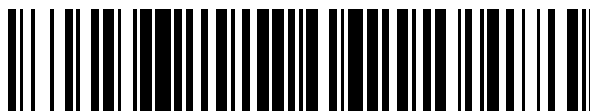


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 466**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/01** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 35/20** (2006.01)

**A61K 35/16** (2006.01)

**A61K 35/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.1998 E 05026035 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1690545**

54 Título: **Preparación de Producto R y producto así obtenido**

30 Prioridad:

**15.04.1997 US 839649**

**03.09.1997 US 922888**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.03.2014**

73 Titular/es:

**OHR PHARMACEUTICAL, INC. (100.0%)**

**489 Fifth Avenue, 28th Floor**

**New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**FRIEDLAND, BERNARD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 448 466 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

Preparación de Producto R y producto así obtenido

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para producir Producto R y a Producto R producido por estos métodos.

10 Un retrovirus designado virus de la inmunodeficiencia humana (HIV – siglas en inglés) es el agente etiológico de la enfermedad compleja que incluye la destrucción progresiva del sistema inmune (síndrome de inmunodeficiencia adquirida; SIDA) y la degeneración del sistema nervioso central y periférico. Este virus fue previamente conocido como LAV, HTL-III o ARV. El virus ataca específicamente a los linfocitos T helper (colaboradores) 4, un subgrupo de linfocitos T que juega un papel principal en la defensa del cuerpo frente a enfermedades infecciosas. El agotamiento de este subconjunto de linfocitos se manifiesta por una incidencia incrementada de infecciones oportunistas tales como penumocystis carinii y determinados cánceres. Más específicamente, el virus penetra en el linfocito T e incorpora ADN codificado viralmente en el ADN del linfocito T hospedante. Mientras que el linfocito T infectado permanezca inactivado, el virus permanecerá silenciosamente en el ADN de la célula hospedante. Esto no matará a la célula, pero puede perjudicar su función. Cuando los linfocitos T infectados son activados por estímulos tales como un antígeno específico, el ADN viral en el ADN hospedante se expresa y produce nuevas partículas virales. El linfocito T hospedante es entonces exterminado y lisado, liberando nuevas partículas virales que pueden invadir y exterminar a otros linfocitos T. La pérdida de linfocitos T-4 es profunda y se produce incluso más rápidamente que lo que puede ser justificado por el exterminio viral directo de las células. Esto ha conducido a algunos investigadores a postular que la infección desconecta de alguna forma la producción de linfocitos T-4. En cualquier caso, el timo normal ya no funciona, y los linfocitos T exterminados no pueden ser reemplazados, dejando al paciente vulnerable a infecciones subsiguientes. Especialmente llamativos son los recientes estudios de los timos de pacientes de SIDA fallecidos que oscilan en una edad de 10 meses a 42 años. Las víctimas del SIDA tienen una profunda involución tímica; mucho más extensiva que en pacientes de edad equiparable quienes murieron por otras causas.

La curación de una persona con SIDA requerirá probablemente de un agente para eliminar el virus y de otros agentes para provocar que el cuerpo reemplace a las células T que han sido exterminadas por parte del virus. La primera etapa consiste en eliminar el virus del SIDA del paciente. Esto tendrá que ser sustentado por otras terapias para inducir la restauración de la función inmune. Estudios realizados hasta la fecha con agentes activantes de macrófagos, inductores de interferón y linfoquinas han sido decepcionantes, posiblemente debido a que sus dianas, los linfocitos T, no existen en número suficiente. La interleucina 2 restaura la función de un subconjunto de células no T (células asesinas naturales), pero no tiene efecto alguno sobre un hospedante de otros defectos graves. Se pueden realizar medidas más drásticas. Un método potencial de restaurar el sistema inmune es trasplantando la médula ósea procedente de donantes sanos. Sin embargo, este es un proceso peligroso. Puede producir enfermedades de injerto frente al hospedante letales, a menos que el donante del paciente sea un gemelo idéntico.

Una característica común de la replicación del retrovirus es el amplio proceso post-traducción de polipéptidos precursores por parte de una proteasa codificada vitalmente para generar proteínas vitales maduras requeridas para el ensamblaje y la función del virus. La inhibición de este procesamiento previene la producción de virus normalmente infecciosos. Se ha demostrado que la inactivación genética de la proteasa codificada por el HIV daba como resultado la producción de partículas de virus inmaduras y no infecciosas. Estos resultados indican que la inhibición de la proteasa del HIV representa un método viable para el tratamiento del SIDA y la prevención o tratamiento de una infección por parte del HIV. Sin embargo, la administración de un inhibidor de la proteasa del HIV provoca a veces efectos secundarios que incluyen náuseas, nefrolitiasis, bilirrubina incrementada o molestias gastrointestinales.

55 Zidovudina (AZT) es un análogo de pirimidina sintético que difiere de la timidina porque tiene un sustituyente azido en lugar de un grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo desoxirribosa. Inicialmente fue desarrollado como un agente anticancerígeno y subsiguientemente se encontró que inhibía la transcriptasa inversa (RT – siglas en inglés) del virus de la leucemia de Friend. Poco después de la identificación de un retrovirus humano como el agente etiológico del SIDA, zidovudina demostró tener actividad anti-HIV in vitro. La selectividad de zidovudina es

debida a la interacción preferencial de AZT-TP con la RT. La fosforilación de zidovudina para dar su forma activa, AZT-TP, se consigue mediante enzimas celulares. Zidovudina es un sustrato eficaz para la timidina quinasa celular que la convierte en AZT-MP, tanto en células infectadas como no infectadas. AZT-MP se acumula en las células debido a la lenta fosforilación en AZT-DP por parte de timidilato quinasa de la célula hospedante que es la etapa limitadora de la velocidad en la formación de AZT-TP. AZT-MP es un inhibidor competitivo de la timidilato quinasa y reduce la conversión de dTMP en dTDP que conduce a una formación disminuida de dTTP. Otros análogos de nucleósidos, incluidos ddI, ddC y ddA, también tienen actividad frente al HIV a través de un mecanismo similar al descrito para AZT.

Sin embargo, la toxicidad principal de zidovudina se encuentra en la médula ósea, con apariciones de anemia macrocítica y granulocitopenia común. Los mecanismos de estos efectos tóxicos son inciertos. Se han descrito raros casos de pancitopenia con médula hipocelular, y pacientes con una pobre reserva de la médula ósea, secundaria a infecciones oportunistas o deficiencia en vitamina B<sub>12</sub>, tienen una mayor toxicidad que los pacientes con una reserva suficiente de médula. También se pueden observar náuseas, mialgia, insomnio, fiebre, sarpullido, pigmentación en las uñas y dolores de cabeza graves.

El Producto R<sup>1</sup> surgió como un producto antiviral en los años 1930. Aún cuando originalmente se pensó que era un producto compuesto por peptona, péptidos y ácidos nucleicos (definidos por completo aquí en lo que sigue), la composición precisa permanece sin identificar. No obstante, el Producto R ha demostrado una capacidad de inhibir rápidamente el curso de varias enfermedades virales. Es no tóxico, miscible con fluidos tisulares y sueros sanguíneos y está exento de propiedades anafilactogénicas. Estudios recientes demostraron que el Producto R también puede estimular el sistema inmune y la producción de glóbulos rojos, sugiriendo que Producto R es un modulador del sistema inmune.

<sup>1</sup> El agente se conoce bajo la marca registrada "Reticulose", una marca registrada de Advanced Viral Research Corp.

En lo que la solicitante conoce, el Producto R nunca ha sido utilizado ni sugerido para tratar pacientes de SIDA en combinación con otros agentes anti-SIDA. Se ha descubierto ahora que una combinación de Producto R y otros agentes antivirales útiles para tratar infecciones por el HIV o el SIDA presenta un tratamiento ventajoso para pacientes de SIDA.

### **SUMARIO DE LA INVENCION**

Por consiguiente, un objeto de esta invención es proporcionar Producto R y métodos para producir el mismo.

Objetos y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada considerada en unión con los dibujos que se acompañan. Ha de entenderse, sin embargo, que los dibujos están diseñados únicamente para fines de ilustración y no como una definición de los límites de la invención, para los cuales debería hacerse referencia a las reivindicaciones adjuntas.

### **DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ACTUALMENTE PREFERIDAS**

Tal como se utiliza en esta memoria, Producto R es el producto producido de acuerdo con cualquiera de los siguientes métodos

#### **Método I para Preparar Producto R**

Suspender aproximadamente 35,0 g de caseína, aproximadamente 17,1 g de peptona bovina, aproximadamente 22,0 g de ácido nucleico (ARN), aproximadamente 3,25 g de albúmina de suero bovino en aproximadamente 2,5 litros de agua para inyección USP a aproximadamente 3 hasta 7°C en un recipiente adecuado y agitar suavemente hasta que todos los ingredientes se hayan humedecido adecuadamente. Añadir cuidadosamente, al tiempo que se agita, aproximadamente 16,5 g de hidróxido de sodio (reactivo de calidad ACS) y continuar agitando hasta que se haya disuelto por completo el hidróxido de sodio. Someter en autoclave a una presión de aproximadamente 9 libras (62.053 Pa) y 200 - 230 °F (93,3 a 110°C) durante un período de tiempo hasta que se haya digerido por completo el ARN, por ejemplo aproximadamente 4 horas. Al final del período, se para el autoclave, y se permite que el matraz de reacción y el contenido se enfríen lentamente a la temperatura ambiente. Después, enfriar durante al menos seis horas a aproximadamente 3-8°C. La disolución resultante se filtra a través de filtros de 2 micras y 0,45

micras utilizando un gas inerte tal como nitrógeno o argón a baja presión (1-6 psi - 0,07-0,42 kg/cm<sup>2</sup>). De una manera similar, la disolución se filtra de nuevo a través de filtros de retención pirógenos de 0,2 micras. El filtrado resultante se muestrea y se somete a ensayo en cuanto al contenido en nitrógeno total. Se realiza entonces un cálculo para determinar la cantidad de agua para inyección enfriada a añadir al filtrado para proporcionar un filtrado diluido con un contenido en nitrógeno entre aproximadamente 165-210 mg/ml, el volumen final es de aproximadamente 5 litros. Después, el pH se ajusta con HCl concentrado (reactivo de calidad ACS) o NaOH 1,0 normal hasta un intervalo de aproximadamente 7,3 - 7,6. La disolución diluida se filtra entonces, de nuevo a través de filtros de 0,2 micras, con gas inerte a baja presión. El filtrado final se incorpora entonces y se sella en ampollas de vidrio de 2 ml al tiempo que se encuentra en una atmósfera de gas inerte. Las ampollas se recogen y se someten en autoclave para la esterilización final a 240 °F (115,6°C) y una presión de 20 a 30 libras (137.895 a 206.834 Pa) durante aproximadamente 30 minutos. Después del ciclo de esterilización, las ampollas con Producto R se enfrían y lavan.

Todas las cantidades son objeto de una variación más o menos 2,5% para el pH, volumen y ajustes analíticos.

#### Método II para Preparar Producto R

Suspender aproximadamente 35,0 g de caseína, aproximadamente 17,1 g de peptona bovina, aproximadamente 22,0 g de ácido nucleico (ARN), aproximadamente 3,25 g de albúmina de suero bovino en aproximadamente 2,5 litros de agua para inyección USP a aproximadamente 3 hasta 7°C en un recipiente adecuado y agitar suavemente hasta que todos los ingredientes se hayan humedecido adecuadamente. Añadir lentamente, al tiempo que se agita, aproximadamente 11,75 ml de ácido clorhídrico (reactivo de calidad ACS) y continuar agitando hasta que se haya disuelto por completo el ácido clorhídrico. Someter en autoclave a una presión de aproximadamente 9 libras (62.053 Pa) y 200 - 230 °F (93,3 a 110°C) durante un período de tiempo hasta que se haya digerido por completo el ARN, por ejemplo aproximadamente 4 horas. Al final del período, se para el autoclave, y se permite que el matraz de reacción y el contenido se enfríen lentamente a la temperatura ambiente. Después, enfriar durante al menos seis horas a aproximadamente 3-8°C. La disolución resultante se filtra a través de filtros de 2 micras y 0,45 micras utilizando un gas inerte tal como nitrógeno o argón a baja presión (1-6 psi - 0,07-0,42 kg/cm<sup>2</sup>). De una manera similar, la disolución se filtra de nuevo a través de filtros de retención pirógenos de 0,2 micras. El filtrado resultante se muestrea y se somete a ensayo en cuanto al contenido en nitrógeno total. Se realiza entonces un cálculo para determinar la cantidad de agua para inyección enfriada a añadir al filtrado para proporcionar un filtrado diluido con un contenido en nitrógeno entre aproximadamente 165-210 mg/ml, el volumen final es de aproximadamente 5 litros. Después, el pH se ajusta con HCl concentrado (reactivo de calidad ACS) o 35% (p/p) de NaOH hasta un intervalo de aproximadamente 7,3 - 7,6. La disolución diluida se filtra entonces, de nuevo a través de filtros de 0,2 micras, con gas inerte a baja presión. El filtrado final se incorpora entonces y se sella en ampollas de vidrio de 2 ml al tiempo que se encuentra en una atmósfera de gas inerte. Las ampollas se recogen y se someten en autoclave para la esterilización final a 240 °F (115,6°C) y una presión de 20 a 30 libras (137.895 a 206.843 Pa) durante aproximadamente 30 minutos. Después del ciclo de esterilización, las ampollas con Producto R se enfrían y lavan.

Todas las cantidades son objeto de una variación más o menos 2,5% para el pH, volumen y ajustes analíticos.

Inhibidores de la proteasa de HIV incluyen análogos de oligopéptidos tales como saquinavir (Roche Laboratories), indinavir (Merck) o ritonavir (Abbott Laboratories), que se describen por completo en detalle en las patentes de EE.UU. N°s 5.413.999 y 5.476.874.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para producir Producto R, que comprende las etapas de:
- 5 a) suspender aproximadamente 35,0 gramos de caseína, aproximadamente 17,1 g de peptona bovina, aproximadamente 22,0 gramos de ácido nucleico (ARN) y aproximadamente 3,25 gramos de albúmina de suero bovino en aproximadamente 2,5 litros de agua para inyección USP a aproximadamente 3 hasta 7°C;
  - b) añadir aproximadamente 16,5 gramos de hidróxido de sodio a la mezcla de la etapa a);
  - 10 c) someter en autoclave al producto de la etapa b) a una presión de aproximadamente 9 libras (62.053 Pa) y 200 – 230 °F (93,3 a 110°C) hasta que se haya digerido por completo el ARN;
  - d) enfriar el producto de la etapa c) a la temperatura ambiente y luego enfriar durante al menos seis horas a aproximadamente 3-8°C;
  - e) secuencialmente, filtrar el producto de la etapa d) a través de un filtro de 2 micras, un filtro de 0,45 micras y un filtro de 0,2 micras;
  - 15 f) diluir el producto de la etapa e) con agua para proporcionar un volumen final de aproximadamente 5 litros;
  - g) ajustar el pH del producto de la etapa f) en un intervalo de aproximadamente 7,3 a 7,6 utilizando HCl concentrado o NaOH 1,0 normal;
  - h) filtrar el producto de la etapa g) a través de un segundo filtro de 0,2 micras; e
  - 20 i) someter a autoclave el producto de la etapa h) a 240 °F (115,6°C) y una presión de 20-30 libras (137.895 - 206.843 Pa) durante aproximadamente 30 minutos.
- 2.- Un producto producido por el método de la reivindicación 1.
- 3.- Un método para producir Producto R, que comprende las etapas de
- 25 a) suspender aproximadamente 35,0 gramos de caseína, aproximadamente 17,1 g de peptona bovina, aproximadamente 22,0 gramos de ácido nucleico (ARN) y aproximadamente 3,25 gramos de albúmina de suero bovino en aproximadamente 2,5 litros de agua para inyección USP a aproximadamente 3 hasta 7°C;
  - 30 b) añadir aproximadamente 11,75 ml de ácido clorhídrico a la mezcla de la etapa a);
  - c) someter en autoclave al producto de la etapa b) a una presión de aproximadamente 9 libras (62.053 Pa) y 200 – 230 °F (93,3 a 110°C) hasta que se haya digerido por completo el ARN;
  - d) enfriar el producto de la etapa c) a la temperatura ambiente y luego enfriar durante al menos seis horas a aproximadamente 3-8°C;
  - 35 e) secuencialmente, filtrar el producto de la etapa d) a través de un filtro de 2 micras, un filtro de 0,45 micras y un filtro de 0,2 micras;
  - f) diluir el producto de la etapa e) con agua para proporcionar un volumen final de aproximadamente 5 litros;
  - 40 g) ajustar el pH del producto de la etapa f) en un intervalo de aproximadamente 7,3 a 7,6 utilizando HCl concentrado o 35% (p/p) NaOH;
  - h) filtrar el producto de la etapa g) a través de un segundo filtro de 0,2 micras; e
  - i) someter a autoclave el producto de la etapa h) a 240 °F (115,6°C) y una presión de 20-30 libras (137.895 - 206.843 Pa) durante aproximadamente 30 minutos.
- 45 4.- Un producto producido por el método de la reivindicación 3.