 función dual aparentemente paradójica de Poly-ICLC como agente antiviral e intensificador de la inmunidad es consistente con su función en el establecimiento de un sistema inmediato de defensa contra el ataque viral al mismo tiempo que permite el establecimiento de inmunidad a largo plazo. Así, en contraste con los agentes antivirales convencionales tales como cidofovir, Poly-ICLC podría representar un adyuvante ideal en vacunas de virus vivos, especialmente aquéllas tales como la vacuna de la viruela que pueden llevar consigo una morbilidad importante relacionada con la proliferación del virus incontrolado de la vacuna. En contraste con la vacunación, se espera también que el efecto protector de dsRNAs tales como Poly-ICLC sea mucho más rápido, dado que el estado antiviral se establece en el transcurso de horas.

Acción "Catalítica" de Poly-ICLC: OAS y PKR

- 55 La tercera acción de Poly-ICLC es un efecto antiviral y antineoplásico más directo mediado por al menos dos sistemas e enzimas nucleares inducibles por interferón, la 2'5'-oligoadenilato-sintetasa (OAS) y la P1/eIF2a-quinasa,

conocida también como la proteína-quinasa P68 dependiente de dsRNA (PKR). (Katze 1992), (Jacobs y Langland 1996) El dsRNA no es un componente normal de las células de mamífero, pero es un subproducto de muchas infecciones virales. El dsRNA induce un estado antiviral en las células por funcionar como un cofactor obligado para OAS, que activa la ribonucleasa-L, así como para la PKR, que inhibe la iniciación de la síntesis de proteínas, y para una aminotransferasa que está más incompletamente estudiada. Esto puede ayudar a la explicación de la disminución preferencial demostrada de la síntesis tumoral de proteínas in vivo por Poly-ICLC.

La OAS y la PKR son muy sensibles a la dosis y estructura del dsRNA (Minks, West et al 1979). Por ejemplo, el dsRNA simple de cadena larga (como en Poly-ICLC) es el estimulador más potente de OAS y PKR, mientras que el dsRNA desapareado o irregular puede ser inhibidor. Análogamente, la PKR tiene a la vez sitios de fijación de afinidad alta y baja y es inhibida por una dosis excesivamente alta de dsRNA. (Galabru, Katze et al. 1989). Clínicamente, la respuesta de OAS es también máxima a una dosis de aproximadamente 30 µg/kg de Poly-ICLC, y se reduce notablemente por encima de 100 µg/kg (M. Kende, N. Bernton, et al., no publicado).

La inhibición de las células de glioma EFC2 in vitro por el interferón beta está asociada también significativamente con la activación tanto de OAS como de PKR. Otros investigadores han demostrado que la expresión de un mutante funcionalmente defectivo de la PKR da como resultado transformación maligna in vitro, lo que sugiere un papel importante para esta enzima en la supresión de la tumorigénesis. (Koromilas, Roy et al. 1992). Se sabe ahora que tanto PKR como Poly-IC regulan el gen supresor de tumores p53, lo que está asociado a su vez con el síndrome de malignidad múltiple de Li Fraumeni, que incluye astrocitomas, sarcomas, y cánceres de pulmón y mama.

La semi-vida clínica de la respuesta de OAS a Poly-ICLC IM es aproximadamente 2,5 días, lo que sugiere un programa de dosificación óptimo de dos o tres veces por semana (M. Kende, L. Bernton, et al., no publicado). Pacientes tratados con Poly-ICLC exhibieron un aumento de hasta 40 veces en el producto OAS sérico en respuesta al tratamiento con 10 hasta 20 µg/kg, y una asociación importante significativa de OAS sérico con la respuesta tumoral ($p = 0,03$). La mediación de la acción antitumoral por activación de OAS y/o PKR por OAS podría contribuir a explicar por qué razón las dosis altas de Poly-ICLC utilizadas en las pruebas iniciales de cáncer fueron relativamente ineficaces.

Muchos virus, con inclusión pero sin carácter limitante de adenovirus, poxvirus (vaccinia), virus de la fiebre aftosa, gripe, hepatitis, poliovirus, herpes símples, SV-40, reovirus, y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) soslayan las defensas del hospedador por regular en sentido decreciente OAS y/o PKR, y este efecto puede invertirse in vitro por dsRNA exógeno. (Jacobs y Langland 1996). Un bloqueo de la acción del interferón mediada por PKR y/o OAS podría explicar también la respuesta variable a los interferones observada en enfermedades tanto microbianas como neoplásicas. Ciertos virus, así como neoplasmas tales como gliomas malignos pueden utilizar éste o un mecanismo similar para soslayar las defensas del hospedador y causar enfermedad. Dichas enfermedades pueden estar por tanto entre las primeras dianas para terapia clínica con Poly-ICLC utilizando el método descrito en esta memoria que maximiza la activación de PKR.

Así, se ha demostrado que Poly-ICLC ejerce una acción antiviral significativa contra una amplia diversidad de familias de virus. Un ejemplo es la inhibición del virus vaccinia en varios modelos (Levy y Lvovsky ((Burgasova 1977), (Worthington and Baron 1973) (Baron, Salazar et al. 2003). Levy & Lvovsky utilizaron Poly-ICLC o ungüento tópico de placebo en conejos e inocularon subsiguientemente los mismos con inyecciones intradérmicas de virus vaccinia en 10 sitios adyacentes de la piel. Los tratamientos locales se repitieron a intervalos de 1, 2, 3, y 4 días. Los animales tratados con ungüento de placebo desarrollaron lesiones graves desde los días 3 a 6, y 3 de los 8 murieron por encefalitis por vaccinia. En contraste, los animales tratados con Poly-ICLC no presentaron signo alguno de enfermedad sistémica y tenían lesiones mucho menores en la piel, que progresaban rara vez más allá de 1-3 mm. En experimentos separados, Poly-ICLC fue también efectivo cuando se aplicó después que se hicieron visibles las lesiones. Los títulos virales en las lesiones de la piel eran notablemente reducidos (por 3 logs) en los animales tratados, y los títulos de interferón aumentaron. Sin embargo, los títulos medios de anticuerpos neutralizantes del virus en el suero al cabo de 10 días habían aumentado aproximadamente 10 veces en los animales tratados comparados con los controles de placebo. Si bien los autores sugerían que los efectos beneficiosos eran debidos a la acción dérmica local del Poly-ICLC, demostraron también una fuerte respuesta sistémica del interferón (sérico) a la administración tópica del fármaco. Esto sugiere que el efecto protector principal puede ser realmente sistémico, lo cual se ve respaldado adicionalmente por la disminución acusada o la posible anulación de la diseminación sistémica de vaccinia por el Poly-ICLC tópico en sus experimentos.

La interacción de los interferones tipo I y Poly-ICLC unos con otros en la protección del hospedador contra los enfrentamientos virales o neoplásicos sigue sin estar aclarada debido en parte a sus funciones solapantes. Sin embargo, la relación de Poly-ICLC y los interferones puede manipularse con ventaja terapéutica. A dosis moderadas a altas, Poly-ICLC es un potente inductor de los interferones, lo cual puede inducir a su vez la síntesis de sistemas enzimáticos tales como OAS, PKR y otros que regulan finalmente por sí mismos la síntesis de proteínas específicas. No obstante, como se ha indicado arriba, OAS, PKR y probablemente otras requieren también dsRNAs a dosis baja como cofactores obligados para su función, en particular si han sido bloqueadas por invasión viral o neoplásica. El Poly-ICLC a dosis baja es particularmente eficaz en clínica a este respecto cuando se administra conforme al régimen descrito en el apartado 6 bajo 'Sumario de la Invención' más adelante.

La Regulación Clínica de Genes es un cuarto mecanismo por el cual Poly-ICLC puede modificar la respuesta biológica y proporcionar beneficio terapéutico.

Se ha demostrado que el Poly-IC normal no estabilizado regula en sentido creciente o en sentido decreciente una gran diversidad de más de 270 genes en cultivo de células (Geiss, Jin, et al. 2001). Sin embargo, el Poly-IC normal no es eficaz *in vivo* en primates y muchas otras especies, y presenta utilidad clínica limitada. Por otra parte, se espera que Poly-ICLC ejerza acciones reguladoras de genes generalizadas cuando se administra clínicamente en humanos. Estos genes incluyen, pero sin carácter limitante la helicasa, proteína inducida por interferón (p56), el factor de necrosis tumoral, el factor regulador de interferón, la metaloproteínasa de la matriz, el activador del plasminógeno, la proteína tumoral p53, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor 2 de iniciación eucariota, la proteína asociada a filamentos de actina, y VCAM-1. Algunos de estos genes desempeñan papeles clínicos en las defensas naturales del cuerpo contra una diversidad de neoplasmas e infecciones microbianas, y en el control de otras funciones celulares, que incluyen síntesis de proteínas, atrogénesis, muerte celular programada (apoptótica), metabolismo celular, crecimiento celular, el citoesqueleto y la matriz extracelular. La activación de los genes es transitoria, durando 24-48 horas, lo que sugiere que la dosificación repetida a intervalos de 2-3 días será necesaria para conseguir un efecto terapéutico en algunas condiciones. Este es el programa de administración que se utilizó con éxito en el tratamiento de gliomas malignos y se describe con mayor detalle más adelante. (Véase a continuación). Para afecciones degenerativas crónicas o de larga duración puede ser necesaria una administración prolongada durante un periodo de años.

Prevención y Tratamiento de la Lesión por Radiaciones Ionizantes

Otra acción de los dsRNAs y Poly-ICLC en particular es su protección demostrada contra la lesión por radiaciones. (Baze, Lvovsky et al. 1979), (Lvovsky, Levine et al. 1982). En una serie de experimentos, se trataron ratones con Poly-ICLC por vía intramuscular a dosis de 0,1 a 3 mg/kg antes de recibir una DL50 (30d) de radiación ionizante. Los animales recibieron tratamientos simples o múltiples con PICLC a las 8-72 horas antes de la exposición a la radiación. Los animales tratados tuvieron una supervivencia notablemente incrementada, con un factor de reducción de la dosis máxima de 1,25. La supervivencia durante 30 días aumentó tanto como 60% a una dosis de aproximadamente 700 Rads (desde 33 a 93%). El tiempo de radioprotección máxima no coincidía con la inducción de interferón, que ocurría 24-48 horas antes. Esto sugiere que la inducción de enzimas tales como las PKR y OAS puede ser más importante para el efecto radioprotector que la simple inducción de interferón. Como se ha indicado arriba, la respuesta máxima de OAS después de PICLC tiene lugar aproximadamente 48-72 horas después del tratamiento con Poly-ICLC IM y coincide con el tiempo de radioprotección máxima. Así, un protocolo de dosificación que maximice no sólo la inducción de OAS y PKR, sino también su activación subsiguiente podría ser prometedor de un efecto radioprotector mayor aún.

Se presentarán datos que demuestran el efecto radioprotector de Poly-ICLC cuando se administra de acuerdo con el régimen de doble dosificación descrito más adelante que maximiza la activación de OAS y PKR.

Fabricación de Poly-ICLC

La Patente U.S. 4.349.538 (Hilton B LEVY) describe la preparación de lotes de 1 litro de Poly-ICLC de composición específica que proporcionan un producto biológicamente activo.

Sin embargo, en la preparación de lotes de producción grandes (> 30 litros) de Poly-ICLC de acuerdo con la buena práctica de fabricación (GMP), se encontraron dificultades con la formulación de Poly-ICLC que requerían modificaciones clínicas respecto al proceso descrito por Levy a fin de producir grandes lotes de producto final estéril adecuado para uso clínico. Los resultados de los tests indican que dichas modificaciones dieron como resultado un producto significativamente mejorado y más potente biológicamente que el descrito en la patente #4.349.538.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los problemas anteriores se resuelven, y se proporcionan otras ventajas por un método para producción de grandes lotes de Poly-ICLC final estéril adecuado para uso clínico con toxicidad reducida a niveles de dosis eficaces, y para uso en métodos de utilización de Poly-ICLC a fin de tratar ciertas afecciones neoplásicas, infecciosas y autoinmunes y regular una gran diversidad de genes.

Un método mejorado y modificado para la fabricación a escala de producción de grandes lotes estériles de grado clínico de Poly-ICLC, un complejo de ácido polirribonucleosídico-polirribocitidílico de peso molecular alto, poli-L-lisina de peso molecular relativamente bajo, y carboximetilcelulosa proporciona claridad y uniformidad mejoradas de la composición. Se espera que esta mejora en el producto final dé como resultado una mayor exactitud de suministro de fármaco en aplicaciones clínicas, con inducción incrementada de interferón y potencia biológica global en primates.

La presente invención proporciona un método modificado mejorado para la fabricación a escala de producción de grandes lotes estériles de grado clínico de Poly-ICLC, un complejo de RNA bicatenario de ácido polirribonucleosídico-polirribocitidílico de peso molecular alto, poli-L-lisina de peso molecular bajo, y carboximetilcelulosa, que tiene mayor exactitud de suministro de fármaco en aplicaciones clínicas, y potencia biológica y actividad de inducción incrementadas de interferón en primates, que comprende los pasos de fabricar un RNA bicatenario de ácido polirribonucleosídico

- co-poliirribocitidílico utilizando una solución de componente de ácido poliinosínico en un proceso que comprende clarificar la solución de ácido poliinosínico por calentamiento a aproximadamente 35°C Una mezcla proporcionalmente más intensa Una mezcla proporcionalmente más intensa antes de esterilización por filtración; añadir una solución de componente poli-L-lisina muy lentamente a una solución de componente carboximetilcelulosa durante un periodo de al menos 4 días, y mezclar durante todo el tiempo de mezcla de modo suficiente energético para formar un torbellino y minimizar la formación de precipitado, seguido por adición del RNA bicatenario de ácido poli-ribonucleosídico-polirribocitidílico, en donde la viscosidad de la carboximetilcelulosa se reduce por calentamiento a aproximadamente 35°C, pero no más de 40°C a fin de permitir un torbellino satisfactorio mientras se realiza la mezcla.
- 5
- 10 De acuerdo con el método mejorado, se añade la solución de componente poli-L-lisina muy lentamente a la solución del componente carboximetilcelulosa durante un periodo de al menos 4 días. Se requiere también una acción de mezcla energética utilizando un mezclador de paletas suficiente para generar un torbellino durante todo el tiempo de mezcla a fin de minimizar la formación de precipitado. Será necesaria una mezcla proporcionalmente más fuerte para mayores cantidades de preparación, superiores a 30 litros. En una realización preferida, la viscosidad de la solución del componente carboximetilcelulosa se reduce por calentamiento a aproximadamente 35°C, pero no más de 40°C a fin de permitir un torbellino satisfactorio mientras se realiza la mezcla. En una realización más preferida, la evaporación debida al calentamiento se contrarresta por la adición de agua estéril para inyección durante el proceso de mezcla y la solución del componente ácido poliinosínico se clarifica por calentamiento a aproximadamente 35°C antes de la esterilización por filtración.
- 15
- 20 Las composiciones así producidas pueden utilizarse en un método mejorado y no tóxico para utilización clínica de Poly-ICLC en humanos por vías intranasal, tópica, oral, sublingual, intravenosa y/o intramuscular a fin de modular la expresión de una amplia gama de genes. Se han demostrado efectos similares para Poly-IC simple no estabilizado en cultivo de células (Geiss, Jin et al. 2001), aunque el Poly-IC simple no es eficaz en primates y muchas otras especies. Estos genes incluyen, pero sin carácter limitante, la helicasa, proteína inducida por interferón (p56), factor de necrosis tumoral, factor regulador de interferón, metaloproteinasa de la matriz, activador del plasminógeno, proteína tumoral p53, factor de crecimiento de fibroblastos, factor 2 de iniciación eucariota, proteína asociada a filamentos de actina, y VCAM-1. Algunos de estos genes desempeñan papeles críticos en las defensas naturales del cuerpo contra una diversidad de neoplasmas e infecciones microbianas, y en el control de otras funciones celulares, que incluyen la síntesis de proteínas, aterogénesis, muerte celular programada (apoptótica), metabolismo celular, crecimiento celular, el citoesqueleto y la matriz extracelular. El Poly-ICLC será por tanto de utilidad clínica en enfermedades en las cuales la expresión de uno o más de estos genes es anormal. Otras aplicaciones incluyen la regulación similar de genes en diversas especies animales, que incluyen primates, carnívoros, ungulados, aves de corral, y otras aves.
- 25
- 30 Las composiciones pueden utilizarse en un método mejorado de administración (por vías intranasal, oral, sublingual, intramuscular, intravenosa o tópica) que comprende la administración en al menos dos dosis espaciadas 4-72 horas, en donde la primera dosis está dentro de una gama moderada (30 a 100µg/kg en humanos) suficiente para inducir niveles medibles pero no excesivos de interferón sérico y niveles máximos de PKR y OAS; y la segunda dosis, más baja, está dentro del intervalo eficaz máximo (10 a 40µg/kg en humanos) para desbloqueo y estimulación de ciertos sistemas de enzimas inducibles por interferón y dsRNA, que incluyen la PKR y 2'S'OAS, que alcanzan sus picos máximos en suero aproximadamente 48 horas después de la dosificación inicial de Poly-ICLC. Este enfoque puede extenderse al uso de otros dsRNAs estabilizados para conseguir los mismos resultados. El ciclo de dosificación puede repetirse a intervalos semanales o dos veces por semana para un número variable de ciclos que dependen de la cronicidad de la enfermedad que se esté tratando, y puede continuarse durante un periodo de tiempo prolongado (desde meses hasta varios años). Finalmente, una o más de las dosis pueden suministrarse utilizando un parche dérmico o vehículo transdérmico (véase la sección II bajo Realizaciones Preferidas).
- 35
- 40 Una composición de Poly-ICLC de la invención puede administrarse clínicamente como se ha indicado arriba para tratar ciertas enfermedades neoplásicas en humanos. Éstas incluyen, pero sin carácter limitante, tumores cerebrales malignos, melanoma, cáncer de mama y de pulmón, cáncer de colon, sarcomas, cáncer de células renales, y ciertas leucemias y linfomas (véase más adelante).
- 45
- 50 El producto puede utilizarse en un método mejorado y no tóxico por utilización de Poly-ICLC clínicamente como se ha indicado arriba a fin de prevenir y tratar infecciones microbianas en humanos por cierto número de virus. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, arbovirus y flavivirus tales como la fiebre amarilla, el virus del Nilo Occidental, la encefalitis japonesa y el dengue (Stephen, Samos et al. 1977) (Harrington, Hlmas et al. 1977), filovirus tales como Ébola, gripe, poxvirus tales como el de la viruela y Monkeypox, adenovirus, hepatitis, coronavirus tales como el virus SARS, herpesvirus tales como citomegalovirus y herpes simplex, y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).
- 55 Algunos de estos virus sobreviven en el cuerpo por regulación decreciente de alguno de los sistemas arriba citados. Otras aplicaciones incluyen tratamiento similar de diversas especies animales, que incluyen primates, carnívoros, ungulados, aves de corral, y otras aves, e incluyen (pero sin carácter limitante) infecciones de arbovirus tales como la encefalitis equina, el virus de la fiebre aftosa, la gripe, arterivirus tales como el virus PRRS de los porcinos, y el complejo respiratorio de los bovinos.

El producto puede utilizarse también en un método mejorado y no tóxico para utilización de Poly-ICLC clínicamente como se ha indicado arriba a fin de prevenir y tratar ciertas infecciones microbianas bacterianas y parasitarias, que incluyen malaria y leishmaniasis.

5 Con este método pueden tratarse también diversos trastornos inmunes que incluyen, pero sin carácter limitante, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barre, neuropatías inmunes, y ciertas vasculitis disímunes; así como lesión por radiación ionizante.

Las composiciones pueden utilizarse en un método mejorado y no tóxico para utilización de Poly-ICLC clínicamente en humanos como se ha indicado arriba para mejorar la acción y reducir la toxicidad de diversas vacunas, con inclusión de vacunas de virus vivos.

10 Así pues, la invención ha proporcionado un método mejorado de producción de grandes lotes de Poly-ICLC, adecuados para uso clínico.

La administración de dicho Poly-ICLC da como resultado una toxicidad notablemente reducida, y una mejora acusada de sus usos clínicos y veterinarios y sus efectos biológicos multidimensionales, y proporciona un método de utilización de Poly-ICLC a fin de proporcionar acciones reguladoras de genes en humanos.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 es una tabla que muestra la Respuesta Sistémica a una dosis Intranasal Simple de Poly-ICLC en Monos Rhesus. La Figura 2 es una tabla que muestra la inducción de Interferón en Monos Rhesus por 2 mg/kg IV de Poly-ICLC fabricado como se describe en la presente solicitud (lote #RBP 10036) (compárese con la Tabla I en Levy'82, Patente #4.349.538. A pesar de una dosis mayor de 3 mg/kg, la preparación de Levy inducía niveles inferiores de interferón en los Monos Rhesus.) La Figura 3 es una tabla que muestra el test de Material Particulado (aclaramiento) de los componentes de Poly-ICLC y el producto final como se describe en la presente solicitud. La Figura 4 es una tabla de datos de supervivencia no publicados en pacientes de glioma maligno tratados a largo plazo con Poly-ICLC a dosis baja.

25 La Figura 5 es una tabla que muestra la disminución o estabilización de la carga viral de HIV después de tratamiento de pacientes de SIDA avanzado a largo plazo con Poly-ICLC a dosis baja.

La Figura 6 es una tabla no publicada que muestra el tratamiento a largo plazo con dosis baja de Poly-ICLC de la Esclerosis Múltiple Progresiva, que muestra la estabilización relativa, y/o la mejora del estatus neurológico.

En la medida en que ello puede ayudar a la comprensión del método, se hace referencia a la Patente U.S. 4.349.538 (Levy).

30 DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La invención es un nuevo método para producir grandes lotes de Poly-ICLC final estéril adecuado para uso clínico con toxicidad reducida a niveles de dosis eficaces. Las composiciones que comprenden dicho Poly-ICLC pueden utilizarse para regular genes y tratar ciertas condiciones de enfermedad.

35 I. Descripción de un Método Mejorado para Preparación de Lotes de Volumen Grande de Poly-ICLC con Potencia Biológica Incrementada.

Esta sección está basada en observaciones de Oncovir en la producción del lote #RBP 100-36; JN:042401 RBP.

40 La Patente US #4.349.578 (Levy) proporciona una descripción básica del proceso de fabricación. Se describen las modificaciones siguientes. La sección más sensible de la formulación es la mezclado de la solución de poli-L-lisina con la solución de carboximetilcelulosa (CMC). Cuando la poli-L-lisina entra en contacto con CMC, se genera un precipitado que es muy difícil de poner de nuevo en solución. Con objeto de prevenir este precipitado, la poli-L-lisina tiene que añadirse muy lentamente a la solución de CMC durante un periodo de al menos 4 días. Se requiere también una acción enérgica de mezclado utilizando un mezclador de paletas grandes durante todo el tiempo de mezclado a fin de minimizar la formación de precipitado.

45 La CMC es viscosa y precisa calentarse a aproximadamente 35°C, pero no más de 40°C a fin de permitir una torbellino satisfactoria mientras se realiza la mezclado. El impacto negativo del aporte de calor a las soluciones de poli-L-lisina y CMC es que se produce evaporación durante el proceso de calentamiento/mezclado/mixtura. A medida que se evapora la solución, la misma se vuelve más espesa y más difícil de mezclar. Se prefiere contrarrestar en parte la evaporación hacia la mitad del tiempo de mezclado para maximizar la acción de torbellino.

50 La solución evaporada se reemplaza con Agua Estéril para Inyección (SWFI) varias veces dependiendo de la duración del tiempo de mezclado. Por ejemplo, se añadieron un total de 15153 ml de agua estéril a un lote de 18 l de suspensión de Poly-ICLC en tres ocasiones. Un tiempo más intenso pero más breve de mezclado/calentamiento/mixtura podría contribuir a minimizar la cantidad de agua necesaria para el reemplazamiento de la evaporación. No se genera precipitado adicional alguno por la adición de SWFI.

Es difícil determinar la densidad relativa de la solución de CMC y la solución final de Poly-ICLC. No puede realizarse utilizando un micro-pipeteador debido a la viscosidad. La densidad relativa de la CMC se determinó por pesada del lote total en un envase; se traza luego una línea en el envase para marcar el borde superior de la solución y se retira la CMC. Se limpia el envase, se llena con agua y se pesa a fin de determinar el peso de la solución de CMC frente al peso de agua. La densidad relativa final del Poly-ICLC se determinó por ponderación de la densidad relativa de cada una de las soluciones Poly I, Poly L, Poly C y CMC. Poly C y Poly L se disuelven todos de modo relativamente satisfactorio como se describe en Levy, '82, #4349538.

La densidad relativa de cada uno puede medirse utilizando una micropipeta. Sin embargo, después de la mezcla de Poly I, la solución queda opalina y obstruye los filtros. Una modificación importante requerida fue un calentamiento inicial de Poly I para clarificar la solución y permitir que la misma pasara a través de un filtro de 0,2 micrómetros con pérdida mínima del componente funcional. Después de calentamiento de la solución a aproximadamente 35°C, la misma se vuelve clara y puede en dicho momento filtrarse para esterilización. La filtración estéril de una solución clara se supone también que reduce cualquier pérdida de componente activo por el proceso de filtración. Una vez que el Poly I se ha aclarado, el mismo mantiene su transparencia y puede filtrarse de nuevo a la temperatura ambiente. La esterilización para uso clínico se realiza por tanto con modificaciones mínimas respecto a Levy '82 como sigue: se filtra la solución de Poly I utilizando un filtro de 0,2 micrómetros después de calentamiento a 35°C y clarificación. La solución de Poly C se filtra utilizando un filtro de 0,2 micrómetros; la solución de Poly L se filtra utilizando un filtro de 0,2 micrómetros. La solución de CMC se trata en autoclave.

Las cuatro soluciones se combinan luego en condiciones estériles como se describe arriba y en la patente #4349538.

El producto final producido por este método exhibía la mayoría de las características de Poly-ICLC descritas en la patente #4349538 excepto que es un inductor de interferón aún más potente en los primates. El Poly-ICLC producido con las modificaciones arriba descritas tiene una Tm de aproximadamente 90°C y es resistente a la hidrólisis por la RNasa pancreática. Cuando se administra por vía intravenosa a monos Rhesus a una dosis de 2 mg/kg, el mismo da como resultado la inducción de 2000 a 7000 UI de interferón, con un valor medio de 5750 UI de interferón 8 horas después de la inyección, como se muestra en la Tabla 2. Este valor es tres veces mayor que los valores consignados previamente por Levy en la patente #4349538. El nuevo método descrito da también como resultado un producto final que tiene una transparencia y uniformidad de composición significativamente mejoradas como se demuestra en parte por el test de material particulado, como representado en la Figura 3.

El producto final mejorado permite una mayor exactitud de suministro de fármaco en aplicaciones clínicas y mayor potencia biológica, que puede estar relacionada en parte con su solubilización mejorada.

II. Tratamiento por Fases con Dosis Múltiples

La interacción compleja de los interferones y los sistemas activados por dsRNA puede manipularse con ventaja terapéutica, particularmente en el caso de aquellas enfermedades microbianas y neoplásicas que se desarrollan por soslayar los mecanismos de defensa del hospedador que implican OAS y PKR. Un enfoque descrito por Marcus y colaboradores en cultivo de células aviares utiliza la combinación de interferón exógeno seguido por dsRNA en dicho orden para conseguir un nivel de protección incrementado hasta 100 veces contra el reovirus aviar y el virus de la enfermedad de Newcastle con respecto a la proporcionada por cualquier agente aislado o cuando se administran en orden inverso (Marcus y Sekellick 2001). Puede utilizarse una lógica similar para tratar ciertas enfermedades infecciosas y neoplásicas humanas y veterinarias utilizando Poly-ICLC solo. En este contexto, Poly-ICLC cumple dos funciones; en primer lugar la inducción de interferón, OAS, PKR, y algunas otras enzimas, y en segundo lugar la activación de las OAS, PKR, y otras enzimas previamente inducidas.

El método descrito en esta memoria consiste en estimular primeramente la inducción de interferón con una dosis moderada a alta de Poly-ICLC, dejar que transcurran 4-72 horas para la inducción por interferón de OAS, PKR y otros sistemas enzimáticos, y activar luego los mismos con una segunda dosis menor de Poly-ICLC. Dada la semivida de 2-3 días de la OAS, este ciclo puede precisar ser repetido al menos una o dos veces por semana durante un periodo de tiempo variable que depende de la enfermedad en cuestión. En algunas infecciones, tales como la gripe del ratón, se ha demostrado que un solo ciclo de dos dosis de Poly-ICLC intranasal (1 mg/kg) protege contra el enfrentamiento al virus letal durante tanto como dos semanas, aunque los autores no continuaron específicamente la secuencia de dosis alta-dosis baja descrita en esta memoria. (Wong, Saravolac et al. 1995). Un ciclo de una sola dosis era menos eficaz. Análogamente, en el tratamiento de gliomas malignos, se encontró que menos de dos veces por semana de dosificación de Poly-ICLC resultaba ineficaz. (Salazar, Levy et al. 1996). En dicha prueba clínica satisfactoria (descrita ulteriormente en el ejemplo más adelante), la dosificación se espació a 48 horas. Así, la segunda dosis de Poly-ICLC se administró en un momento en que la OAS (y presumiblemente PKR) había alcanzado los niveles pico en sangre respecto a la primera dosis y pudo ser activada más eficazmente por el Poly-ICLC.

Pruebas clínicas de Poly-ICLC hasta la fecha han utilizado las rutas de administración intravenosa (IV) o intramuscular (IM). Wong y otros han demostrado que Poly-ICLC intranasal puede proteger contra el enfrentamiento al virus nasal en los ratones. Los autores de la presente invención han demostrado ahora que el tratamiento intranasal de primates no humanos (monos Rhesus) con Poly-ICLC dará también como resultado una respuesta sistémica fuerte

tal como se mide por interferón en plasma a las 24 horas, pero no 8 horas después de la administración, y como se muestra en la Figura 1. Este resultado inesperado abre la posibilidad de la aplicación intranasal, sublingual, o tópica de Poly-ICLC para tratamiento de enfermedades sistémicas. Esto puede ser especialmente ventajoso en el tratamiento a largo plazo del cáncer o enfermedades autoinmunes, el tratamiento de gran número de individuos expuestos a una amenaza bioterrorista tal como la viruela; o para uso veterinario, como en la contención de un brote de enfermedad de fiebre aftosa en el ganado vacuno, el tratamiento del complejo respiratorio de los bovinos, la gripe aviar, o el síndrome reproductivo-respiratorio de los porcinos (PRRS).

Análogamente, sobre la base de la experiencia con el uso oral de interferón, se plantea también la hipótesis de que el Poly-ICLC administrado por vía oral o sublingual puede ser suficiente para producir una respuesta terapéutica clínica. La administración oral podría ser también especialmente ventajosa en usos humanos o veterinarios en gran escala. Finalmente, estudios anteriores en conejos demostraron protección contra vaccinia por Poly-ICLC administrado tópicamente. Esto sugiere que la administración tópica de Poly-ICLC en una preparación dermatológica o parche dérmico puede ser también eficaz para ciertas aplicaciones en humanos. (Levy y Lvovsky 1978). Se presentarán datos adicionales para abordar estas reivindicaciones.

III. Ejemplos: Un Método Mejorado para el Uso Clínico y Veterinario de Poly-ICLC

Es de esperar que Poly-ICLC, especialmente mejorado como se ha descrito arriba, podría tener aplicación para el tratamiento de una diversidad de enfermedades que incluyen ciertos trastornos neoplásicos, infecciosos, y autoinmunes.

Los ejemplos que siguen son ilustraciones, pero no limitaciones, del método. Dados estos ejemplos, una persona con experiencia ordinaria en la técnica podría aplicar el mismo método a otras enfermedades.

A) Ejemplo de Modulación Clínica de Genes por Poly-ICLC en Primates, con Inclusión del Hombre

Se trataron 8 monos Rhesus por vía intranasal con 4 ml de Poly-ICLC intranasal de concentración 2 mg/ml, seguido en 24 horas con una segunda dosis de 2 ml. Se recogieron secreciones nasales y células así como sangre en diversos intervalos y los especímenes, con inclusión de secreciones, células epiteliales nasales, plasma y glóbulos blancos se preservaron para análisis. Se presentarán los resultados, con inclusión del análisis de microrredes de RNA y ensayos de interferón.

En experimentos paralelos, se recogerá sangre de pacientes que participen en una gran prueba clínica multicentro de Poly-ICLC para pacientes con gliomas malignos. Se extraerá el RNA de los glóbulos blancos y se someterá a análisis de microrredes a fin de demostrar la activación de los genes por Poly-ICLC, incluyendo pero sin carácter limitante los genes siguientes: helicasa, proteína inducida por interferón (p56), factor de necrosis tumoral, factor regulador de interferón, metaloproteínasa de la matriz, activador del plasminógeno, proteína tumoral p53, factor de crecimiento de fibroblastos, factor 2 de iniciación eucariota, proteína asociada con filamentos de actina, y VCAM-1.

Estos estudios demostrarán no sólo el espectro de activación de genes en humanos por Poly-ICLC a dosis baja, sino que revelarán también posibles correlaciones con la respuesta tumoral. No obstante, los posibles usos terapéuticos clínicos de la capacidad para regular una diversidad de genes tan amplia se extienden más allá de los tratamientos de infecciones y neoplasmas descritos más adelante.

B) Ejemplo de Tratamiento Clínico del Cáncer: Tratamiento de Gliomas Malignos

Se administró Poly-ICLC (10 a 50 µg/kg por vía intramuscular 1 a 3 veces por semana) durante hasta 56 meses a 38 pacientes con glioblastoma multiforme o astrocitoma anaplásico. (Salazar, Levy et al. 1996). Se encontró una toxicidad relativamente baja o nula. Veinte de 30 pacientes (66%) que recibieron al menos 2 veces por semana Poly-ICLC (con inclusión de todos los pacientes de astrocitoma anaplásico) exhibieron regresión o estabilización del tumor en aumento en MRI (mediana = disminución de volumen 65%). Sólo 2 de los 11 pacientes de astrocitoma anaplásico exhibieron subsiguientemente recurrencia del tumor mientras se trataban con Poly-ICLC, y la mayoría del grupo siguen vivos, con un seguimiento mediano libre de progresión de más de 6,5 años desde el diagnóstico (intervalo 22-134+ meses). La supervivencia mediana global es ahora 111+ meses (intervalo 34-134+). La supervivencia mediana de Kaplan-Meier para los pacientes de glioblastoma en los tratamientos de al menos dos veces por semana de Poly-ICLC era 19 meses; sólo uno se mantiene vivo (98 meses desde el diagnóstico). La respuesta tumoral estaba asociada con la activación de 2'5'-oligoadenilato-sintetasa ($p = 0,03$), pero no con interferón sérico, interleuquinas, o neopterina.

La respuesta tumoral sostenida de 100% o tasa estable, y la supervivencia prolongada continuada y de calidad en los pacientes de astrocitoma anaplásico en el tratamiento con Poly-ICLC contrasta favorablemente con la supervivencia mediana esperada de aproximadamente 26 meses para los pacientes de AA de diagnóstico reciente en quimioterapia tradicional. Como se ha sugerido arriba, se espera que puedan alcanzarse supervivencias mejores aún que las observadas hasta la fecha utilizando una nueva técnica de doble dosificación, como sigue:

Se administra Poly-ICLC por vía intranasal, oral, sublingual, intramuscular, intravenosa o tópica en al menos dos dosis espaciadas 4-72 horas. Preferiblemente, la primera dosis está comprendida dentro de un intervalo moderado

suficiente para inducir niveles medibles pero no excesivos de interferón sérico (30 a 100 µg/kg en humanos); y la segunda dosis, más baja, se encuentra dentro del intervalo máximo eficaz para desbloqueo y estimulación de ciertos sistemas de interferón y enzimáticos inducibles por dsRNA, con inclusión de PKR y 2'5'OAS, que alcanzan sus picos en suero aproximadamente 48 horas después de la dosificación inicial de Poly-ICLC. Para humanos, la primera dosis estaría comprendida preferiblemente en el intervalo de 30 a 100 µg/kg y la segunda dosis estaría comprendida preferiblemente en el intervalo de 10 a 40 µg/kg. Con preferencia, las dosis se espaciarían aproximadamente 48 horas.

(Véanse datos de supervivencia actualizados no publicados en la tabla de la Figura 4)

Se espera que esto podría ser confirmado o modificado convenientemente por los expertos en la técnica, basándose en el resultado de las pruebas clínicas de fase II en curso de Poly-ICLC para pacientes con tumores cerebrales malignos.

Cierto número de cánceres comparten diversas características con los gliomas malignos, y probablemente utilizan mecanismos similares para soslayar las defensas del hospedador. Tales cánceres pueden ser también por tanto susceptibles de tratamiento con Poly-ICLC utilizando el régimen descrito en esta memoria. Los mismos incluyen melanoma, y ciertas leucemias y linfomas que comparten anomalías en el cromosoma 9p; carcinoma de células renales; y sarcomas, cánceres de pulmón, mama y colon que aparecen junto con los gliomas en el síndrome familiar de Li-Fraumeni.

C) Ejemplo de Tratamiento Clínico de una Enfermedad Retroviral: Tratamiento del SIDA con Poly-ICLC. En una prueba piloto abierta, se administró una dosis baja (0,2-2 mg) de PICLC por vía intramuscular (IM) 1-3 veces por semana con o sin Zidovudina durante hasta 30 meses a 22 pacientes con infección de HIV o SIDA. (Salazar, Morales et al. 1990). El PICLC era bien tolerado, sin toxicidad alguna significativa clínica o de laboratorio. Los efectos secundarios consistieron en un síndrome semejante a una gripe moderada durante 12-24 horas con fiebre baja y malestar a las dosis más altas, pero desaparecían usualmente después de los 6 primeros tratamientos. 12-20 pacientes exhibían a veces aumentos iniciales espectaculares en los recuentos de células T-4 junto con mejora sintomática, aunque esto no se mantuvo uniformemente. Los títulos de P-24 en plasma (una medida de la carga viral) que eran positivos en 8/16 pacientes antes del tratamiento bisemanal, o bien se hicieron indetectables o se mantuvieron de este modo en todos menos un paciente, cuyos títulos eran notablemente elevados al comienzo y descendieron en un 75% con el tratamiento.

En un estudio separado de dosificación de PICLC en 8 pacientes de SIDA, los tests neuropsicológicos han demostrado una mejora acusada en el tiempo de reacción de elección y el test de tablero de clavijas de Purdue a las 16 semanas de tratamiento, con regreso por deterioro a la línea base cuando se interrumpió PICLC. (Salazar, Martin, Levy, et al.; no publicado). Esto contrasta con un deterioro gradual estadísticamente significativo en el tiempo de reacción de elección observado en un grupo HIV+ sin tratar (N = 41) durante 6 meses. Como se ha sugerido arriba, es de esperar que puedan alcanzarse respuestas mejores aún que las observadas hasta la fecha utilizando la nueva técnica de doble dosificación descrita en la Sección B, anterior, y representada en la Figura 5.

D) Ejemplo del Tratamiento con Poly-ICLC de un Trastorno Autoinmune: Tratamiento de la Esclerosis Múltiple. Una prueba abierta de PICLC intravenoso a dosis alta (100 µg/kg) demostró una toxicidad aguda moderada en 15 pacientes con MS crónica; varios pacientes mejoraron o se estabilizaron, pero se deterioraron cuando se interrumpió el fármaco, como ha sido consignado por Bever, Salazar, et al., 1986. (Bever, Salazar et al. 1986) Subsiguientemente, Salazar continuó tratando algunos de estos y otros pacientes de MS con un régimen prolongado completamente nuevo utilizando dosis mucho menores de PICLC por vía intramuscular durante un periodo de tiempo más largo. Los resultados de este estudio de seguimiento no han sido publicados, y se exponen a continuación.

Métodos: Treinta y un pacientes con esclerosis múltiple crónica progresiva (CP) o exacerbante progresiva (EP) recibieron 5-100 µg/kg de PICLC IM cada 3-14 días durante hasta 15 años; la mayoría recibieron una dosis mediana de 10 µg/kg semanalmente.

La toxicidad se redujo notablemente hasta un malestar inconstante, moderado y transitorio. Se utilizó el Registro de Estado de Discapacidad Prolongada de Kurtzke (EDSS, que varía entre 0 (normal) y 9 (totalmente postrado en cama y dependiente) para evaluar el resultado. Como se muestra en la Figura 6, el EDSS se mantuvo estable o mejoró en 15/31 pacientes (espectacularmente en 5). Seis pacientes se deterioraron cuando se interrumpió el PICLC. Los 19 pacientes de CP exhibían un cambio mediano en el EDSS de 0,09 puntos por año durante una mediana de 60 meses; mientras que los 12 pacientes de EP exhibían una ligera mejoría (-0,1 EDSS por año) durante una mediana de 28 meses. Estas tasas se comparan muy favorablemente con las tasas de progresión esperadas en los pacientes de esclerosis múltiple sin tratar. (Téngase en cuenta que es mejor un registro Kurtzke más bajo).

Por consiguiente, PICLC IM a dosis bajas puede ser una alternativa valiosa a los beta-interferones más costosos y tóxicos para tratamiento de larga duración de la MS. Como se ha sugerido anteriormente, se espera que puedan alcanzarse tasas de respuesta mejores aún que las observadas hasta la fecha utilizando la nueva técnica de doble dosificación arriba descrita.

IV. Un método clínico para aumento de la velocidad y eficacia y reducción de la toxicidad de las vacunas, con inclusión de vacunas de virus vivos (por ejemplo, la vacuna de la viruela).

La estrategia aquí presentada está diseñada para controlar simultáneamente los efectos secundarios de las vacunas por reducción de la proliferación viral, direccionándose al mismo tiempo los antígenos relevantes para una respuesta inmune a la vacunación. Dicha estrategia lo consigue por estimulación de los mecanismos de respuesta inmediata naturales del hospedador a la infección viral, que incluyen la activación local de las células dendríticas en el momento de la vacunación por administración IM o tópica de Poly-ICLC en el momento de la vacunación.

REFERENCIAS:

- 10 Baron, S., A. Salazar, et al. (2003). Smallpox model: Protection by IFN and Poly-ICLC despite easive mechanisms. International Conference on Antiviral Research, Savannah, Georgia.
- Baze, W., E. Lvovsky, et al. (1979). "Evaluation of a nuclease resistant derivative of polyI polyC (Poly-ICLC) as a radioprotective agent." *Radiation Research* 77: 276-284.
- Bever, C., A. Salazar, et al. (1986). "Preliminary trial of poly-ICLC in chronic progressive multiple sclerosis." *Neurology* 36(4): 489-493.
- 15 Burgasova, M. (1977). "Study of the antiviral activity of a poly I: Poly-C complex with poly-1-lysine in monkeys." *Antibiotiki* 22(5): 458-60.
- Ewel, C., W. Urba, et al. (1992). "Polyinosinic-Polycytidylic acid complexed with poly-L lysine and corboxymethylcellulose in combination with interleukin 2 in patients with cancer: clinical and immunological effects." *Cancer Research* 52: 3005-3010.
- 20 Galabru, J., M. Katze, et al. (1989). "The binding of dsRNA and adenovirus VA1 RNA to the interferon-induced protein kinase." *European Journal of Biochemistry* 178: 581-89.
- Geiss, G., G. Jin, et al. (2001). "A comprehensive view of regulatio of gene expression by double-stranded RNA-mediated cell signaling." *J Biol Chem* 276(32): 30178-30182.
- 25 Harrington, D., D. Hlmas, et al. (1977). "Intranasal infection of monkeys with Japanese encephalitis virus: clinical response and treatment with a nuclease-resistant derivative of poly(I) poly(C)." *Am. J Tropical Med Hygiene* 26(6): 1191-97.
- Jacobs, B. and J. Langland (1996). "When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double stranded RNA." *Virology* 219: 339-349.
- 30 Katze, M. G. (1992). "The war against the interferon-induced dsRNA-activated protein kinase, can viruses win?" *Journal of Interferon Research* 12: 241-248.
- Koromilas, A., S. Roy, et al. (1992). "Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA dependant protein kinase." *Science* 257: 1685-1689.
- Levy, H. and C. Bever (1988). *Immune modulating effects of PICLC in mice, monkeys, and man. Applied Bioactive Polymers.* C. Carraher and V. Foster. New York, Plenum.
- 35 Levy, H. and E. Lvovsky (1978). "Topical treatment of vaccinia virus infecton with an interferon inducer in rabbits." *J Infect Dis* 137(1): 78-81.
- Levy, H. and A. Salazar (1992). *Interferon inducers. Interferon: Principles and Medical Applications.* S. Baron, D. Copenhaver, F. Dianzani et al. Galveston, U. Texas Medical Branch, Galveston: 65-76.
- 40 Lvovsky, E., P. Levine, et al. (1982). "Stimulation of hematopoietic stem cells by interferon inducer in non-human primates receiving fractionated total body irradiation." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8(10): 1721-1726.
- Maluish, A., J. Reid, et al. (1985). "Immunomodulatory effect of Poly-ICLC in cancer patients." *J Biol Resp Modif* 4: 656-663.
- Marcus, P. and M. Sekellick (2001). "Combined sequential treatment with interferon and dsRNA abrogates virus resistance to interferon action." *J. Interferon Cytokine Res* 21: 423-429.
- 45 Salazar, A., H. Levy, et al. (1996). "Long-term IM Poly-ICLC treatment of malignant glioma: an open pilot study." *Neurosurgery* 38(6): 1096-1104.
- Salazar, A., J. Morales, et al. (1990). "Intramuscular Poly-ICLC in HIV Infection: Preliminary findings." *Neurology* 40(Suppl I): 238.

Stephen, E., D. Hilmas, et al. (1977). "Swine influenza virus vaccine: potentiation of antibody responses in rhesus monkeys." *Science* 197: 1289-1290.

Stephen, E., M. Samos, et al. (1977). "Effect of a nuclease resistant derivative of polyribonucleic-polyribocytidylic acid complex on yellow fever in rhesus monkeys." *J Infect Dis* 136(1): 122-6.

5 Talmadge, J. and D. Hartman (1985). "Optimization of an immunotherapeutic protocol with Poly-ICLC." *Journal of Biological Response Modifiers* 4: 484-489.

Wong, J., E. Saravolac, et al. (1995). "Prophylactic and therapeutic efficacies of poly(ICLC) against respiratory influenza A virus infection in mice." *Antimicrob Agents Chemother* 39(11): 2574-2576.

10 Worthington, M. and S. Baron (1973). "Effect of poly IC and antibody on infection of immunosuppressed mice with vaccinia virus." *J Infect Dis* 128(3): 308-11.

Si bien se ilustra con respecto a un método para producir grandes lotes de Poly-ICLC final estéril adecuados para uso clínico con toxicidad reducida a niveles de dosis eficaces, y un método de utilización de Poly-ICLC para regulación de genes y tratamiento de ciertas condiciones de enfermedad, la invención puede aplicarse a cualquier método para producir grandes lotes de Poly-ICLC final estéril adecuados para uso clínico con toxicidad reducida a niveles de dosis eficaces, y un método de utilización de Poly-ICLC para regulación de genes que utiliza las mismas técnicas, modificado para adaptación a un método de producción de grandes lotes de Poly-ICLC final estéril adecuados para uso clínico con toxicidad reducida a niveles de dosis eficaces, y un método para utilización de Poly-ICLC a fin de regular ciertos genes de una manera que sería conocida para un experto en la técnica.

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método modificado mejorado para la fabricación a escala de producción de grandes lotes estériles de grado clínico de Poly-ICLC, un complejo de RNA bicatenario de ácido polirribonucleico-polirribocitidílico de alto peso molecular, poli-L-lisina de peso molecular bajo, y carboximetilcelulosa, que tiene mayor exactitud de suministro de fármaco en aplicaciones clínicas, y potencia biológica y actividad de inducción de interferón incrementadas en primates, que comprende los pasos de:
- 5 producir un RNA bicatenario de ácido polirribonucleico-polirribocitidílico utilizando una solución de componente ácido poliinosínico en un proceso que comprende clarificar la solución de ácido poliinosínico por calentamiento a aproximadamente 35°C antes de esterilización por filtración;
- 10 añadir una solución de componente poli-L-lisina muy lentamente a una solución de componente carboximetilcelulosa durante un periodo de al menos 4 días, y mezclar durante todo el tiempo de mezclado con energía suficiente para formar un torbellino y minimizar la formación de precipitado, seguido por adición del RNA bicatenario de ácido polirribonucleico-polirribocitidílico,
- 15 en donde la viscosidad de la carboximetilcelulosa se reduce por calentamiento a aproximadamente 35°C, pero no más de 40°C, a fin de hacer posible un torbellino satisfactorio mientras se realiza la mezclado.
- 2.- El método de la reivindicación 1 en donde la evaporación debida al calentamiento se contrarresta por adición de agua estéril para inyección durante el proceso de mezclado.
- 3.- Poly-ICLC producido por un método de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por tumores cerebrales malignos, melanoma, cáncer de mama y de pulmón, cáncer de colon, sarcomas, cáncer de células renales, leucemias, infecciones microbianas que incluyen gripe, infecciones de flavivirus, virus del Nilo Occidental, encefalitis japonesa, dengue, fiebre amarilla, coronavirus tales como SARS, filovirus tales como el virus Ébola, gripe, poxvirus tales como vaccinia y viruela, adenovirus, hepatitis, infecciones de herpesvirus, HIV, SIDA, encefalitis de los equinos, virus de la fiebre aftosa, complejo respiratorio de los bovinos, virus del síndrome reproductivo-respiratorio de los porcinos, esclerosis múltiple, síndrome Guillain Barre, neuropatías inmunes, vasculitis y radiación ionizante, por administración del mismo por vía intranasal, oral, sublingual, intramuscular, intravenosa, transdérmica o tópica en al menos dos dosis espaciadas 4-72 horas en donde la primera dosis está comprendida en un intervalo moderado de 20 a 100 µg/kg en humanos suficiente para inducir niveles medibles pero no excesivos de interferón sérico; y la segunda dosis, más baja, está comprendida en el intervalo de eficacia máxima de 10 a 50µg/kg en humanos para desbloqueo y estimulación de ciertos sistemas enzimáticos inducibles por interferón y dsRNA, con inclusión de PKR y 2'5'OAS.
- 20 30
- 4.- Poly-ICLC producido por un método de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reivindicación 3 en donde los ciclos de dosis deben repetirse semanalmente o dos veces por semana durante meses a años.
- 5.- Poly-ICLC producido por un método de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el mejoramiento de la acción y reducción de la toxicidad de una vacuna por administración del Poly-ICLC a un individuo, y administración de la vacuna deseada a dicho individuo.
- 35
- 6.- Poly-ICLC producido por un método de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el mejoramiento de la acción de una vacuna contra la viruela de acuerdo con la reivindicación 5.
- 7.- Poly-ICLC producido por un método de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en la regulación correctora de la expresión anormal de un gen codificante de helicasa, proteína inducida por interferón (p56), factor de necrosis tumoral factor regulador del interferón, metaloproteínasa de la matriz, activador del plasminógeno, proteína tumoral p53, factor de crecimiento de fibroblastos, factor 2 de iniciación eucariota, proteína asociada con filamentos de actina, o VCAM-1 por administración de una dosis eficaz en el intervalo de 10-40 microgramos por kg de peso corporal a un paciente que se encuentra en necesidad de tratamiento, a fin de estimular la respuesta temprana innata del hospedador de dicho paciente, repitiéndose dicha dosis a intervalos de 24-72 horas.
- 40 45

Figura 1. Respuesta Sistémica a una Dosis Intranasal Simple de Poly-ICLC en Monos Rhesus

Mono #	Línea Base de Título de Interferón en plasma (U. Intl.)	Título de interferón en Plasma a las 24 Horas (U. Intl.)
CE 5 F	<3	200
CF 61	<3	200
CF 67	<3	700
CF4J	<3	700
CF 8F	<3	700
CF 5X	<3	<3
CF 45	<3	100
CF 4R	<3	200

Figura 2. Inducción de Interferón en Monos Rhesus por 2 mg/kg IV de Poly-ICLC Como se Describe en la Presente Solicitud (Lote #RBP 1005) (Compárese con la Tabla II en Levy '82, Patente #4349538, Tratamiento con 3 mg/kg PICLC)

Mono#	Hora Hemorragia	IFN U/mL	IFN (Levy'82)
Rh H572	0 horas	3	
Rh H573		<3	
Rh H574		<3	
Rh H578		<3	
<hr/>			
Rh H572	8 horas	7000	125-6000
Rh H573		7000	
Rh H574		7000	
Rh H578		2000	
<hr/>			
Rh H572	24 horas	700	
Rh H573		300	
Rh H574		700	
Rh H578		200	

Figura 3. Test de Partículas (Claridad) de los Componentes de Poly-ICLC y Producto Final Como se Describe en la Presente Solicitud

	10-25 micrómetros	> 25 micrómetros
Componentes:		
Solución Poly I:	29,4/ml	0,9
Solución Poly C:	16/ml	1,7
Solución de poli-lisina:	94,8/ml	3,4
Solución de carboximetilcelulosa:	199,6/ml	40,4
<u>Poli-ICLC</u> (método mejorado)	731/envase	110
<u>Poli-ICLC</u> (método antiguo)	> 5.500	> 500

Tabla 4: Porcentaje de Supervivencia de los Pacientes de Glioma Maligno Tratados con Poly-ICLC

Supervivencia	GBM <u>12 pacientes</u>	AA <u>11 pacientes</u>	AA (pf) <u>11 pacientes</u>
1 año	92% (50%†)	100%	100%
2 años	50%	100% (50%†)	91%
3 años	25% (2.2%†)	91%	82%
4 años	17%	91%	82%
5 años	8%	91%	73%
8 años	8%	82%	36%

GBM = glioblastoma, AA = astrocitoma anaplásico, pf = supervivencia exenta de progresión,
 † = Supervivencia esperada durante el tratamiento estándar con radiación y quimioterapia.

Figura 5. Tratamiento con Poly-ICLC del SIDA, Carga Viral

Grupo I: Poly-ICLC Más Azt								
PACIENTE		Antigenemia P24 (pcg/ml)						
Número	Base	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses	30 meses
PR-O1	89	15	21	305	D	D	D	D
PR-O2	45	20	140	-	D	D	D	D
PR-O3	0	80	34	-	D	D	D	D
PR-O4	0	-	78	0	0	0	0	-
PR-O5	0	-	-	-	-	-	-	-
PR-O6	200	-	310	D	D	D	D	D
PR-O7	-	346	35	-	D	D	D	D
PR-O8	-	78	42	0	0	0	0	-
04-056	12	0	57	-	D	D	D	D
PR-10	72	-	-	0	0	0	-	-
PR-11	80	37	-	0	0	0	-	-
PR-12	76	37	-	0	0	0	-	-
PR-13	85	-	16	11	0	D	D	D
PR-16	0	0	0	0	-	-	-	-
PR-24	0	0	0	0	-	-	-	-
PACIENTE		Antigenemia P24 (pcg/ml)						
Número	Base	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses	30 meses
PR-15	0	0	0	D	D			
PR-17	0	0	0	0	-			
PR-18	0	-	0	0	-			
PR-19	117	31	D	D	D			
PR-20	0	0	0	0	-			
PR-21	0	0	0	0	-			
PR-22	0	0	0	0	-			
PR-23	808	704	440	200	-			
"-" = No realizado								

Figura 6. Tratamiento con Poly-ICLC de la Esclerosis Múltiple Progresiva

MS CRÓNICA-PROGRESIVA							
SEXO/	Meses	EDSS-E	AI-E	EDSS-L	AI-L	Cambio	Cambio
EDAD	con PICLC					EDSS	por año
F/29	128	7	8	8.5	9	1.5	0.1
F/35	82	8.5	9	10	9	1.5	0.2
M/25	27	7	8	10	9	3	1.3
M/42	189	5	5	7.5	6	2.5	0.2
F/39	136	8	9	9	9	1	0.1
M/28	12	6	5	5.5	3	-0.5	-0.5
M/22	45	7.5	7	8.5	9	1	0.3
F/61	121	6.5	5	8	5	1.5	0.1
M/49	164	6	4	6.5	6	0.5	0.0
F/39	114	8	8	8	8	0	0.0
M/46	13	9	9	7	7	-2	-1.8
M/25	42	7	6	7.5	8	0.5	0.1
F/59	26	5.5	4	6	3	0.5	0.2
M/41	25	8.5	9	8.5	9	0	0.0
F/62	6	7.5	8	7.5	8	0	0.0
M/23	10	5.5	3	4.5	3	-1	-1.2
F/50	85	6.5	6	7	6	0.5	0.1
F/41	60	6.5	6	9	9	2.5	0.5
F/35	126	8	8	8	9	0	0.0
MEDIANA	60	7.0	7.0	8.0	8.0	0.5	0.09
PROGRESIVA EXACERBANTE							
SEXO/	Meses	EDSS-E	AI-E	DSS-L	AI-L	Cambio	Cambio
EDAD	con PICLC					EDSS	por año
F/36	4	9	9	3	2	-6	-18.0
F/34	35	5.5	2	6	3	0.5	0.2
F/26	68	4.5	0	5	2	0.5	0.1
F/55	85	4	2	3.5	2	-0.5	-0.1
F/35	84	3	2	3.5	3	0.5	0.1
M/42	28	6	4	6	4	0	0.0
F/25	63	9.5	9	4	2	-5.5	-1.0
M/22	3	8.5	9	6	6	-2.5	-10.0
F/14	57	8.5	9	4.5	2	-4	-0.8
F/54	9	8.5	9	8.5	8	0	0.0
F/29	12	5	3	1	1	-4	-4.0
F/34	25	5.5	3	5.5	3	0	0.0
F/17	83	9.5	9	3	2	-6.5	-0.9
MEDIANA	35	6.0	4.0	4.5	2.0	-0.5	-0.1

EDSS-E = Registro del estado de discapacidad de Kurtzke a la entrada; EDSS-L = EDSS en el último examen; rango de EDSS desde 1 (MS moderada) a 9 (totalmente discapacitado)

AI-E = índice de ambulación a la entrada en el estudio; AI-L = AI en el último examen

AI varía desde 1 (discapacidad mínima) a 9 (postrado en cama)